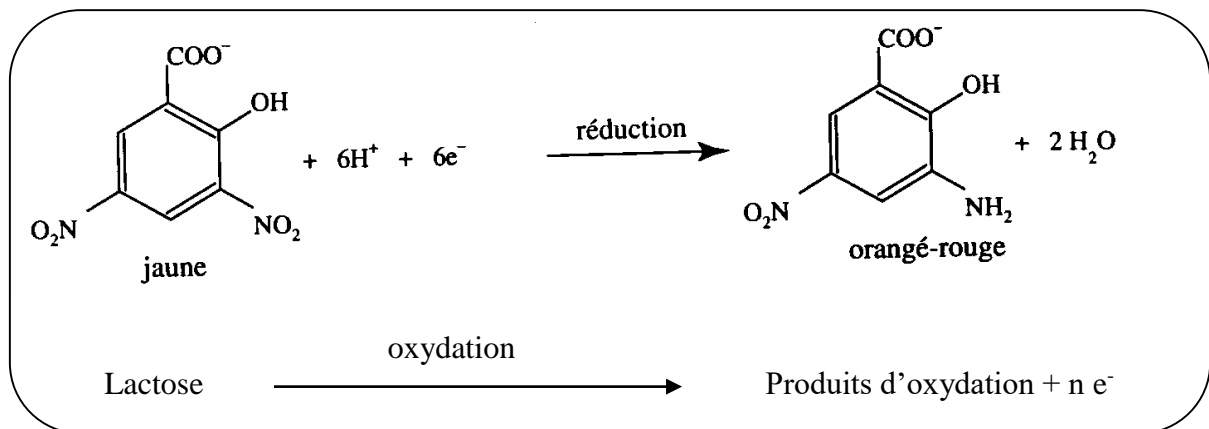


DETERMINATION DE LA TENEUR EN LACTOSE DU LAIT

L'objectif de ce TP est de déterminer la teneur en lactose d'un échantillon de lait écrémé.

1. PRINCIPE

Le lactose peut être dosé grâce à ses propriétés réductrices, en milieu **alcalin et à chaud**, vis-à-vis de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS). Le 3,5-DNS jaune est réduit en 3-amino-5-nitrosalicylique qui est rouge orangé et qui peut être dosé par spectrophotométrie à **530 nm**.



La réaction n'étant pas stoechiométrique elle est dépendante des conditions opératoires. On travaillera donc par référence à une gamme étalon établie avec des solutions de lactose pur.

2. MATERIEL

Fioles de 200, 5 et 20 mL
 Tubes à vis de 20 mL
 Bêchers de 50, 10, 100 et 200 mL
 Grand cristalliseur
 Filtres papier, pipette de 20 mL deux traits
 Erlen à vis de 250 mL
 Cuves de spectrophotomètre en plastique

3. REACTIFS

Solutions déjà prêtes

- Solution aqueuse de ferrocyanure de potassium : $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, à $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Solution aqueuse d'acétate de zinc : $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, à $300\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Solution d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) à $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (**pH 14**).

Attention à bien mettre les équipements de protection individuelle pour manipuler ces solutions.

Solutions à préparer

- Solution mère de lactose à 2 g.L^{-1} . Vous devez préparer **de façon précise 100 mL** de cette solution dans de l'eau distillée.

4. MANIPULATION

➤ Défécation :

La défécation permet de précipiter les protéines présentes dans le lait et qui pourraient interférer dans le dosage (de par leurs propriétés réductrices elles peuvent réagir avec le DNS).

Dans la fiole jaugée de 200 mL, introduire successivement :

- 20 mL de lait, avec la pipette jaugée 2 traits (évitez de faire mousser le lait)
- 2 mL de solution de ferrocyanure de potassium
- 2 mL de solution d'acétate de zinc.

Agiter modérément car **le mélange ne doit pas mousser**.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

Ajouter ensuite 2 mL d'eau distillée pour tenir compte du volume de précipité.

Agiter par retournement puis laisser reposer 15 min.

Filtrer ensuite **la totalité du filtrat** à l'aide d'un entonnoir tapissé d'un filtre papier. Filtrer à nouveau si le filtrat n'est pas absolument limpide.

Ce filtrat sert à la fois pour cette manipulation et pour le TP « Détermination qualitative des sucres présents dans le lait écrémé », NE LE JETEZ PAS A LA FIN DE LA MANIPULATION !

➤ Préparation de l'échantillon à caractériser

Le filtrat de lait est trop concentré pour réagir avec le DNS, il faut donc le diluer.

Faire deux dilutions différentes de votre filtrat dans de l'eau distillée : une dilution au demi et une dilution au cinquième. Vous avez pour cela à votre disposition des fioles de 5 mL uniquement.

Les dilutions doivent être extrêmement précises, il faut donc les faire avec soin.

➤ Réaction avec le DNS

La réaction avec le DNS se fait à chaud dans des tubes à vis de 20 mL.

Gamme d'étalonnage : vous allez faire réagir des quantités croissantes de lactose avec le DNS selon le tableau ci-dessous :

Lactose (mg)	0	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,6	2
Solution mère lactose (mL)									
DNS (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Eau (mL)									
V total (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3	3

↪ Calculez le volume de solution mère de lactose à mettre dans chacun des tubes pour obtenir les quantités indiquées dans le tableau

↪ Calculez le volume d'eau à ajouter afin d'obtenir un volume final de 3 mL

Ces calculs sont à réaliser AVANT le jour du TP.

Echantillons : vous allez faire l'essai avec deux quantités de filtrat pour chacune des dilutions selon le tableau ci-dessous :

Volume filtrat (mL)	0,25 (dilution au 1/2)	0,5 (dilution au 1/2)	0,5 (dilution au 1/5)	1 (dilution au 1/5)
DNS (mL)	2	2	2	2
Eau (mL)				
V total (mL)	3	3	3	3

Mettre les différents réactants puis mettre au **bain-marie bouillant** tous les tubes en même temps (gamme étalonnage et échantillons). Vous devez avoir **13 tubes en tout**. Laisser les tubes **exactement 5 minutes** dans le bain-marie (utiliser un chronomètre) puis sortir le portoir et le mettre immédiatement dans la glace afin de stopper la réaction. Laisser environ 5 minutes dans la glace puis ajouter 15 mL d'eau distillée dans chacun des tubes à l'aide d'un distributeur.

Transvaser ensuite le contenu de chaque tube dans une cuve en plastique de spectrophotomètre avant de procéder à la lecture à la longueur d'onde de 530 nm. Faire le blanc de l'appareil avec la cuve témoin (sans lactose). La lecture doit être faite dans l'heure qui suit la fin de la réaction.

5. RESULTATS

↪ Tracer la courbe représentative de la fonction Absorbance à 530 nm = f [lactose]

↪ A l'aide de cette courbe, déterminer la concentration en protéines de votre échantillon en tenant compte des dilutions.

↪ Calculer ensuite la teneur en lactose dans un litre de lait.

Exemple pour l'essai avec 0,5 mL de filtrat dilué au demi :

Soit x la quantité de lactose en mg que vous avez trouvée expérimentalement.

Les x mg de lactose se trouvent dans 0,5 mL de filtrat dilué au demi, il faut donc multiplier x par 2 puis pour trouver la quantité dans 200 mL de filtrat il faut multiplier par 200 et diviser par 0,5. Ces 200 mL de filtrat proviennent de 20 mL de lait, pour ramener à un litre il faut donc multiplier par 1000 et diviser par 20.

$$\text{Au final : } [Lactose] = \frac{x \times 2 \times 200 \times 1000}{0,5 \times 20} \text{ mg}$$