

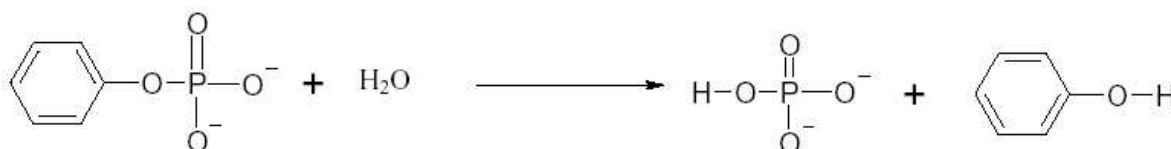
CONTRÔLE DU TRAITEMENT THERMIQUE DU LAIT : DOSAGE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA MÉTHODE DE SANDERS ET SAGER (MÉTHODE RÉFÉRENCE)

La phosphatase alcaline est une enzyme à structure dimérique, de masse molaire égale à 170000 g.mol⁻¹. De nature glycoprotéique, elle contient 4 atomes de zinc par molécule de protéine. Deux types de métaux sont nécessaires pour une activité maximale : le zinc et le magnésium. L'enzyme est inhibée par la L-cystéine et les chélateurs des métaux. Son pH optimum est de 10.

Le lait cru contient plusieurs enzymes dont la phosphatase alcaline. La destruction de la flore pathogène du lait se fait habituellement par pasteurisation, c'est à dire chauffage à 72°C pendant quelques secondes. Cette température correspond à l'inactivation totale de la phosphatase alcaline. Le dosage de l'activité de cette enzyme est une méthode de contrôle de pasteurisation.

1. Principe.

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse du phénylphosphate disodique à pH 10 avec libération de phénol selon l'équation suivante :



Le phénol, en présence de BQC : dichloroquinone chloroimine (ou dichloroquinone chloramine), donne un composé bleu dosable par spectrophotométrie. Dans les conditions de dosage, la coloration obtenue est proportionnelle à l'activité de la phosphatase alcaline.

2. Technique.

2.1. Étalonnage



A partir d'une solution mère de phénol à 2 g.L⁻¹, préparer 100 mL de solution étalon de phénol à 20 mg.L⁻¹.

Puis réaliser une gamme de 6 tubes étalon :

- V_{étalon} de solution étalon de phénol (mL) de 0 à 20 µg/tube
- Eau distillée qsp 4mL
- 1 mL de solution de sulfate de cuivre à 0,5 g.L⁻¹ (pour stabiliser la couleur)
- 5 mL de tampon à pH 9,8 **dilué au** $\frac{1}{10}$ ^{ème}
- 100 µL de BQC (= réactif de Gibbs)



Boucher les tubes avec du parafilm et agiter au vortex.
Laisser la coloration se développer 30 minutes à l'obscurité.
Lire les absorbances à 610 nm contre un tube témoin réactif.

2.2. Dosage.

- Introduire 1 mL de **lait cru dilué au $\frac{1}{100}$ ^{ème}** ou 1 mL de lait pasteurisé non dilué dans 2 tubes à essais : l'un noté « essai » l'autre « témoin ».
- Placer le tube témoin pendant 2 minutes dans un bain-marie à 100°C (enzyme dénaturée). Refroidir à température ambiante.
- Ajouter dans chacun des tubes, 10 mL de solution tamponnée de phénylphosphate disodique préchauffé à 37°C. Agiter et déclencher le chronomètre dans le cas du tube essai. Boucher les tubes. Les laisser dans un bain d'eau thermostaté à 37°C pendant 1 heure (temps à respecter exactement pour le tube essai). Agiter les tubes de temps en temps.
- Mettre les deux tubes dans un bain d'eau bouillante pendant deux minutes (arrêt de la réaction sous l'action de la température dans le tube essai). Refroidir à température ambiante.
- Ajouter dans chaque tube 1 mL de déféquant Zn-Cu (qui précipite les protéines et la matière grasse). Boucher avec du parafilm et agiter au vortex.
- Filtrer sur papier Whatman n°42 **SOUS LA HOTTE** et prélever 5 mL de chaque filtrat dans de nouveaux tubes marqués « essai » et « témoin ».
- Ajouter dans chaque tube :
 - 5 mL de tampon pH 9,8 (non dilué)
 - 100 µL de BQC

Boucher avec du parafilm et agiter.

- Attendre 30 min à l'obscurité et lire l'absorbance du tube essai à 610 nm contre le témoin réactif dans des cuves bouchées avec du parafilm.

3. Résultats

3.1. Étalonnage

- Expliquer la préparation de la solution étalon de phénol.
- Calculer $V_{\text{étalon}}$ pour $m_{\text{phénol}} = 2, 5, 10, 15, 20 \mu\text{g}/\text{tube}$
- Faire un tableau de la gamme d'étalonnage
- Tracer la courbe d'étalonnage $A_{610} = f(m_{\text{phénol}} \text{ en } \mu\text{g}/\text{tube})$

3.2. Dosage

- Déterminer la quantité de phénol libéré en 1 heure à 37°C par 1 mL de lait à doser. Conclure.
- Calculer l'activité phosphatasique du lait en UI/L et en µkat/L.

Donnée : Un lait est considéré comme correctement pasteurisé lorsque la quantité de phénol libéré ne dépasse pas 4 µg par heure pour 1 mL de lait.