

XII PROVA DI SELEZIONE NAZIONALE DELLA SQUADRA ITALIANA

Latte, latticini e lattosio

Tempo a disposizione: **4 ore 30'**



16 FEBBRAIO 2023

Campus Fiore di Botta, Padova

*Competizione valevole per la
Certificazione delle Eccellenze*



Credits: P. Centomo

Le risposte a tutti i quesiti devono essere riportate esclusivamente sul foglio risposte

Determinazione spettrofotometrica del lattosio nel latte

Il lattosio è lo zucchero più abbondante nel latte, che contiene anche piccole quantità di glucosio e di altri saccaridi. Il lattosio è un disaccaride, costituito da un'unità di glucosio ed una di galattosio, connesse da un legame β -1,4 glucosidico (Figura 1).

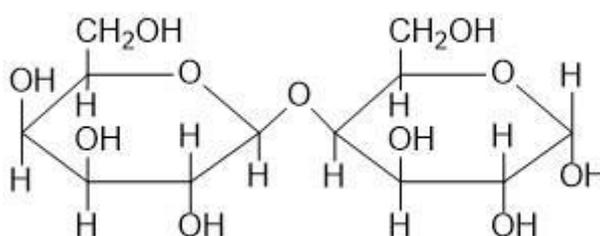


Figura 1. Struttura del lattosio

Rispondi ai quesiti iniziali sul lattosio presenti nel Foglio Risposte (CH.1 e CH2).

Il lattosio contribuisce al sapore del latte e viene fermentato dai batteri lattici ad acido lattico, che promuove la coagulazione delle proteine. Il metabolismo del lattosio richiede un enzima specifico, la lattasi-florizina idrolasi (LPH, o semplicemente lattasi), che si trova principalmente sulle cellule epiteliali dell'intestino tenue. L'intolleranza al lattosio è una condizione genetica collegata alla mancanza della lattasi che colpisce il 70% della popolazione mondiale e il 90% di quella asiatica. L'intolleranza al lattosio causa, in seguito al consumo di latte e prodotti caseari, molti problemi gastrointestinali, come dolore, flatulenza, vomito e diarrea.

Di conseguenza, il mercato caseario richiede fortemente latte e prodotti caseari a basso contenuto o privi di lattosio. Poiché i prodotti della filiera del latte sono difficilmente sostituibili in quanto particolarmente ricchi di nutrienti (in primis il calcio), l'industria casearia ha sviluppato prodotti a basso contenuto di lattosio, come ad esempio il latte UHT (Ultra High Temperature), dolci a base di latte, latte condensato dolcificato, yogurt e latte in polvere. Il contenuto di lattosio di questi prodotti viene ridotto idrolizzando il lattosio per via enzimatica, utilizzando la lattasi, in quanto questo processo non altera significativamente le proprietà organolettiche del latte.

La misura precisa e accurata della concentrazione di lattosio è perciò una caratterizzazione fondamentale del latte e permette anche di controllare il processo di idrolisi di questo disaccaride nella preparazione di prodotti a basso contenuto di lattosio.

La quantificazione del lattosio nel latte e nei prodotti caseari può essere effettuata mediante diversi metodi analitici, come la gravimetria, la polarografia, metodi colorimetrici, enzimatici e cromatografici.

In questa prova, determineremo il contenuto di lattosio nel latte utilizzando un metodo colorimetrico, basato sulla formazione di un composto colorato per reazione di questo zucchero in condizioni opportune. Sebbene la natura del cromoforo non sia ancora del tutto chiarita, la formazione di un composto di color rosso-salmone per reazione del lattosio con ammoniaca in ambiente basico è stata scoperta nel 1901 a Copenhagen da Alfred Woehlk. Poiché questo test (a differenza dei saggi di Benedict e Fehling) permette di distinguere il lattosio dal glucosio, è stato utilizzato già a partire dal 1902 per rilevare il lattosio nelle urine di donne che avevano appena partorito. Lo sviluppo di questo test è risultato particolarmente importante in ambito medico, in quanto la presenza di lattosio nelle urine non risulta pericolosa, mentre quella del glucosio indica il diabete gestazionale. Nel 1945 il test è stato reso più affidabile da William Robert Fearon che, sostituendo l'ammoniaca con la metilammina, ottiene un composto di colore rosso-ciliegia. La procedura sviluppata da Fearon è stata quindi ottimizzata da Nickerson e collaboratori nel 1975 e su questa metodica è stata sviluppata la prova di oggi.

In questa prova preparerai 4 soluzioni a titolo noto (standard) di lattosio. Con ciascuna di esse preparerai il cromoforo di color rosso-ciliegia per reazione con la metilammina in ambiente basico e dalla misura dei valori di assorbanza a 540 nm preparerai la retta di taratura.

L'assorbanza di una soluzione dipende, infatti, in modo lineare dalla concentrazione del cromoforo alla lunghezza d'onda considerata, secondo l'equazione di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

dove A rappresenta l'assorbanza, ε è il coefficiente di assorbimento molare, b la lunghezza del cammino ottico della luce nel campione e c la concentrazione molare.

Misurerai, quindi, il contenuto di lattosio in un campione di latte. Inizialmente precipiterai le proteine e i grassi presenti nel latte utilizzando un reagente acido (acetato di zinco/acido fosfotungstico, ZAPT). In soluzione rimangono gli zuccheri e una quantità residua di proteine del siero, che vengono allontanate dalla successiva precipitazione dell'idrossido di zinco, secondo la reazione:



Tratterai la soluzione risultante dalla precipitazione degli zuccheri nello stesso modo delle soluzioni standard e, dal valore di assorbanza, tenendo conto delle diverse diluizioni successive, determinerai la concentrazione di lattosio.

Bibliografia

- D. Bressanini, *La scienza della pasticceria* (2014) Gribaudo editore, p. 96-139.
- S. Mullen Gilbert, *Did you hear about the explosion at the cheese factory? There was de brie everywhere!*, ChemMatters (2017) 7-9.

- P. Singh Rao, P. Singh, V. Sharma, S. Arora, *Traditional analytical approaches for lactose residues determination in lactose hydrolysed milks: A review*, LWT - Food Science and Technology 151 (2021) 112069.
- K. Ruppertsberg, S. Herzog, M. W. Kussler, I. Parchmann, *How to visualize the different lactose content of dairy products by Fearon's test and Woehlk test in classroom experiments and a new approach to the mechanisms and formulae of the mysterious red dyes*, Chemistry Teacher International 20190008 (2019) 1-11.
- W. R. Fearon, *The Detection of Lactose and Maltose by Means of Methylamine*, Analyst 67 (1942) 130.
- T. A. Nickerson, I. F. Vujicic, A. Y. Lin, *Colorimetric Estimation of Lactose and Its Hydrolytic Products*, Journal of Dairy Science 59 (1975) 386-391.

Reagenti

lattosio, latte
 soluzione acetato di zinco/acido fosfotungstico (ZAPT)¹
 soluzione acquosa di cloruro di metilammonio 50 g/L
 soluzione tampone glicina-NaOH²
 soluzione di Na₂SO₃ 10 g/L
 soluzione di NaOH 1 M
 ghiaccio

Trovi sul banco di lavoro

matraccio da 250 mL	2 bicchieri da 250 mL
matraccio da 200 mL	2 bicchieri da 50 mL
matraccio da 100 mL	cilindro graduato da 10 mL
2 matracci da 25 mL	imbuto per solidi
buretta da 50 mL	imbuto per liquidi
supporto per buretta	imbuto piccolo
4 bottiglie da 250 (o 500) mL	anello per imbuto (o pinza)
pipetta tarata da 20 mL	7 provette
pipetta graduata da 20 mL	portaprovette
pipetta tarata da 5 mL	pipette pasteur
propipetta	tettarella
2 pipette contagocce	2 cuvette di plastica
navicella per pesata	4 dischi di carta da filtro

¹ Preparazione della soluzione ZAPT. Sciogliere 25.0 g di acetato di zinco e 12.5 g di acido fosfotungstico in acqua. Aggiungere 20 mL di acido acetico glaciale e diluisci a 100 mL.

² Preparazione della soluzione tampone glicina-NaOH. Mescolare 150 mL di soluzione di glicina contenente 2.5 g di glicina e 1.9 g di NaCl con 850 mL di NaOH 0.385 M.

bacchetta di vetro
contenitore per il ghiaccio

foglio di alluminio
foglio di carta millimetrata

Dotazione comune (per ciascun laboratorio)

propipetta
2 pipette contagocce
pipetta tarata da 5 mL

pennarello
bilancia analitica

Strumentazione

bagno riscaldante
spettrofotometro UV-vis

Uso della buretta:

non applicare forze laterali eccessive alla buretta: si può rompere facilmente. Fa particolare attenzione quando agisci sul rubinetto: giralo con una mano, afferrando con l'altra mano la buretta, poco lontano dal rubinetto, per tenerla ferma ed avere un controllo migliore. Il rubinetto deve girare senza eccessiva resistenza. In caso di difficoltà chiama un assistente. Prima di iniziare una titolazione non devono esserci bolle d'aria tra il rubinetto e il becco della buretta, né all'interno della buretta. Per rimuoverle, con la buretta piena apri rapidamente per qualche istante il rubinetto al massimo e richiudilo subito. Se necessario ripeti questa operazione qualche volta evitando però di sprecare troppa soluzione.

Non è necessario riempire completamente la buretta per avvinarla, basta usare alcuni mL di soluzione!

Rischio chimico:

Prima di eseguire le operazioni, leggi attentamente la procedura sperimentale e gli estratti delle schede di sicurezza dei reagenti che utilizzerai. Usa sempre camice, guanti e occhiali di sicurezza. Non entrare in contatto diretto con i reagenti ed evita di toccarti gli occhi.



1 Estratti delle schede di sicurezza dei reagenti

1.1 *Lattosio monoidrato*



SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2.2 Elementi dell'etichetta

Sostanza o miscela non pericolosa.

2.3 Altri pericoli

Questa sostanza/miscela non contiene componenti considerati sia persistenti, bioaccumulabili che tossici (PBT), oppure molto persistenti e molto bioaccumulabili (vPvB) a concentrazioni di 0.1% o superiori.

1.2 *Acetato di Zinco*



SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4), H302

Lesioni oculari gravi (Categoria 1), H318

Pericolo a lungo termine (cronico) per l'ambiente acquatico (Categoria 2), H411

Per quanto riguarda il testo completo delle indicazioni di pericolo menzionate in questo paragrafo, riferirsi al paragrafo 16.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo	
H302	Nocivo se ingerito.
H318	Provoca gravi lesioni oculari.
H411	Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
Consigli di prudenza	
P264	Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso.
P270	Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare proteggere gli occhi/ proteggere il viso.
P301 + P312	IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/ un medico.
P305 + P351 + P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
Descrizioni supplementari del rischio	nessuno(a)

1.3 Soluzione di acido fosforico al 10%





SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Corrosione cutanea (Sottocategoria 1C), H314

Lesioni oculari gravi (Categoria 1), H318

Pericolo a lungo termine (cronico) per l'ambiente acquatico (Categoria 3), H412

Etichettatura ridotta (<= 125 ml)

Pittogramma



Avvertenza

Pericolo

Indicazioni di pericolo

H314

Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.

H412

Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Consigli di prudenza

P280

Indossare guanti/ indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso/ proteggere l'udito.

P303 + P361 + P353

IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciugare la pelle.

P304 + P340 + P310

IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/ un medico.

P305 + P351 + P338

IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.

P363

Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.

Descrizioni supplementari del rischio

nessuno(a)

1.4 Soluzione di metilammina cloridrato





SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Tossicità acuta, Orale (Categoria 4), H302

Per quanto riguarda il testo completo delle indicazioni di pericolo menzionate in questo paragrafo, riferirsi al paragrafo 16.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza

Attenzione

Indicazioni di pericolo
H302

Nocivo se ingerito.

Consigli di prudenza
P264
P270
P301 + P312

Lavare accuratamente la pelle dopo l'uso.
Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso.
IN CASO DI INGESTIONE: in presenza di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/ un medico.

P501

Smaltire il prodotto/ recipiente in un impianto d'eliminazione di rifiuti autorizzato.

Descrizioni supplementari del rischio nessuno(a)

Etichettatura ridotta (<= 125 ml)

Pittogramma



Avvertenza

Attenzione

Indicazioni di pericolo

nessuno(a)

Consigli di prudenza

nessuno(a)

Descrizioni supplementari del rischio

nessuno(a)

1.5 Glicina



SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2.2 Elementi dell'etichetta

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2.3 Altri pericoli

Questa sostanza/miscela non contiene componenti considerati sia persistenti, bioaccumulabili che tossici (PBT), oppure molto persistenti e molto bioaccumulabili (vPvB) a concentrazioni di 0.1% o superiori.

1.6 *Cloruro di sodio*



SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2.2 Elementi dell'etichetta

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2.3 Altri pericoli

Questa sostanza/miscela non contiene componenti considerati sia persistenti, bioaccumulabili che tossici (PBT), oppure molto persistenti e molto bioaccumulabili (vPvB) a concentrazioni di 0.1% o superiori.

1.7 *Soluzione di idrossido di sodio 1 M*



SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Classificazione secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Sostanze o miscele corrosive per i metalli (Categoria 1), H290

Corrosione cutanea (Sottocategoria 1B), H314

Lesioni oculari gravi (Categoria 1), H318

Per quanto riguarda il testo completo delle indicazioni di pericolo menzionate in questo paragrafo, riferirsi al paragrafo 16.

2.2 Elementi dell'etichetta

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo H290 H314	Può essere corrosivo per i metalli. Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
Consigli di prudenza P234 P280	Conservare soltanto nell'imballaggio originale. Indossare guanti/ indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso/ proteggere l'udito.
P303 + P361 + P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle.
P304 + P340 + P310	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/ un medico.
P305 + P351 + P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P363	Lavare gli indumenti contaminati prima di indossarli nuovamente.

1.8 Solfito di sodio



SEZIONE 2: identificazione dei pericoli

2.1 Classificazione della sostanza o della miscela

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2.2 Elementi dell'etichetta

Sostanza o miscela non pericolosa secondo la regolamentazione (CE) N. 1272/2008.

2 Procedura sperimentale

2.1 Preparazione della soluzione madre di lattosio

- Trasferisci circa 2.6 grammi di lattosio (pesati in modo esatto su bilancia analitica, utilizzando una navicella per pesata) in un matraccio da 200 mL utilizzando un imbuto. Riporta la quantità di lattosio pesato nel foglio risposte e calcola la concentrazione della soluzione madre di lattosio (Sezione CH.3).
- Lava la navicella e le pareti dell'imbuto con acqua deionizzata. Riempi con acqua il matraccio fino circa a metà e agita fino alla completa dissoluzione del solido.
- Porta a volume con acqua deionizzata, ovvero riempi il matraccio fino alla tacca. Agita per omogeneizzare la soluzione.

2.2 Preparazione delle soluzioni standard di lattosio (S1-S4)

- Utilizzando il pennarello, etichetta con le sigle "S1", "S2", "S3" e "S4" le 4 bottiglie a disposizione.
- Avvina la buretta con alcuni mL della soluzione madre di lattosio. Riempi la buretta con la soluzione madre di lattosio; controlla che non siano presenti bolle di aria, specialmente nella punta. Trasferisci con la buretta 10 mL di soluzione di lattosio nel matraccio da 250 mL. Non aprire completamente il rubinetto della buretta ma lascia gocciolare velocemente la soluzione.
- Porta a volume il matraccio con acqua deionizzata e agitalo per omogeneizzare la soluzione. Trasferisci la soluzione appena preparata nella bottiglia etichettata con la sigla "S1"; non è necessario che la soluzione sia trasferita quantitativamente (non si commettono errori se le pareti del matraccio rimangono bagnate).
- Lava il matraccio da 250 mL, che hai appena utilizzato, con acqua di rete e poi sciacqualo con alcuni mL di acqua deionizzata. Non è necessario asciugare il matraccio prima di continuare con la procedura.
- Ripeti la stessa procedura usata per S1 per preparare le soluzioni standard di lattosio a concentrazione superiore, da S2 a S4, utilizzando i volumi di soluzione madre di lattosio riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Volumi di soluzione madre di lattosio da utilizzare per la preparazione delle soluzioni standard. Il volume indicato viene utilizzato per preparare 250 mL di soluzione standard.

Soluzione standard	V soluzione madre (mL)
S1	10
S2	15
S3	20
S4	25

Nel foglio risposte (Sezione CH.4) calcola le concentrazioni delle soluzioni standard di lattosio preparate al punto 2.2.

2.3 Preparazione del campione di latte (campione L)

- Trasferisci 20 mL di latte in un matraccio da 25 mL utilizzando una pipetta tarata da 20 mL e un propipetta.
- Con una pipetta contagocce in plastica aggiungi di 2.5 mL di reagente ZAPT, che farà cagliare il latte. Porta a volume con acqua deionizzata e agita il matraccio per completare la reazione e omogeneizzare la miscela. Calcola nel foglio risposte (Sezione CH.5a) la diluizione che il campione ha subito in questo passaggio (passaggio 1) e la concentrazione di lattosio dopo la diluizione, assumendo che la concentrazione di lattosio nel campione di latte sia “ $C(\text{lattosio nel campione L})_{\text{iniziale}}$ ”.
- Posiziona un imbuto per liquidi su un sostegno. Piega a metà per due volte un disco di carta da filtro e aprilo in modo da ottenere un cono. Adagia il cono di carta all’interno dell’imbuto (non bagnare il filtro con acqua) e posiziona un bicchiere da 50 mL sotto l’imbuto stesso.
- Filtra la miscela attraverso il filtro di carta. Aspetta fino ad ottenere 5 mL di soluzione (filtrato); non è necessario attendere che la filtrazione sia completa. Trasferisci 5 mL di filtrato con una pipetta tarata da 5 mL in un matraccio da 100 mL.
- Misura 5 mL di una soluzione 1 M di NaOH con un cilindro graduato e trasferiscili nel matraccio da 100 mL; porta a volume con acqua deionizzata. Calcola nel foglio risposte (Sezione CH.5b) la diluizione che il campione ha subito in questo passaggio (passaggio 2) e la concentrazione di lattosio dopo la diluizione; esprimi la concentrazione di lattosio nel campione di latte sia rispetto alla concentrazione determinata nel passaggio 1 che rispetto alla “ $C(\text{lattosio nel campione L})_{\text{iniziale}}$ ”.
- Prepara un nuovo filtro di carta come descritto sopra (non bagnare il filtro con acqua) e filtra la miscela in un bicchiere da 50 mL. Non è necessario filtrare tutta la miscela di reazione: sono sufficienti circa 20 mL. Avvina con il filtrato la pipetta graduata da 20 mL, trasferisci 12,5 mL di quest’ultimo filtrato in un matraccio da 25 mL e porta a volume con acqua deionizzata. Calcola nel foglio risposte (Sezione CH.5c) la diluizione che il campione ha subito in questo passaggio (passaggio 3) e la concentrazione di lattosio dopo la diluizione; esprimi la concentrazione di lattosio nel campione di latte sia rispetto alla concentrazione determinata nel passaggio 2 che rispetto alla “ $C(\text{lattosio nel campione L})_{\text{iniziale}}$ ”.

2.4 Preparazione dei campioni per la misura spettrofotometrica

- La procedura va eseguita per il campione di latte preparato nella Sezione 2.3, per un campione di acqua deionizzata (che rappresenta il bianco per la misura spettrofotometrica, B) e per tutte le soluzioni standard di lattosio preparate nella Sezione 2.2.
- Complessivamente dovranno essere preparate 6 provette. Scrivi con il pennarello su ciascuna provetta il nome della soluzione corrispondente (L = latte, B = bianco, S1-S4 = standard 1-standard 4).
- Per le operazioni successive, ricordati di avvina ogni volta la pipetta da 5 mL con la soluzione del campione che devi determinare (incognito, standard o acqua deionizzata).

Trasferisci 5 mL di ogni campione in una provetta, riponila nel portaprovette e spostati sotto cappa.

- Sotto cappa, ripeti le seguenti operazioni per ognuno dei 6 campioni (incognito, bianco e S1-S5): aggiungi 5 mL di glicina/NaOH usando la pipetta tarata da 5 mL che trovi vicino alla soluzione, successivamente aggiungi 20 gocce di soluzione di metilammina (pari a 0.5 mL) e 20 gocce di soluzione di Na_2SO_3 (pari a 0.5 mL). Attenzione! le pipette per le aggiunte sono comuni per tutti i gruppi presenti in laboratorio: riponile vicino alla soluzione corrispondente dopo averle usate. Al termine delle aggiunte, mescola la soluzione con la bacchetta di vetro e riponi la provetta nel portaprovette. Lava la bacchetta con acqua ed asciugala con un pezzo di carta dopo ogni utilizzo.
- Riponi le 6 provette in un bicchiere da 250 mL e copri-le con un foglio di alluminio. Riempi il bicchiere con acqua deionizzata. Trasferisci le provette nel bagno riscaldante termostato a 65 °C, presente in ciascun laboratorio (chiedi a un istruttore).
- Lascia reagire esattamente per 25 minuti. Durante l'attesa, chiedi ad un istruttore di fornirti del ghiaccio, che trasferirai nel contenitore dedicato; esegui inoltre i calcoli riportati di seguito.

Trascorsi i 25 minuti, recupera le provette e raffreddale in un bagno a ghiaccio per 2 minuti. Assumendo che i volumi siano additivi, calcola il volume totale della soluzione in ciascuna provetta e riportalo nel foglio risposte (sezione CH.6a). Assumi che 20 gocce di soluzione acquosa corrispondano a 0.5 mL.

Calcola la concentrazione di lattosio di ciascuna soluzione standard nella rispettiva provetta, a partire dalle concentrazioni di lattosio calcolate nella sezione CH.4 e riportali nel foglio risposte (sezione CH.6b).

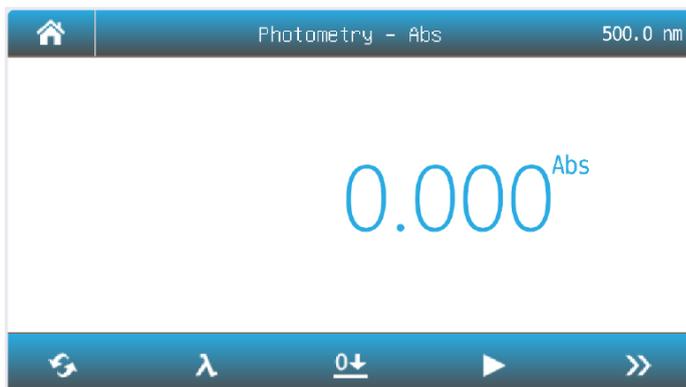
Considerando il volume totale del campione calcolato nella sezione CH.6, calcola la diluizione che il campione ha subito nella provetta e la concentrazione di lattosio sia rispetto alla concentrazione determinata nel passaggio 3 che rispetto alla " $C_{iniziale}$ ". Riporta i risultati nella sezione CH.7.

2.5 Misura spettrofotometrica ed elaborazione dei risultati

- Avvina una cuvetta per tre volte con un piccolo volume della soluzione del bianco e riempi-la fino a ca. 1 cm dal bordo. L'assorbanza di questa cuvetta dovrà essere misurata una sola volta, prima di tutti i campioni. Tuttavia, per sicurezza, conservala fino al termine delle misure.
- Avvina la seconda cuvetta per tre volte con un piccolo volume della soluzione di campione da misurare (ovvero gli standard S1-S4 o il campione di latte L) e riempi-la fino a ca. 1 cm dal bordo.
- Accendi lo spettrofotometro utilizzando il pulsante di accensione posto sul lato destro. Dalla schermata Home, avvia la funzione "Fotometria" premendo l'icona:



Otterrai la seguente schermata:



	Modo Seleziona la modalità di misura Assorbanza (Abs)/Trasmittanza (%T)/Energia (E)
	WL Imposta lunghezza d'onda
	Zero Effettua l'azzeramento 0Abs/100%T
	Misura Misura il campione e registra il dato nella Lista dei risultati
	Lista Visualizza la Lista dei risultati
	UP/Down Aumenta/Diminuisce il livello gain del segnale. Solo in modalità Energia

Assicurati che la modalità di misura sia “Assorbanza”, come indicato dall’acronimo “Abs”. Imposta la lunghezza d’onda della misura a 540 nm. Tutte le operazioni di azzeramento e di misura vanno effettuate con lo scomparto di misura chiuso.

- Inserisci nello spettrofotometro la cuvetta contenente il bianco e richiudi lo scomparto di misura. Azzerare lo strumento premendo l’icona:



Attenzione! l’azzeramento non va mai effettuato con lo scomparto di misura vuoto, ma sempre con la cuvetta del bianco inserita, altrimenti si compie un errore importante nella misura.

- Apri lo scomparto dello spettrofotometro, estrai la cuvetta contenente il bianco e inserisci la cuvetta contenente il campione da misurare. Richiudi il comparto di misura e registra l’assorbanza del campione a 540 nm premendo l’icona:



- Riporta il valore di assorbanza misurato per il campione nel foglio risposte (sezione CH.8).
- Svuota la cuvetta contenente il campione e avvinala per tre volte con un piccolo volume del nuovo campione da misurare. Misura il campione come descritto nel punto precedente. Ripeti la procedura per ognuna delle soluzioni standard rimanenti e per il campione di latte, L.
- Verifica di aver riportato tutti i valori di assorbanza misurati per le soluzioni standard S1-S4 e per il campione di latte L nel foglio risposte (sezione CH.8).
- Costruisci la retta di taratura del metodo spettrofotometrico, riportando in un diagramma cartesiano i valori di assorbanza misurati per le soluzioni standard in funzione dei valori di concentrazione corrispondenti calcolati nella sezione CH.6b. Riporta i risultati nel foglio risposte (sezione CH.9).
- Utilizzando il valore di assorbanza misurato per il campione di latte L e la retta di taratura riportata nella sezione CH.9, ricava la concentrazione di lattosio nella provetta. Riporta il risultato nel foglio risposte (sezione CH.10).
- Ricava la concentrazione di lattosio nel campione di latte L, seguendo le istruzioni riportate nel foglio risposte (sezione CH.11).

Durante la prova, il tuo collega Biologo preparerà, mediante idrolisi enzimatica, un campione di latte con un contenuto ridotto di lattosio (campione LR), a partire dallo stesso latte intero che hai utilizzato in questa esperienza (campione L). Misura il contenuto di lattosio in questo nuovo campione di latte, LR, seguendo il procedimento descritto nei paragrafi 2.3, 2.4 e 2.5.

- Riporta l'assorbanza misurata per questo campione nel foglio risposte (sezione CH.12).
- Utilizzando il valore di assorbanza misurato per il campione di latte LR e la retta di taratura riportata nella sezione CH.9, ricava la concentrazione di lattosio nella provetta. Riporta il risultato nel foglio risposte (sezione CH.13).
- Ricava la concentrazione di lattosio nel campione di latte LR, seguendo le istruzioni riportate nel foglio risposte (sezione CH.14).