

---

# Norme internationale



# 8069

---

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

---

## Lait sec — Détermination de la teneur en acide lactique et en lactates — Méthode enzymatique

*Dried milk — Determination of lactic acid and lactates content — Enzymatic method*

Première édition — 1986-06-01  
Corrigée et réimprimée — 1988-01-15

STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 8069:1986](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2762e263-8e64-4912-bc31-f0e74156857b/iso-8069-1986)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2762e263-8e64-4912-bc31-f0e74156857b/iso-8069-1986>

---

CDU 637.143 : 634.04

Réf. n° : ISO 8069-1986 (F)

Descripteurs : produit agricole, produit laitier, lait, lait en poudre, analyse chimique, dosage, acide lactique, lactate.

Prix basé sur 4 pages

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 8069 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*. Elle annule et remplace la Norme internationale ISO 3495-1975.

[ISO 8069:1986](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2762e263-8e64-4912-bc31-)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2762e263-8e64-4912-bc31->

NOTE — La méthode spécifiée dans la présente Norme internationale a été élaborée conjointement avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'Association des chimistes analytiques officiels (AOAC) et sera également publiée par ces organisations.

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

# Lait sec — Détermination de la teneur en acide lactique et en lactates — Méthode enzymatique

## 1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode enzymatique de détermination de la teneur en acide lactique et en lactates, applicable à tous les types de laits secs.

## 2 Référence

ISO 707, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage*.

## 3 Définition

**teneur en acide lactique et en lactates du lait sec**: Teneur des substances déterminées par le mode opératoire spécifié dans la présente Norme internationale et exprimée en milligrammes d'acide lactique pour 100 g de solides non gras.

## 4 Principe <sup>1)</sup>

Dissolution du lait sec dans l'eau chaude. Précipitation de la matière grasse et des protéines, suivie d'une filtration. Traitement du filtrat avec les enzymes et substances biochimiques suivantes, ajoutées simultanément, mais agissant successivement :

- L-lactate déshydrogénase (L-LDH) et D-lactate déshydrogénase (D-LDH) en présence de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) pour oxyder le lactate en pyruvate et transformer le NAD en sa forme réduite (NADH) ;
- glutamate pyruvate transaminase (GPT) en présence de L-glutamate pour transformer le pyruvate en L-alanine et transformer le L-glutamate en  $\alpha$ -cétoglutarate.

Mesure spectrométrique, à une longueur d'onde de 340 nm, pour déterminer la quantité de NADH produite, qui est proportionnelle à la teneur en acide lactique et en lactates.

## 5 Réactifs

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique reconnue. L'eau utilisée dans la préparation des solutions d'enzymes doit être d'une pureté au moins équivalente à celle de l'eau distillée

doublément dans du verre et l'eau utilisée pour les autres usages doit être de l'eau distillée dans du verre ou d'une pureté au moins équivalente.

### 5.1 Hexacyanoferrate(II) de potassium, solution.

Dissoudre 35,9 g d'hexacyanoferrate(II) de potassium trihydraté ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ ) dans l'eau, diluer à 1 000 ml et mélanger.

### 5.2 Sulfate de zinc, solution.

Dissoudre 71,8 g de sulfate de zinc heptahydraté ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) dans l'eau, diluer à 1 000 ml et mélanger.

### 5.3 Hydroxyde de sodium, solution à 0,1 mol/l.

Dissoudre 4,00 g d'hydroxyde de sodium (NaOH), diluer à 1 000 ml et mélanger.

### 5.4 Solution tampon, de pH 10.

Dissoudre 7,92 g de glycylglycine ( $C_4H_8N_2O_3$ ) et 1,47 g d'acide L-glutamique ( $C_5H_9NO_4$ ) dans environ 80 ml d'eau. Ajuster le pH à  $10,0 \pm 0,1$  à 20 °C avec une solution d'hydroxyde de sodium à 10 mol/l, diluer à 100 ml avec de l'eau et mélanger.

Cette solution peut se garder pendant 3 mois si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 et +5 °C.

### 5.5 NAD, solution.

Dissoudre 350 mg de nicotinamide adénine dinucléotide ( $C_{22}H_{27}N_7O_{14}P_2$ ) dans 10 ml d'eau.

Cette solution peut se garder pendant 4 semaines si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 et +5 °C.

Lors de l'utilisation de la solution, le récipient doit être conservé dans la glace pilée.

1) Cette méthode est principalement basée sur *Méthodes d'analyse enzymatique des produits alimentaires — Méthode UV de détermination de l'acide L-lactique et de l'acide D-lactique dans les aliments*, Boehringer Mannheim GmbH.

**5.6 L-LDH**, extrait du muscle du porc, solution à 10 mg/ml dans le glycérol à 50 % (V/V), de pH 7 environ.

L'activité spécifique de la solution de L-lactate déshydrogénase (L-LDH, EC 1.1.1.27)<sup>1)</sup> doit être d'au moins 5 500 unités/ml<sup>2)</sup> (à 25 °C).

La solution peut se garder pendant 12 mois si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 et +5 °C.

Lors de l'utilisation de la solution, le récipient doit être conservé dans la glace pilée.

**5.7 D-LDH**, provenant du *Lactobacillus leichmannii*, suspension à 5 mg/ml dans une solution de sulfate d'ammonium à 3,2 mol/l, de pH 6 environ.

L'activité spécifique de la suspension de D-lactate déshydrogénase (D-LDH, EC 1.1.1.28) doit être d'au moins 1 500 unités/ml (à 25 °C).

La suspension peut se garder pendant 12 mois, si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 et +5 °C.

Lors de l'utilisation de la suspension, le récipient doit être conservé dans la glace pilée.

**5.8 GPT**, extrait du cœur du porc, suspension à 20 mg/ml, dans une solution de sulfate d'ammonium à 3,2 mol/l de pH 7 environ.

L'activité spécifique de la suspension de glutamate pyruvate transaminase (GPT, EC 2.6.1.2) doit être d'au moins 1 600 unités/ml (à 25 °C).

Centrifuger 2 ml d'une suspension contenant 10 mg/ml de GPT pendant 10 min, à environ 4 000 g, aspirer 1,0 ml de surnageant clair et l'éliminer.

La suspension peut se garder pendant 12 mois si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 et +5 °C.

Lors de l'utilisation de la suspension, le récipient doit être conservé dans la glace pilée.

**5.9 L-lactate de lithium**, solution.

Dissoudre 50 mg de L-lactate de lithium (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Li) dans l'eau, diluer à 500 ml et mélanger.

**5.10 D-lactate de lithium**, solution.

Dissoudre 50 mg de D-lactate de lithium (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>3</sub>Li) dans l'eau, diluer à 500 ml et mélanger.

## 6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire, et notamment

**6.1 Balance analytique.**

**6.2 Bécher**, en verre, de 50 ml de capacité.

**6.3 Éprouvette graduée**, de 50 ml de capacité.

**6.4 Fioles jaugées à un trait**, de 100 ml de capacité.

**6.5 Pipettes**, permettant de délivrer 0,02; 0,05; 0,2; 1 et 2 ml.

**6.6 Pipettes graduées**, de 5 et 10 ml de capacité, graduées en 0,1 ml.

**6.7 Entonnoir en verre**, d'environ 7 cm de diamètre.

**6.8 Papier filtre**, à filtration moyenne, d'environ 15 cm de diamètre, exempt d'acide lactique et de lactates.

**6.9 Baguette de verre.**

**6.10 Palettes en plastique**, permettant de mélanger le mélange enzyme-échantillon dans la cuve du spectromètre.

**6.11 Spectromètre** permettant d'opérer à 340 nm, équipé de cuves de 1 cm d'épaisseur.

## 7 Échantillonnage

**7.1** Voir ISO 707.

**7.2** Conserver l'échantillon de façon à éviter toute détérioration et toute modification de composition.

## 8 Mode opératoire

**ATTENTION** — Éviter les contaminations, spécialement celles dues à la sueur.

### 8.1 Vérification de l'activité des réactifs

Si un nouveau lot de réactifs (5.5 à 5.8 inclus) est utilisé, si de tels réactifs ont été conservés au réfrigérateur sans avoir été utilisés pendant plus de deux semaines, si le travail analytique recommence après une période d'inactivité ou si les conditions peuvent le justifier, l'essai suivant de récupération des lactates doit être effectué.

1) Le nombre EC se réfère au nombre de classification des enzymes, tel qu'il a été donné par le comité de nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie dans *Recommandations pour la nomenclature des enzymes* (1978). Academic Press, New York, 1979.

2) Cette unité (souvent appelée unité internationale ou unité standard) est définie comme étant la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser la transformation de 1 µmol de substrat par minute dans les conditions standards.

**8.1.1** Introduire, à la pipette, 10 ml de la solution de L-lactate de lithium (5.9) dans chacune des deux fioles jaugées de 100 ml (6.4) et 10 ml de la solution de D-lactate de lithium (5.10) dans deux fioles jaugées de 100 ml (6.4) et déterminer la teneur en acide L-lactique et lactates et la teneur en acide D-lactique et lactates des solutions, respectivement, dans les deux premières et les deux dernières fioles, conformément au mode opératoire décrit de 8.5.2 à 8.6 inclus.

**8.1.2** Calculer la teneur en lactate de lithium, exprimée en milligrammes par litre, à l'aide des formules :

$341 \times A$  pour la solution de L-lactate et

$346 \times A$  pour la solution de D-lactate

où  $A$  est l'absorbance à 340 nm, calculée selon 8.6.4.

**8.1.3** Compte tenu de la pureté de la préparation, respectivement de L- et de D-lactate de lithium, la récupération du L- ou du D-lactate de lithium dans chacune des fioles doit être de  $100 \pm 5\%$ . Si les récupérations ne se situent pas dans cette plage, les réactifs, la technique utilisée, la précision des pipettes et les conditions d'utilisation du spectromètre, doivent être vérifiés et les corrections adéquates effectuées pour obtenir les résultats appropriés. L'essai doit être répété jusqu'à obtention de résultats satisfaisants.

## 8.2 Préparation de l'échantillon pour essai

Transférer l'échantillon dans un récipient, ayant une capacité environ double du volume de l'échantillon et muni d'un couvercle étanche à l'air. Fermer immédiatement le récipient et mélanger soigneusement l'échantillon par des agitations et des retournements répétés du récipient.

Pendant la préparation, éviter autant que possible d'exposer l'échantillon à l'air, de façon à minimiser l'adsorption d'eau.

## 8.3 Prise d'essai

Peser, à 1 mg près, 1 g de l'échantillon pour essai dans le bécher (6.2).

## 8.4 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc en procédant comme spécifié en 8.5 et 8.6, en utilisant tous les réactifs, mais en omettant la prise d'essai.

## 8.5 Préparation de la solution et déprotéination

**8.5.1** Dissoudre la prise d'essai (8.3) dans environ 20 ml d'eau chaude (40 à 50 °C), en s'aidant de la baguette de verre (6.9). Verser quantitativement le contenu du bécher dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (6.4), en rinçant avec de l'eau. Refroidir le contenu de la fiole à environ 20 °C.

**8.5.2** Ajouter à la solution (8.5.1) dans l'ordre suivant : 5,0 ml de la solution d'hexacyanoferrate(II) de potassium (5.1), 5,0 ml de la solution de sulfate de zinc (5.2) et 10,0 ml de la solution

d'hydroxyde de sodium (5.3), en mélangeant soigneusement après chaque addition. Diluer à 100 ml avec de l'eau, mélanger soigneusement et laisser reposer le mélange pendant 30 min.

**8.5.3** Filtrer sur papier filtre (6.8), et éliminer les premières fractions de filtrat.

## 8.6 Détermination

**8.6.1** Introduire à la pipette, dans une cuve du spectromètre (voir 6.11)

1,0 ml de filtrat (8.5.3) ;

1,0 ml de la solution tampon (5.4) ;

0,20 ml de la solution de NAD (5.5) ;

0,02 ml de la suspension de GPT (5.8).

Mélanger le contenu de la cuve à l'aide de la palette en plastique (6.10).

**8.6.2** 5 min après avoir mélangé le contenu de la cuve, mesurer l'absorbance de la solution d'essai par rapport à l'eau, à une longueur d'onde de 340 nm. Ajouter dans la cuve, 0,02 ml de suspension de L-LDH (5.6) et 0,05 ml de suspension de D-LDH (5.7). Mélanger à nouveau avec la palette en plastique et laisser reposer à la température du laboratoire.

NOTE — La teneur en acide L- ou D-lactique et en lactates peut être déterminée séparément par ajout, soit de L-LDH, soit de D-LDH.

**8.6.3** Mesurer, 45 min et 60 min après l'addition de la (des) suspension(s) de LDH, l'absorbance de la solution d'essai par rapport à l'eau.

NOTE — Quand seulement l'acide L-lactique et les lactates sont mesurés, l'absorbance peut être déterminée après, respectivement, 30 et 45 min.

**8.6.4** Calculer l'absorbance  $A$  à utiliser pour le calcul (9.1) au moyen de la formule

$$\frac{[(A_{s60} - A_{s0}) - 4(A_{s60} - A_{s45})] - [(A_{b60} - A_{b0}) - 4(A_{b60} - A_{b45})]}{3}$$

où

$A_{s60}$  est l'absorbance de la solution d'essai, mesurée après 60 min en 8.6.3 ;

$A_{s0}$  est l'absorbance de la solution d'essai, mesurée en 8.6.2 ;

$A_{s45}$  est l'absorbance de la solution d'essai, mesurée après 45 min en 8.6.3 ;

$A_{b60}$  est l'absorbance de la solution d'essai à blanc, mesurée après 60 min en 8.6.3 ;

$A_{b0}$  est l'absorbance de la solution d'essai à blanc, mesurée en 8.6.2 ;

$A_{b45}$  est l'absorbance de la solution d'essai à blanc, mesurée après 45 min en 8.6.3.

## NOTES

1 Une réaction secondaire se développant lentement, peut parfois se produire. L'influence sur l'absorbance de cette réaction secondaire, peut être éliminée par extrapolation de l'absorbance au temps zéro.

2 Lorsque l'absorbance est mesurée après, respectivement, 30 min et 45 min, la formule est alors :

$$\frac{[(A_{s45} - A_{s0}) - 3(A_{s45} - A_{s30})] - [(A_{b45} - A_{b0}) - 3(A_{b45} - A_{b30})]}{0,001}$$

où

$A_{s30}$  est l'absorbance de la solution d'essai, mesurée après 30 min en 8.6.3;

$A_{b30}$  est l'absorbance de la solution d'essai à blanc, mesurée après 30 min en 8.6.3.

**8.6.5** Si l'augmentation d'absorbance dépasse 0,500, répéter le mode opératoire spécifié de 8.6.1 à 8.6.4 inclus, en utilisant une dilution aqueuse appropriée du filtrat de la prise d'essai (8.5.3) et du blanc (8.4).

## 9 Expression des résultats

### 9.1 Mode de calcul et formule

La teneur en acide lactique et lactates, exprimée comme acide lactique, en milligrammes pour 100 g de solides non gras, est égale à

$$\frac{AM_r}{\kappa l m} \times \frac{V_1 V_4 V_5}{V_2 V_3} \times \frac{100}{W_{nfs}} \times 10^5$$

où

$A$  est l'absorbance à 340 nm, calculée selon 8.6.4;

$M_r$  est la masse moléculaire relative de l'acide lactique (90,1);

$\kappa$  est le coefficient d'absorption molaire du NADH à 340 nm, c'est-à-dire  $6,3 \times 10^6$  cm<sup>2</sup>/mol;

$l$  est l'épaisseur, en centimètres, des cuves du spectromètre (1 cm);

$m$  est la masse, en grammes, de la prise d'essai (8.3);

$V_1$  est le volume total, en millilitres, du liquide dans la cuve du spectromètre (voir 8.6.2);

NOTE —  $V_1 = 2,29$  ml, quand les acides L- et D-lactiques et les lactates sont déterminés;

$V_1 = 2,24$  ml, quand seulement l'acide L-lactique et les lactates sont déterminés;

$V_1 = 2,27$  ml quand seulement l'acide D-lactique et les lactates sont déterminés.

$V_2$  est le volume, en millilitres, du filtrat (voir 8.5.3) dans la cuve du spectromètre (voir 8.6.4);

$V_3$  est le volume, en millilitres, du filtrat (voir 8.5.3) prélevé pour la dilution (voir 8.6.5) si nécessaire;

$V_4$  est le volume, en millilitres, de la solution en 8.5.2 (c'est-à-dire 100 ml);

$V_5$  est le volume, en millilitres, auquel la solution d'essai a été diluée (voir 8.6.5), si nécessaire;

$W_{nfs}$  est la teneur, exprimée en pourcentage en masse, en solides non gras de l'échantillon.

Donner la teneur en acide lactique et en lactates, à 1 mg près pour 100 g de solides non gras.

## 9.2 Fidélité

NOTE — Les valeurs de répétabilité et de reproductibilité proviennent des résultats d'un essai interlaboratoire effectué conformément à l'ISO 5725.

### 9.2.1 Répétabilité

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste utilisant le même appareillage, ne doit pas excéder 10 mg/100 g de solides non gras, si la moyenne arithmétique de la teneur en acide lactique et en lactates est inférieure ou égale à 60 mg/100 g de solides non gras et 15 % de la moyenne arithmétique des résultats, si la teneur en acide lactique et en lactates est supérieure à 60 mg/100 g de solides non gras.

### 9.2.2 Reproductibilité

La différence entre deux résultats individuels et indépendants obtenus par deux analystes différents travaillant dans des laboratoires différents sur un produit identique, ne doit pas excéder 15 mg/100 g de solides non gras, si la moyenne arithmétique de la teneur en acide lactique et en lactates est inférieure ou égale à 100 mg/100 g de solides non gras, et 20 % de la moyenne arithmétique des résultats, si la teneur en acide lactique et en lactates est supérieure à 100 mg/100 g de solides non gras.

## 10 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats. Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 8069:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2762e263-8e64-4912-bc31-f0e74156857b/iso-8069-1986>

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 8069:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2762e263-8e64-4912-bc31-f0e74156857b/iso-8069-1986>