

NORME
INTERNATIONALE

ISO
11816-2

FIL
155-2

Première édition
2003-02-01

**Lait et produits laitiers — Détermination
de l'activité de la phosphatase alcaline —
Partie 2:
Méthode fluorimétrique pour le fromage**

*Milk and milk products — Determination of alkaline phosphatase
activity —
Part 2: Fluorometric method for cheese*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11816-2:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/965d2160-a7a9-4815-b314-1933870c99e7/iso-11816-2-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/965d2160-a7a9-4815-b314-1933870c99e7/iso-11816-2-2003>



Numéros de référence
ISO 11816-2:2003(F)
FIL 155-2:2003(F)

© ISO et FIL 2003

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO et la FIL déclinent toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 11816-2:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/965d2160-a7a9-4815-b314-1933870c99e7/iso-11816-2-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/965d2160-a7a9-4815-b314-1933870c99e7/iso-11816-2-2003>

© ISO et FIL 2003

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit soit de l'ISO soit de la FIL à l'adresse respective ci-après.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Fédération Internationale de Laiterie
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Avant-propos ISO

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 en général 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. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155 peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 11816-2 | FIL 155-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération Internationale de Laiterie (FIL), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément, par l'AOAC International.

ISO 11816-2:2003

L'ISO 11816 | FIL 155 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline*.

- *Partie 1: Méthode fluorimétrique pour le lait et les boissons à base de lait*
- *Partie 2: Méthode fluorimétrique pour le fromage*
- *Partie 3: Méthode par photoactivation enzymatique pour le lait et les boissons à base de lait*

Le titre actuel de la Partie 1 de l'ISO 11816 (FIL 155) est *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide de la méthode fluorimétrique — Partie 1: Lait et boissons à base de lait*. Celui-ci sera modifié conformément au titre retenu ci-dessus lors de la prochaine révision de cette partie.

Avant-propos FIL

La **FIL (Fédération Internationale de Laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO et avec l'AOAC International pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyses et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux votants.

L'ISO 11816-2|FIL 155-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération Internationale de Laiterie (FIL), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément, par l'AOAC International.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO/FIL/AOAC, *Caractérisation du lait et produits laitiers conformément au traitement thermique*, du Comité permanent chargé des *Composants mineurs du lait et de la caractérisation des propriétés physiques*, sous la conduite de son chef de projet, M^{me} E. Lechner (DE).

iTeh STANDARD PREVIEW

L'ISO 11816|FIL 155 comprend les parties suivantes présentées sous le titre général *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline*:

- *Partie 1: Méthode fluorimétrique pour le lait et les boissons à base de lait*
- *Partie 2: Méthode fluorimétrique pour le fromage*
- *Partie 3: Méthode par photoactivation enzymatique pour le lait et les boissons à base de lait*

Le titre actuel de la Partie 1 de l'ISO 11816 (FIL 155) est *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide de la méthode fluorimétrique — Partie 1: Lait et boissons à base de lait*. Celui-ci sera modifié conformément au titre retenu ci-dessus lors de la prochaine révision de cette partie.

Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline —

Partie 2: Méthode fluorimétrique pour le fromage

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155 spécifie une méthode fluorimétrique de détermination de l'activité de la phosphatase alcaline dans le fromage.

Cette méthode est également applicable aux fromages à pâte molle et demi-dure et permet de faire la distinction entre les fromages au lait cru et les fromages au lait pasteurisé, à condition que la moisissure ne soit présente que sur la surface et ne soit pas propagée à l'intérieur, comme dans le cas des fromages veinés de bleu, par exemple. Cette méthode peut également être employée pour vérifier la validité de la pasteurisation du fromage ou de la matière première.

Les gros fromages à pâte dure où le mélange de caillé et de lactosérum est chauffé à des températures supérieures à 50 °C conservent des températures élevées pendant une durée relativement longue. Cela est notamment le cas en leurs centres, ce qui produit l'inactivation de la phosphatase. Pour faire la distinction entre les fromages à pâte dure au lait cru et ceux au lait pasteurisé, cette méthode nécessite une technique spécifique d'échantillonnage pour le fromage (voir l'Article 7).

2 Référence normative

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 11816-1, *Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline à l'aide de la méthode fluorimétrique — Partie 1: Lait et boissons à base de lait*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1 activité de la phosphatase alcaline PAL

activité de la phosphatase alcaline présente dans le produit, déterminée suivant le mode opératoire décrit dans la présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155

NOTE L'activité de la phosphatase alcaline est exprimée en milliunités d'activité d'enzyme par gramme.

3.2
unité d'activité de la phosphatase alcaline
quantité d'enzyme phosphatase alcaline qui catalyse la transformation de 1 µmol de substrat par minute et par gramme d'échantillon

4 Principe

En présence de phosphate alcaline, un substrat d'ester monophosphorique non fluorescent (Fluorophos®) est hydrolysé à $38\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ sur une période de trois minutes pour former un produit hautement fluorescent (Fluoroyellow®). La quantité de Fluoroyellow est mesurée à l'aide d'un fluorimètre étalonné et l'activité de la phosphatase alcaline est calculée.

NOTE Bien que l'essai dure trois minutes, la première minute est une période de stabilisation permettant de s'assurer que l'échantillon est à 38 °C . Les mesurages d'activité sont en fait effectués du début de la deuxième minute à la fin de la troisième minute (c'est-à-dire sur une période de deux minutes).

5 Réactifs

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de pureté équivalente.

5.1 Substrat Fluorophos¹⁾, cristallisé, $M = 580\text{ g/mol}$.

NOTE Le substrat Fluorophos est un ester monophosphorique aromatique non fluorescent, soluble dans l'eau.

5.2 Solution tampon de substrat: solution tampon de diéthanolamine (DEA) ($c = 2,4\text{ mol/l}$), avec un pH 10,0.

5.3 Substrat de travail <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/965d2160-a7a9-4815-b314-1933870c99e7/iso-11816-2-2003>

Ajouter un volume de solution tampon de substrat (5.2) au substrat Fluorophos (5.1) afin d'obtenir une concentration de substrat Fluorophos de $c = 1,044\text{ mmol/l}$. Bien mélanger en retournant le récipient.

Utiliser du verre ambré pour protéger de la lumière.

Si le «Fluorophos Test System» est utilisé, ajouter le contenu d'une bouteille de solution tampon de substrat (5.2) à une bouteille de substrat Fluorophos (5.1). Bien mélanger en retournant le récipient.

5.4 Solutions étalons de travail, Fluoroyellow dans la solution tampon à la diéthanolamine (DEA).

5.4.1 Solution étalon A (blanc), contenant 0 µmol/l de Fluoroyellow.

5.4.2 Solution étalon B, contenant $17,24 \times 10^{-3}\text{ µmol/l}$ de Fluoroyellow.

5.4.3 Solution étalon C, contenant $34,48 \times 10^{-3}\text{ µmol/l}$ de Fluoroyellow.

5.5 Lait, préchauffé à 95 °C pendant une minute et refroidi à température ambiante.

1) Les réactifs spécifiés en 5.1 à 5.4 et les appareils spécifiés en 6.1 à 6.4 (sauf 6.3.3) sont disponibles sous l'appellation «Fluorophos Test System» et commercialisés par la société Advanced Instruments Inc., Two Technology Way, Norwood, Massachusetts 02062, USA. Fluorophos et Fluoroyellow sont des marques déposées de la société Advanced Instruments Inc. et sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155 et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

- 6.1 Fluorimètre à filtre¹⁾**, avec support de cuvette à contrôle thermostatique pouvant être maintenu à $38\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et permettant une excitation à une longueur d'onde de 440 nm et une émission à 560 nm.
- 6.2 Cuvettes**, en verre non fluorescent, de 12 mm de diamètre et de 75 mm de longueur.
- 6.3 Pipettes.**
- 6.3.1 Pipette distributrice, à volume fixe**, permettant de délivrer 2,0 ml.
- 6.3.2 Pipette à déplacement positif**, de 0,075 ml de capacité.
- 6.3.3 Pipettes**, de 1 ml et 2 ml de capacité (pour les étalons).
- 6.4 Bloc d'incubation**, pouvant être maintenu à $38\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, utilisable avec les cuvettes.
- 6.5 Parafilm²⁾** ou autre film approprié de qualité pour laboratoire.
- 6.6 Fioles jaugées** de 10 ml et de 25 ml de capacité.
- 6.7 Bain-marie**, pouvant être maintenu à $63\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- 6.8 Tube Potter ou Ultra Turrax³⁾**.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7 Échantillonnage

ISO 11816-2:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/965d2160-a7a9-4815-b314-4953870c99c7/iso-11816-2-2003>

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport ou du stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707.

Cependant, l'ISO 707 n'est pas applicable dans le cas des gros fromages à pâte dure fabriqués avec du lait cru car l'activité de la phosphatase alcaline (PAL) varie à l'intérieur du fromage. L'activité de la phosphatase alcaline (PAL) peut être élevée dans la partie extérieure de la meule de fromage (de 0 cm à 4 cm sous la croûte du bord arrondi), mais très faible à nulle au centre de la meule. C'est pourquoi il convient de prélever les échantillons de fromages à pâte dure entre 2 cm et 3 cm sous la croûte du bord arrondi.

2) Parafilm est un exemple de produit approprié, disponible dans le commerce.

3) Ultra Turrax est un exemple de produit approprié, disponible dans le commerce.

Ces informations sont données à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155 et ne signifient nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

8.1 Généralités

Retirer la croûte ou la surface de l'échantillon d'essai avec un couteau propre. S'assurer que l'échantillon d'essai n'est pas contaminé par des micro-organismes de surface pendant sa préparation. Broyer l'échantillon d'essai à l'aide d'un moulin ou de tout autre dispositif approprié et bien mélanger. Conserver l'échantillon ainsi préparé dans un récipient étanche à l'air. Effectuer l'essai sur l'échantillon le jour même ou le garder au congélateur.

8.2 Fromage au lait pasteurisé

8.2.1 Peser, à 1 mg près, dans un bécher en verre de 25 ml, une quantité de l'échantillon d'essai préparé (8.1) allant de 0,3 mg à 0,5 mg. Ajouter de 1 ml à 2 ml du lait préparé (5.5) et mélanger vigoureusement avec un pilon en verre pour obtenir une pâte. Laisser les fromages à pâte dure tremper suffisamment dans le liquide ou les prétraiter conformément à la procédure alternative décrite en 8.2.2.

Ajouter du lait (5.5) par doses de 1 ml et mélanger vigoureusement après chaque ajout. Transférer le mélange lait/fromage quantitativement, avec le lait, dans une fiole jaugée de 25 ml (6.6). Compléter jusqu'au trait avec du lait et agiter vigoureusement. Retirer tout dépôt de graisse avec une spatule. Avant tout prélèvement de prise d'essai, mélanger le contenu de la fiole en la retournant à plusieurs reprises.

8.2.2 Dans le cas des fromages à pâte dure en particulier, il est recommandé d'utiliser un tube Potter ou un Ultra Turrax® (6.8) pour préparer le mélange lait/fromage. Si le tube Potter est utilisé, il convient de mélanger vigoureusement une quantité de 0,3 g à 0,5 g de l'échantillon d'essai préparé avec 10 ml de lait (5.5).

8.2.3 Les mesurages doivent être effectués de la même manière que la détermination de l'activité de la phosphatase alcaline dans le lait entier telle que décrite dans l'ISO 11816-1 | FIL 155-1.

8.3 Fromage au lait cru

Préparer l'échantillon d'essai comme spécifié en 8.1 et 8.2. Si l'activité du mélange lait/fromage est supérieure à 7000 mU/l, effectuer une dilution complémentaire de l'échantillon d'essai à 1:10 avec du lait (5.5).

9 Mode opératoire

9.1 Étalonnage

Les courbes d'étalonnage sont généralement stables. L'appareil doit être réétalonné tous les 2 à 3 mois. Contrôler l'appareil s'il apparaît des variations de plus de 10 % dans le rapport d'étalonnage en utilisant un nouveau lot d'étalons. Préchauffer les solutions étalons A, B et C avant utilisation. À l'aide d'une pipette (6.3.3), transférer 2,0 ml de chacune des solutions étalons A, B, C (5.4.1, 5.4.2 et 5.4.3 respectivement), et ceci en double, dans des cuvettes étiquetées (6.2). Placer les cuvettes dans le bloc d'incubation (6.4) et préchauffer à 38 °C pendant 5 min. À l'aide de la pipette à déplacement positif (6.3.2), ajouter 0,075 ml de lait (5.5) dans chacune des six cuvettes. Couvrir les cuvettes avec le parafilm (6.5).

Retourner doucement toutes les cuvettes pour mélanger le contenu puis les replacer dans le bloc d'incubation (6.4).

En commençant par la solution étalon A, réaliser l'étalonnage comme suit. Avant de placer chaque cuvette dans le fluorimètre à filtre (6.1), en essuyer l'extérieur avec un chiffon doux. Régler la fluorescence du fluorimètre (6.1) à zéro à l'aide de la solution étalon A (5.4.1). Puis lire et enregistrer la valeur de fluorescence obtenue avec les solutions étalons B (5.4.2) et C (5.4.3) par rapport à la solution étalon A (5.4.1).

Une fois l'étalonnage terminé, procéder à l'analyse des échantillons.

9.2 Détermination

À l'aide de la pipette distributrice (6.3.1), transférer 2,0 ml du substrat de travail (5.3) dans une cuvette étiquetée. Placer la cuvette dans le bloc d'incubation (6.4) et préchauffer à 38 °C pendant 5 min à 10 min. Ajouter au substrat 0,075 ml de la prise d'essai (8.2 ou 8.3). Couvrir la cuvette avec le parafilm (6.5) et mélanger immédiatement le contenu de la cuvette en la retournant doucement.

Essuyer l'extérieur de la cuvette avec un chiffon doux et la placer dans le fluorimètre à filtre (6.1). Laisser la cuvette reposer pendant 1 min pour que la température s'équilibre. Enregistrer ensuite la fluorescence au début de la deuxième minute et à la fin de la troisième minute. Diviser par deux la différence des deux valeurs de fluorescence pour obtenir la valeur moyenne de fluorescence produite par minute.

Enregistrer l'accroissement moyen de la fluorescence par minute pour chaque mélange lait/fromage. Utiliser cette valeur pour calculer l'activité de la phosphatase alcaline en milliunités par litre de la prise d'essai. Utiliser l'activité de la phosphatase alcaline de la prise d'essai pour calculer celle de l'échantillon.

Les résultats peuvent être calculés automatiquement en utilisant le calculateur programmable intégré au fluorimètre, ou manuellement, conformément à l'Article 10.

9.3 Essais de contrôle

9.3.1 Échantillon témoin négatif

Inclure un échantillon témoin négatif dans chaque lot d'échantillons en utilisant le lait préparé (5.5). Il convient que la valeur lue sur l'instrument soit inférieure à 10 mU/l pour conclure à l'absence d'activité fluorimétrique.

9.3.2 Échantillon témoin positif (standards.iteh.ai)

Inclure dans chaque lot d'échantillons un échantillon témoin positif ayant un niveau d'activité de la phosphatase proche ou égal au niveau de décision. Par exemple, ajouter 0,1 ml de lait cru frais de mélange à 100 ml de lait préparé (5.5).

9.3.3 Essais de contrôle de l'absence de substance interférente

Effectuer cet essai sur le produit étudié en ajoutant 0,075 ml de la prise d'essai (8.2 ou 8.3) à 2,0 ml de la solution étalon A (5.4.1). Placer la cuvette contenant ce mélange dans le fluorimètre à filtre et laisser la température atteindre 38 °C en 5 min. Enregistrer ensuite toute augmentation de fluorescence sur les deux minutes suivantes. Il convient qu'aucune activité de la phosphatase alcaline ne soit observée durant les 2 min de la période de mesurage.

9.3.4 Essais de contrôle de la phosphatase alcaline microbienne

Dans le cas des fromages au lait pasteurisé, si la détermination décrite en 9.2 donne un résultat positif, procéder alors comme suit. Effectuer un nouveau prélèvement de prise d'essai (8.2 ou 8.3). Chauffer le mélange dans le bain-marie (6.7) à 63 °C. Maintenir le mélange à cette température pendant 30 min puis le refroidir rapidement. Déterminer l'activité résiduelle éventuelle de la phosphatase conformément à 9.2. Toute activité résiduelle est due à la présence de phosphatase alcaline microbienne.