
**Fromages et fromages fondus —
Détermination de la teneur en acide
citrique — Méthode enzymatique**

*Cheese and processed cheese products — Determination of citric acid
content — Enzymatic method*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 2963:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-
bbe1606591de/iso-ts-2963-2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006)



Numéros de référence
ISO/TS 2963:2006(F)
FIL/MR 34:2006(F)

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/TS 2963:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006>

© ISO et FIL 2006

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

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Principe	1
4 Réactifs	1
5 Appareillage	3
6 Échantillonnage	3
7 Préparation de l'échantillon pour essai	4
8 Mode opératoire	4
8.1 Essais de contrôle	4
8.2 Prise d'essai	5
8.3 Essai à blanc du réactif	5
8.4 Défécation	5
8.5 Détermination	5
9 Calculs et expression des résultats	7
9.1 Calculs	7
9.2 Expression des résultats	7
10 Fidélité	8
10.1 Essai interlaboratoires	8
10.2 Répétabilité	8
10.3 Reproductibilité	8
11 Rapport d'essai	8
Annexe A (normative) Bonnes pratiques de laboratoire (BPL) relatives aux analyses enzymatiques	9
Bibliographie	13

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 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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents normatifs:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou une ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou une ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale, soit de son annulation.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document 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/TS 2963|FIL/MR 34 a été élaborée par l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette édition de l'ISO/TS 2963|FIL/MR 34 annule et remplace l'ISO 2963:1997, qui a fait l'objet d'une révision technique.

Avant-propos

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 pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un Comité permanent peut décider de publier un autre type de document normatif, désigné par la FIL: *Méthode révisée*. Cette méthode est le fruit d'un accord entre les membres d'un Comité permanent, et elle est acceptée pour publication si elle est approuvée par 50 % au moins des membres votants du comité. Une *Méthode révisée* équivaut à une ISO/PAS ou à une ISO/TS et sera donc également publiée conjointement dans les conditions de l'ISO.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO/TS 2963|FIL/MR 34 a été élaborée par la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/19b1bc1c-c279-4146-b96c->

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'action mixte ISO-FIL, *Dosage du lactose et du lactate* du Comité permanent *Principaux composants du lait*, sous la conduite de son chef de projet, Monsieur C. Hughes (NZ).

Cette édition de l'ISO/TS 2963|FIL/MR 34 annule et remplace la FIL 34C:1992, qui a fait l'objet d'une révision technique.

Introduction

La méthode décrite dans l'ISO 2963:1997 et la FIL 34C:1992 ne satisfaisait pas aux exigences d'une Norme internationale dûment validée. Il n'a pas été possible d'organiser de nouveaux essais interlaboratoires avec la méthode selon l'ISO 5725-1 et l'ISO 5725-2 par manque de participants, d'où la publication en tant que Spécification technique/Méthode révisée.

Des résultats fiables ne seront obtenus avec les méthodes enzymatiques que si les règles de bonnes pratiques de laboratoire concernant ce type d'analyses sont strictement appliquées. Ces règles sont indiquées en Annexe A.

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

[ISO/TS 2963:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006>

Fromages et fromages fondus — Détermination de la teneur en acide citrique — Méthode enzymatique

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique internationale spécifie une méthode enzymatique pour la détermination de la teneur en acide citrique des fromages et des fromages fondus.

2 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente Spécification technique, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

teneur en acide citrique

fraction massique des substances, déterminée selon la méthode décrite dans la présente Spécification technique

NOTE La teneur en acide citrique est exprimée en pourcentage en masse.

[ISO/TS 2963:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f9bfb1c-c279-4146-b96c-bbe1606591de/iso-ts-2963-2006>

3 Principe

Traitement d'un extrait d'échantillon par les enzymes et les substances biochimiques suivantes:

- a) citrate lyase (CL) pour convertir l'acide citrique en oxaloacétate et acétate;
- b) malate déshydrogénase (MDH) et lactate déshydrogénase (LDH) en présence de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (NADH) pour catalyser la réduction de l'oxaloacétate et de son produit de décarboxylation, le pyruvate, en L-malate et L-lactate, respectivement, avec la conversion simultanée de NADH en sa forme oxydée (NAD⁺).

Détermination de la diminution de la concentration de NADH en mesurant l'absorbance de la solution d'essai à 340 nm. La teneur en acide citrique est proportionnelle à cette diminution de concentration de NADH.

4 Réactifs

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue et de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente, sauf spécification contraire.

4.1 Enzymes

Prendre note de la date de fabrication et de la date limite d'utilisation des réactifs, indiquées par le fabricant. Si une suspension enzymatique est utilisée pour une autre activité que celle spécifiée, le volume de suspension indiqué en 8.5.1 doit être augmenté ou diminué en proportion.

Les réactifs décrits de 4.7 à 4.10 inclus sont en vente dans le commerce en combinaison pour essai.

4.2 Solution d'acide trichloroacétique (CCl₃COOH).

Dissoudre 200,0 g d'acide trichloroacétique dans l'eau. Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

4.3 Hydroxyde de sodium, solution I, $c(\text{NaOH}) = 5,0 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 200,0 g d'hydroxyde de sodium dans l'eau. Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

4.4 Hydroxyde de sodium, solution II, $c(\text{NaOH}) = 1,0 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 40,0 g d'hydroxyde de sodium dans l'eau. Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

4.5 Hydroxyde de sodium, solution III, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 4,0 g d'hydroxyde de sodium dans l'eau. Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

4.6 Solution de chlorure de zinc, $c(\text{ZnCl}_2) = 800 \text{ mg/l}$.

Dissoudre 800 mg de chlorure de zinc dans l'eau. Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

4.7 Solution tampon, pH 7,8.

Dissoudre 71,3 g de glycyglycine dans environ 700 ml d'eau. Ajuster à pH 7,8 avec la solution d'hydroxyde de sodium (4.3). Ajouter 100 ml de solution de chlorure de zinc (4.6). Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9b1bc1c-c279-4146-b96c->

La solution tampon peut être conservée pendant 4 semaines si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 °C et +5 °C.

4.8 Solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit

Dissoudre 50 mg de sel disodique de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit (C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂Na₂) et 100 mg d'hydrogencarbonate de sodium (NaHCO₃) dans 10 ml d'eau.

La solution de nicotinamide-adénine-dinucléotide réduit peut être conservée pendant 4 semaines si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 °C et +5 °C.

4.9 Suspension de malate déshydrogénase/lactate déshydrogénase

Mélanger des quantités équivalentes de malate déshydrogénase (MDH extraite de cœur de porc; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium, 3,2 mol/l, pH 6,0 ± 0,2; EC 1.1.1.37)¹⁾ et de lactate déshydrogénase (LDH de muscle de lapin; suspension dans une solution de sulfate d'ammonium, 3,2 mol/l, pH 7 ± 0,2; EC 1.1.1.27) et diluer avec la solution de sulfate d'ammonium (3,2 mol/l), de manière à obtenir une suspension contenant environ 600 unités²⁾ de MDH par millilitre et 1 400 unités²⁾ de LDH par millilitre.

La suspension de malate déshydrogénase/lactate déshydrogénase peut être conservée pendant un an si elle est conservée au réfrigérateur entre 0 °C et +5 °C.

1) Le nombre EC renvoie au nombre de la Classification des enzymes, tel qu'il figure dans la Référence [4].

2) Cette unité (appelée fréquemment unité internationale ou unité standard) équivaut à la quantité d'enzymes nécessaire pour catalyser la transformation de 1 µmol de substrat par minute dans des conditions normalisées.

4.10 Solution de citrate lyase

Dissoudre suffisamment de citrate lyase [lyophilisat (CL) provenant d'*Aerobacter aerogenes*; EC 4.1.3.6] dans de l'eau glacée, de manière à obtenir une solution contenant 40 unités²⁾ par millilitre.

La solution de citrate lyase peut être conservée pendant une semaine si elle est conservée entre 0 °C et +5 °C et pendant 4 semaines si elle est conservée à -20 °C.

4.11 Solution étalon d'acide citrique

Dissoudre 1,600 g d'acide citrique monohydraté (C₆H₈O₇·H₂O) dans de l'eau. Diluer avec de l'eau et compléter à 1 000 ml, puis homogénéiser.

5 Appareillage

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

5.1 **Balance analytique**, d'une précision de 1 mg et d'une lisibilité de 0,1 mg.

5.2 **pH-mètre**.

5.3 **Béchers en verre**, de 50 ml de capacité.

5.4 **Homogénéisateur**, avec béccher adapté.

5.5 **Fioles jaugées à un trait**, d'une capacité de 100 ml.

5.6 **Pipettes**, de 0,02 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml, 25 ml et 40 ml de capacité.

5.7 **Pipettes graduées**, de 10 ml de capacité, graduées en 0,1 ml.

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

5.9 **Entonnoir à filtre**, d'environ 7 cm de diamètre.

5.10 **Papier-filtre**, de porosité moyenne, d'environ 15 cm de diamètre.

5.11 **Spectromètre**, capable d'effectuer des mesures à 340 nm et équipé de cellules de 1 cm de parcours optique.

5.12 **Spatules en plastique**, destinées à agiter le mélange échantillon/enzyme dans la cellule du spectromètre.

5.13 **Bain d'eau**, réglable entre 20 °C et 25 °C, équipé d'un support adéquat pour maintenir la cellule du spectromètre (5.11) durant la période d'incubation (facultatif; voir 8.5.1).

L'incubation des cellules dans le bain d'eau n'est nécessaire que si la température de la pièce est inférieure à 20 °C.

6 Échantillonnage

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

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode indiquée dans la présente Spécification technique. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 707 | FIL 50.

7 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer un échantillon homogène, en évitant des pertes d'humidité, selon la méthode suivante:

- a) S'il s'agit de fromage, enlever la croûte ou la surface moisie du fromage, de manière à obtenir un échantillon représentatif du fromage tel qu'il est ordinairement consommé.

Moudre ou râper l'échantillon avec un instrument approprié, mélanger rapidement la masse moulue ou râpée et, si possible, moudre ou râper une seconde fois et mélanger bien de nouveau, en agitant et en malaxant énergiquement.

- b) S'il s'agit de fromage fondu, prélever un échantillon représentatif du produit. Mélanger rapidement la masse de l'échantillon et le moudre, si nécessaire. Mélanger bien en agitant et en malaxant énergiquement.

- c) S'il s'agit de fromage fondu contenant des morceaux d'autres aliments (par exemple jambon, fruits, noix, fines herbes), constater si l'objectif de l'analyse est de doser l'acide citrique dans le fromage fondu proprement dit ou dans le produit entier. Dans le premier cas, séparer les morceaux de l'autre aliment et procéder comme dans le cas du fromage fondu.

Placer l'échantillon dans un récipient pourvu d'un couvercle parfaitement étanche à l'air, pour le conserver avant l'analyse. Fermer le récipient immédiatement. Il convient d'effectuer l'analyse le plus vite possible après la préparation de l'échantillon.

8 Mode opératoire

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8.1 Essais de contrôle

8.1.1 Procéder à un essai de contrôle de l'acide citrique selon 8.1.2 à 8.1.4

- a) lorsqu'un nouveau lot de réactifs (de 4.7 à 4.10) est utilisé,
- b) lorsque ces réactifs ont été conservés au réfrigérateur sans utilisation pendant plus de 2 semaines,
- c) lorsque les analyses sont reprises après une période d'inactivité, ou
- d) chaque fois que les conditions peuvent le justifier.

8.1.2 Introduire, au moyen d'une pipette, dans chacune des deux fioles jaugées de 100 ml (5.5), respectivement de 5,0 ml et de 10,0 ml de la solution étalon d'acide citrique (4.11).

Ajouter dans chaque fiole 10 ml de solution d'acide trichloroacétique (4.2). Compléter le contenu de chaque fiole à 100 ml avec de l'eau et mélanger.

Déterminer la teneur en acide citrique de chacune des deux solutions comme décrit en 8.4.3 à 8.5.3 inclus.

8.1.3 Calculer la teneur en acide citrique monohydraté de la solution étalon d'acide citrique (4.11) selon l'Équation (2) du 9.1, mais en utilisant les valeurs suivantes:

- V_5 est le volume, en millilitres, de la solution étalon d'acide citrique (4.11) ($V_5 = 1\ 000$ ml);
- V_6 est le volume, en millilitres, de la solution étalon d'acide citrique utilisée (8.1.2), ($V_6 = 5$ ml et 10 ml, respectivement);
- V_7 est le volume total, en millilitres, de la solution étalon d'acide citrique diluée (8.1.2) ($V_7 = 100$ ml).

8.1.4 Compte tenu de la pureté de l'acide citrique monohydraté, la récupération obtenue pour les deux dilutions (8.1.2) doit être de $100 \% \pm 5 \%$. Si tel n'est pas le cas, les réactifs, le mode opératoire, l'exactitude des pipettes et l'état du spectromètre doivent être contrôlés, et les mesures appropriées doivent être prises afin d'obtenir les résultats adéquats. L'essai doit être répété jusqu'à obtenir des résultats satisfaisants.

8.2 Prise d'essai

Peser avec précision, à 0,1 mg près, environ 1 g de l'échantillon pour essai préparé (Article 7) dans un bécher (5.3). Mettre en suspension la prise d'essai dans environ 50 ml d'eau chaude (de 40 °C à 50 °C) en utilisant l'homogénéisateur (5.4). Transférer quantitativement le contenu du bécher dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.5). Refroidir le contenu de la fiole jusqu'à environ 20 °C.

8.3 Essai à blanc du réactif

Effectuer un essai à blanc en double. Procéder comme décrit en 8.4 et en 8.5, en utilisant tous les réactifs, mais sans la prise d'essai.

8.4 Défécation

8.4.1 Ajouter 10 ml d'acide trichloroacétique (4.2) à la suspension (8.2) dans la fiole jaugée à un trait. Diluer avec de l'eau et compléter à 100 ml, puis mélanger vigoureusement.

8.4.2 Laisser la préparation reposer pendant 30 min. Ne pas remélanger le contenu de la fiole avant la filtration.

8.4.3 Filtrer le liquide surnageant à travers un papier-filtre (5.10), en rejetant la première fraction du filtrat.

8.4.4 Prélever, à la pipette, 25 ml de filtrat et l'introduire dans un bécher en verre (5.3). Ajuster le pH à environ 4 en ajoutant la solution II d'hydroxyde de sodium (4.4), puis ajuster le pH à environ 8 en ajoutant la solution III d'hydroxyde de sodium (4.5) en utilisant le pH-mètre (5.2).

Transférer quantitativement le contenu du bécher dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.5). Diluer avec de l'eau et compléter à 100 ml, puis homogénéiser.

8.4.5 Filtrer à travers un papier-filtre (5.10), en rejetant la première fraction de filtrat.

8.5 Détermination

8.5.1 Mode opératoire

Effectuer la détermination selon le schéma du Tableau 1, en ayant soin d'amener la solution tampon (4.7) et l'eau à la température ambiante juste avant de les utiliser.