
**Lait et produits laitiers — Détermination
de lysozyme de blanc d'œufs par CLHP**

*Milk and milk products — Determination of hen's egg white lysozyme by
HPLC*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 27105:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009>



Numéros de référence
ISO/TS 27105:2009(F)
FIL/MR 216:2009(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 27105:2009](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2009

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'une ou l'autre des adresses 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

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:

- 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 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 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 27105|FIL/MR 216 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). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Avant-propos

La **FIL (Fédération Internationale de Laiterie)** est une organisation sans but lucratif représentant le secteur laitier mondial. Les membres de la FIL se composent des Comités Nationaux dans chaque pays membre et des associations laitières régionales avec lesquelles la FIL a signé des accords de coopération. Tout membre de la FIL 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 de préparer les Normes internationales. Les Normes internationales provisoires adoptées par les groupes de travail et le Comités Permanents sont circulés aux Comités nationaux pour approbation. La publication en tant que Norme internationale requiert l'approbation d'au moins 50 % des Comité Nationaux de la FIL participant au vote.

Dans d'autres circonstances, particulièrement quand une demande urgente du marché survient pour de tels documents, un Comité permanent peut décider de publier un autre type de document à valeur de norme que la FIL appelle *Méthode révisée*. Une telle méthode illustre un consensus entre les membres d'un Comité permanent et est acceptée pour publication si elle est approuvée par au moins 50 % des Comités Nationaux émettant un vote. Une *Méthode révisée* est équivalente à une ISO/PAS ou à une ISO/TS et sera donc aussi publiée conjointement selon les conditions 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 27105|FIL/MR 216 a été élaborée par la Fédération Internationale de Laiterie (FIL) et le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Elle est publiée conjointement par la FIL et l'ISO.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO-FIL, *Additifs alimentaires et vitamines*, du Comité permanent chargé des *Méthodes analytiques pour additifs et contaminants*, sous la conduite de leurs chefs de projet, Dr. T. Berger (CH) et Prof. L. Pellegrino (IT).

Lait et produits laitiers — Détermination de lysozyme de blanc d'œufs par CLHP

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique spécifie une méthode pour la détermination quantitative de lysozyme de blanc d'œufs dans le lait et les produits laitiers.

La méthode est adaptée au mesurage de faibles niveaux de lysozyme de blanc d'œufs avec une limite de quantification de 5 mg/kg.

2 Termes et définitions

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

2.1

teneur en lysozyme de blanc d'œufs

fraction massique de substance, déterminée selon le mode opératoire spécifié dans la présente Spécification technique

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-1c506ca0a21b-iso-ts-27105-2009>

NOTE La teneur en lysozyme est exprimée en milligrammes par kilogramme.

3 Principe

Précipitation isoélectrique de la caséine et des protéines de lactosérum dénaturé provenant du lait et des produits laitiers à pH 4,3 (fromage et produits laitiers solides) ou à pH 2,2 (lait et produits laitiers liquides), puis détermination du lysozyme de blanc d'œufs soluble dans l'acide par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inverse et détection par fluorescence. Le pic du lysozyme peut être vérifié par chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC/MS) (voir Annexe A).

4 Réactifs et substances de référence

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

4.1 Réactifs

4.1.1 Solution de chlorure de sodium, $c(\text{NaCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

Dissoudre 58,44 g de chlorure de sodium dans 1 l d'eau.

4.1.2 Solution d'acide chlorhydrique $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.

Verser 4,0 ml d'acide chlorhydrique de fraction massique 37 % dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (5.9). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

4.1.3 Solution d'hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$.

Verser 2,6 ml d'hydroxyde de sodium de fraction massique 50 % dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (5.9). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

4.1.4 Acide trifluoroacétique (CF_3COOH).

4.1.5 Acétonitrile, (CH_3CN), qualité CLHP.

4.1.6 Eau, qualité CLHP.

4.2 Lysozyme

Lysozyme de blanc d'œufs pur¹⁾.

NOTE Le lysozyme (EC 3.2.1.17, muramidase) est un enzyme qui est très répandu dans la nature, par exemple dans le blanc d'œufs (environ 3 g/100 g à 4 g/100 g), la salive et dans les larmes. Le lysozyme possède un effet conservateur en raison de l'activité lytique sur la paroi de la cellule de certaines bactéries. Le lysozyme de blanc d'œufs est utilisé dans la fabrication du fromage afin d'empêcher le gonflement tardif des fromages à pâte demi-dure et dure.

5 Appareillage et matériel

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

5.1 pH-mètre.

5.2 Filtre cylindrique, de diamètre 150 mm²⁾.

5.3 Membrane filtrante, de taille de pore 0,22 µm³⁾.

5.4 Balance, capable de peser à 100 mg près et d'une résolution de 10 mg.

5.5 Balance analytique, capable de peser à 0,1 mg près et d'une résolution de 0,01 mg.

5.6 Agitateur magnétique.

5.7 Homogénéisateur, capable de tourner à une fréquence de rotation de 2 500 r/min à 3 000 r/min.

5.8 Matériel CLHP.

5.8.1 Système de pompage pour la technique avec gradient d'élution, capable de fournir un débit de 1,0 ml/min.

5.8.2 Injecteur manuel ou automatique, capable d'injecter des volumes de 50 µl.

1) SIGMA L-7651 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif de ce produit.

2) Schleicher & Schuell 595½ est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif de ce produit.

3) Millex-GV PVDF 0,22 µm est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif de ce produit.

- 5.8.3 Four à colonne**, capable de maintenir une température de colonne de $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- 5.8.4 Colonne pour chromatographie en phase inverse**, PLRP-S 300 Å⁴, $5\text{ }\mu\text{m}$, $250\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$.
- 5.8.5 Détecteur de fluorescence**, capable de fonctionner à une longueur d'onde d'excitation de 280 nm et une longueur d'onde d'émission de 340 nm .
- 5.9 Fioles jaugées à un trait**, de contenance 10 ml et 50 ml , ISO 1042^[2], classe A.

6 Échantillonnage

Il convient que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ni modifié lors du transport ou du stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Spécification technique. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707|FIL 50^[1].

7 Mode opératoire

7.1 Préparation de la solution étalon de lysozyme

7.1.1 Solution étalon mère de lysozyme

Peser, à $0,01\text{ mg}$ près, 10 mg de lysozyme (4.2) dans une fiole jaugée à un trait de 10 ml (5.9). Compléter au trait avec la solution de chlorure de sodium (4.1.1) et mélanger.

Préparer les solutions étalon mères pour utilisation le jour même.

7.1.2 Solution étalon de travail de lysozyme

Dans une fiole jaugée à un trait de 10 ml (5.9), introduire à la pipette $80\text{ }\mu\text{l}$ de solution étalon mère de lysozyme (7.1.1). Compléter au trait avec la solution de chlorure de sodium (4.1.1) et mélanger.

La solution étalon de travail de lysozyme ainsi obtenue contient $8,0\text{ mg}$ de lysozyme par litre.

7.2 Prise d'essai

7.2.1 Lait ou produits laitiers liquides

Peser, à $0,01\text{ g}$ près, $10,00\text{ g}$ d'échantillon pour essai dans un bécher de 100 ml .

7.2.2 Fromage ou produits laitiers solides

Avant le pesage, râper les échantillons pour essai de fromage. Peser, à $0,01\text{ g}$ près, $2,00\text{ g}$ d'échantillon pour essai dans un bécher de 100 ml .

NOTE Le fromage à pâte molle peut être râpé après congélation.

4) PLRP-S 300 Å est l'appellation commerciale d'un produit fourni par Polymer Laboratories, Ltd. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Spécification technique et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif de ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

7.2.3 Préparation de la prise d'essai

Ajouter 20 ml de solution de chlorure de sodium (4.1.1) à la prise d'essai (7.2.1 ou 7.2.2) et mélanger. Ajuster le pH de la solution obtenue en ajoutant des gouttes de la solution d'hydroxyde de sodium (4.1.3) pour obtenir un pH de 6,0.

Disperser la prise d'essai pendant 30 s à l'aide de l'homogénéisateur (5.7) à une fréquence de rotation de 2 500 r/min à 3 000 r/min. Rincer l'homogénéisateur dans un bécher séparé de 100 ml en utilisant 10 ml de la solution de chlorure de sodium (4.1.1). Ajouter les rinçages à la solution pour essai.

Agiter le bécher contenant la solution pour essai sur un agitateur magnétique à température ambiante pendant 1 h. Ajuster le pH de la prise d'essai obtenue à partir du lait et des produits laitiers liquides (7.2.1) à pH 2,2 et celle obtenue à partir du fromage et des produits laitiers solides à pH 4,3 en utilisant l'acide chlorhydrique (4.1.2).

Transférer la solution pour essai dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml (5.9). Utiliser la solution de chlorure de sodium (4.1.1) pour rincer le bécher de 100 ml. Compléter au trait avec la solution de chlorure de sodium (4.1.1) et mélanger.

Laisser reposer la solution pour essai à température ambiante pendant 15 min.

D'abord filtrer la solution pour essai à travers le filtre cylindrique (5.2), puis à travers la membrane filtrante (5.3) directement dans un flacon CLHP.

7.3 Détermination CLHP

iTeh STANDARD PREVIEW

7.3.1 Conditions chromatographiques (standards.iteh.ai)

Préparer ce qui suit.

- 1) Solution mère I: 1 ml d'acide trifluoroacétique (4.1.4) dans 1 l d'eau (4.1.6).
- 2) Solution mère II: 1 ml d'acide trifluoroacétique (4.1.4) dans 1 l d'acétonitrile (4.1.5).

Utiliser ce qui suit pour la CLHP.

- 1) Solvant d'élution A contenant: Solutions mères I et II avec un rapport en fraction massique de I à II de 100:38,4.
- 2) Solvant d'élution B contenant: Solution mère II.

Un gradient d'élution est proposé dans le Tableau 1.

Tableau 1 — Gradient d'élution proposé

Temps min	Solvant d'élution A ^a %	Solvant d'élution B ^a %
0,0	100	0
20,0	100	0
21,0	50	50
22,0	50	50
23,0	100	0
35,0	100	0

^a Pour obtenir la résolution indiquée à la Figure 1, il peut se révéler nécessaire de modifier légèrement le gradient d'élution.

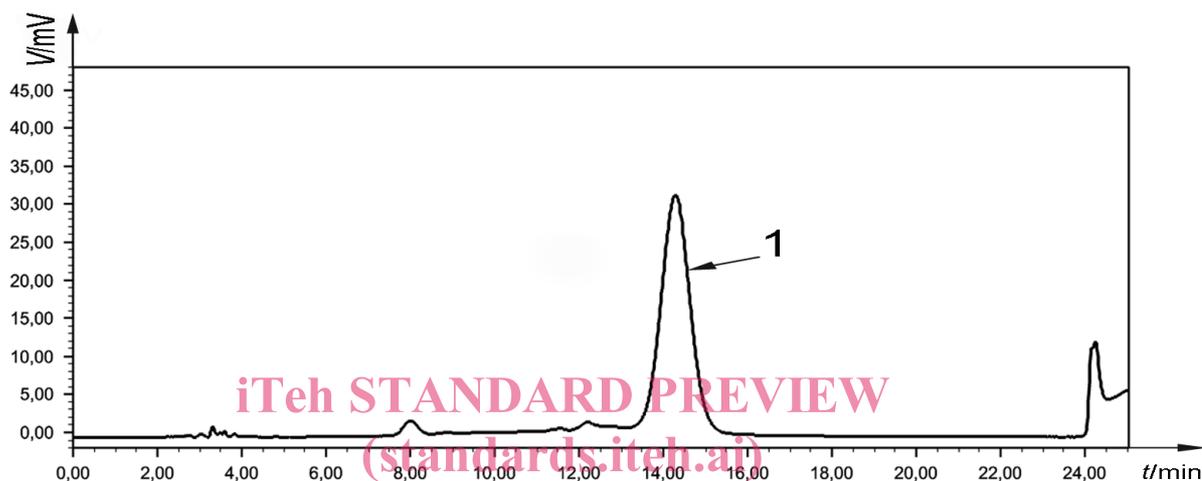
Régler le débit du système de pompage pour la technique avec gradient d'élution du matériel CLHP à 1,0 ml/min.

Régler la température du four à colonne à 45 °C. Déterminer le temps d'équilibrage en surveillant l'élution dans la colonne.

Il convient que la réponse du détecteur à l'issue de la détermination (ligne de base) soit égale à la valeur initiale. Un rinçage isocratique pendant 15 min suffit en général.

Injection: utiliser un injecteur manuel ou automatique pour injecter 50 µl des solutions (7.2.3) dans la colonne.

Les signaux de fluorescence CLHP obtenus à partir de la solution étalon de travail (7.1.2) et d'un échantillon de fromage à pâte dure (7.2.3) sont donnés aux Figures 1 et 2.

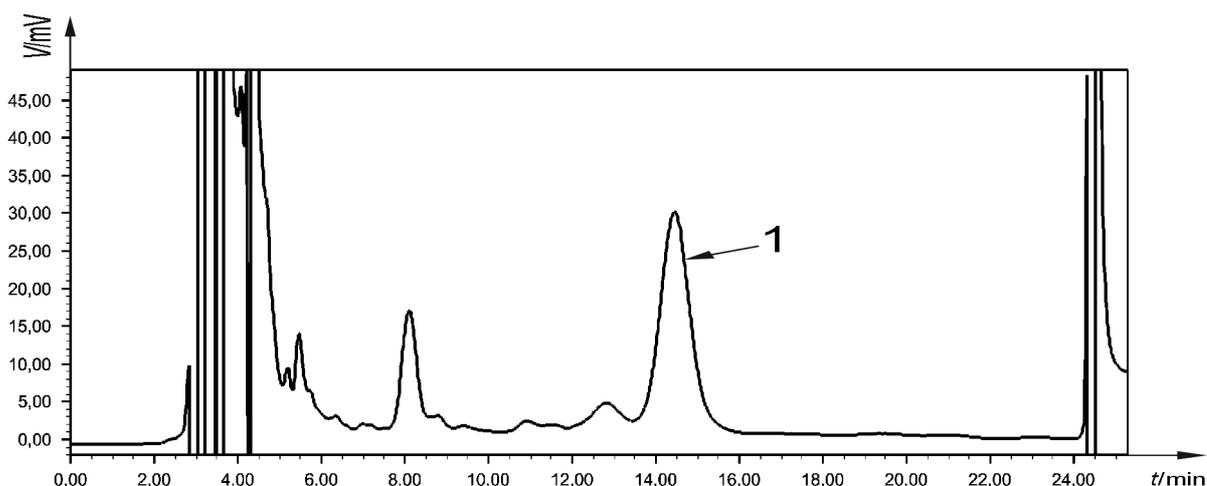


Légende

- t temps
- V pic de réponse
- 1 lysozyme

ISO/TS 27105:2009
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ceeb7ada-855b-4022-bdc1-7c8bdeae6a2f/iso-ts-27105-2009>

Figure 1 — Signal de fluorescence CLHP obtenu à partir de la solution étalon de travail (7.1.2)



Légende

- t temps
- V pic de réponse
- 1 lysozyme

Figure 2 — Signal de fluorescence CLHP obtenu à partir d'un échantillon de fromage à pâte dure