
**Lait — Détermination de l'activité de la
lactoperoxydase — Méthode
photométrique (Méthode de référence)**

*Milk — Determination of the lactoperoxidase activity — Photometric
method (Reference method)*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 17193:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afê1-5d1bc7f8cdcd/iso-ts-17193-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afê1-5d1bc7f8cdcd/iso-ts-17193-2011>



Numéros de référence
ISO/TS 17193:2011(F)
FIL/MR 208:2011(F)

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO/TS 17193:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afè1-5d1bc7f8cdcd/iso-ts-17193-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afè1-5d1bc7f8cdcd/iso-ts-17193-2011>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2011

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 du Lait
Silver Building • Boulevard Auguste Reyers 70/B • 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

Version française parue en 2012

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 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 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 17193|FIL/MR 208 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* et la Fédération internationale du lait (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

La présente version française de l'ISO/TS 17193|FIL/MR 208:2011 correspond à la version anglaise corrigée le 2012-06-01.

Avant-propos

La **FIL (Fédération Internationale du Lait)** 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 permanents est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour approbation avant publication en tant que Norme internationale. La publication comme Norme internationale requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux de la FIL votants.

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 17193|FIL/MR 208 a été élaborée par la Fédération Internationale du Lait (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 au Groupe de projet mixte ISO-FIL sur la *Détermination de l'activité de la lactoperoxydase par la méthode photométrique* du Comité permanent sur les *Méthodes d'analyse pour les auxiliaires technologiques et indicateurs*, sous la conduite de ses chefs de projet, M. D. Tanzer (DE) et Mme M. Nicolas (FR).

La présente version française de l'ISO/TS 17193|FIL/MR 208:2011 correspond à la version anglaise corrigée le 2012-06-01.

Lait — Détermination de l'activité de la lactoperoxydase — Méthode photométrique (Méthode de référence)

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique spécifie une méthode photométrique pour la détermination de l'activité de la lactoperoxydase dans le lait pour des quantités supérieures à 50 U/l.

2 Termes et définitions

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

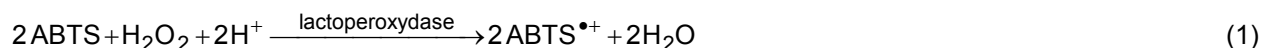
2.1

unité d'activité de la lactoperoxydase

quantité d'enzyme lactoperoxydase qui catalyse la transformation de 1 μmol de substrat par minute

3 Principe

En présence d'enzyme lactoperoxydase contenue dans l'échantillon, l'ABTS [2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)] est converti par catalyse en son cation radicalaire ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) à un pH de 6,0 et une température de 25°C. La quantité de ($\text{ABTS}^{\bullet+}$) libérée par minute est proportionnelle à l'activité de la lactoperoxydase et mesurée par photométrie à 420 nm. La libération de l' $\text{ABTS}^{\bullet+}$ est basée sur la réaction chimique suivante:



4 Réactifs

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

4.1 Solution tampon, de pH 6,0. Dissoudre 0,72 g d'hydrogénophosphate disodique dihydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) et 3,99 g de dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4) dans un bécher, dans environ 450 ml d'eau. Ajuster le pH de la solution, si nécessaire, à $6,0 \pm 0,03$ à l'aide d'une solution diluée d'hydroxyde de sodium ou d'hydroxyde de potassium ou d'une solution diluée d'acide phosphorique. Transvaser la solution dans une fiole jaugée de 500 ml (5.6). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

NOTE La solution tampon contient 8,09 mmol/l d'hydrogénophosphate disodique dihydraté et 58,6 mmol/l de dihydrogénophosphate de potassium.

4.2 Solution de peroxyde d'hydrogène.

AVERTISSEMENT — Le peroxyde d'hydrogène est un produit corrosif et il convient de ne pas le mettre en contact avec des métaux ou avec des substances organiques facilement inflammables afin d'empêcher la formation de mélanges explosifs.

À l'aide d'une pipette, introduire 0,1 ml de peroxyde d'hydrogène à 30 % (fraction massique) dans une fiole jaugée à un trait de 100 ml (5.6). Compléter au trait avec de l'eau et mélanger.

Préparer la solution de peroxyde d'hydrogène juste avant utilisation (voir 4.3).

4.3 Solution de réactif ABTS, solution à 2 mmol/l du sel de diammonium du 2,2-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique) $[C_{18}H_{16}N_4O_6S_4(NH_4)_2]$.

Peser 55 mg de sel de diammonium d'ABTS dans une fiole jaugée de 50 ml (5.6). Ajouter environ 30 ml de solution tampon (4.1) pour dissoudre le sel. Ajouter ensuite 1,0 ml de solution de peroxyde d'hydrogène (4.2). Compléter à 50 ml avec la solution tampon et mélanger.

Préparer une nouvelle solution de réactif chaque jour.

5 Appareillage

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

5.1 Balance analytique, permettant de peser à 1 mg près et ayant une résolution de 0,1 mg.

5.2 pH-mètre, permettant de mesurer à 0,1 unité de pH près et ayant une résolution de 0,01 unité.

5.3 Spectrophotomètre, permettant de mesurer l'absorbance à 420 nm, avec un porte-cuves thermostaté permettant de maintenir la température à $25\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

5.4 Cuvette en plastique, de trajet optique de 1,0 cm, munie d'un couvercle.

NOTE L'utilisation de cuvettes en verre ou en quartz peut donner des résultats trop faibles à cause des pertes liées à l'adsorption.

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afè1-5d11b7f8ed14/iso-ts-17193-2011>

5.5 Pipettes à déplacement d'air ou pipettes à piston, ISO 8655-2^[5], ayant une capacité nominale de 0,05 ml, 0,1 ml, 1,0 ml et 2,0 ml.

5.6 Fioles jaugées à un trait, ayant une capacité nominale de 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml et 500 ml, ISO 1042^[2], classe A.

5.7 Bain d'eau ou bain sec, permettant de maintenir une température de $25\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

6 Échantillonnage

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

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

7 Mode opératoire

7.1 Préparation de la dilution de l'échantillon pour essai

Porter les échantillons pour essai réfrigérés à température ambiante et les mélanger soigneusement. Il n'est généralement pas nécessaire de réchauffer l'échantillon pour essai pour obtenir une homogénéisation correcte. La température ne doit en aucun cas dépasser 35 °C.

Mélanger l'échantillon pour essai en fonction de sa teneur en lactoperoxydase avec de l'eau, suivant un rapport volumique approprié d'au moins 1→5.

Pour calculer l'activité de la lactoperoxydase, l'absorbance différentielle obtenue, ΔA , doit être comprise dans la plage allant de 0,02 min⁻¹ à 0,5 min⁻¹. Les rapports de dilution avec de l'eau spécifiés dans le Tableau 1 s'appliquent en fonction de la plage de mesure.

Tableau 1 — Dilution des échantillons pour essai

Plage de mesure U/l	Dilution
50 à 1 200	1→5
100 à 2 500	1→10
250 à 6 000	1→25

Pour la dilution des échantillons de lait UHT, un rapport (volumique) de 1→5 doit être utilisé.

7.2 Détermination

Avant la détermination photométrique, régler le spectrophotomètre (5.3) à son niveau zéro à une longueur d'onde de 420 nm en utilisant l'air comme référence (sans cuvette dans le trajet du faisceau).

À l'aide d'une pipette, introduire 2 ml de solution de réactif ABTS (4.3) dans une cuvette (5.4). Couvrir la cuvette et la placer dans le bain d'eau ou dans le bain sec (5.7), réglé à 25 °C et la maintenir pendant le temps nécessaire pour atteindre cette température à l'intérieur de la cuvette.

Ajouter ensuite 0,05 ml de l'échantillon pour essai dilué comme spécifié en 7.1. Couvrir la cuvette de nouveau immédiatement et mélanger son contenu en la retournant soigneusement. Placer rapidement la cuvette dans le porte-cuves du spectrophotomètre (5.3) préchauffé à 25 °C.

Dans les 15 s suivant l'ajout de l'échantillon pour essai dilué à la solution de réactif dans la cuvette, mesurer l'absorbance A_1 à une longueur d'onde de 420 nm en utilisant l'air comme référence. Enregistrer l'absorbance A_2 après exactement 2 min.

IMPORTANT — Pour que le mesurage soit fiable, s'assurer que l'intervalle de temps entre l'ajout de l'échantillon pour essai dilué à la solution de réactif et le mesurage de A_1 soit inférieur ou égal à 15 s.

Si une pipette à piston de 0,05 ml est utilisée, veiller à ce que l'embout de la pipette soit rincé avant utilisation avec la solution d'échantillon diluée.

8 Calcul et expression des résultats

8.1 Calcul

NOTE Dans la réaction chimique (1) sur laquelle est basée la présente méthode de dosage, il existe une relation linéaire entre la variation de l'absorbance par minute et l'activité de la lactoperoxydase. L'activité d'une enzyme dans une solution diluée déterminée par photométrie d'absorption est conforme à la loi de Beer-Lambert.

Calculer l'activité de la lactoperoxydase, a_1 , de l'échantillon, exprimée en unités par litre (U/l), à l'aide de l'Équation (2):

$$a_1 = \frac{V_1 \Delta A f \times 1000}{\varepsilon d V_2 \times 2} \quad (2)$$

où

- V_1 est le volume total, en millilitres, de la solution d'essai (7.2) ($V_1 = 2,05$ ml);
- V_2 est le volume, en millilitres, de l'échantillon dilué (7.1) ($V_2 = 0,05$ ml);
- ΔA est l'absorbance différentielle, $(A_2 - A_1)/\text{min}$;
- ε est le coefficient d'absorption de l'ABTS oxydé à 420 nm ($\varepsilon = 43,2 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$);
- d est le trajet optique, en centimètres, de la cuvette ($d = 1,0$ cm);
- f est le facteur de dilution ($f = 5$ pour le lait UHT);
- 1 000 est le facteur de conversion en unités par litre (U/l);
- 2 est le coefficient stœchiométrique.

8.2 Expression des résultats

Exprimer les résultats au nombre entier le plus proche.

9 Fidélité

Au moment de la publication, aucune étude interlaboratoires satisfaisant aux exigences de l'ISO 5725-1^[3] et de l'ISO 5725-2^[4] n'a pu être organisée. En conséquence, la présente méthode est publiée sous la forme d'une Spécification technique et non sous la forme d'une Norme internationale.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

- a) toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- b) la méthode d'échantillonnage utilisée, si elle est connue;
- c) la méthode d'essai utilisée, accompagnée d'une référence à la présente Spécification technique (ISO/TS 17193|FIL/MR 208:2011);
- d) tous les détails opératoires non spécifiés dans la présente Spécification technique ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails des incidents ayant pu influencer sur le ou les résultats d'essai;
- e) le ou les résultats d'essai obtenus;
- f) en cas de vérification de la répétabilité, le résultat final indiqué.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 17193:2011](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afè1-5d1bc7f8cdcd/iso-ts-17193-2011)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4c570b71-4eb5-416a-afè1-5d1bc7f8cdcd/iso-ts-17193-2011>