
**Lait et produits laitiers — Coagulants
microbiens — Détermination de l'activité
totale de coagulation du lait**

*Milk and milk products — Microbial coagulants — Determination of total
milk-clotting activity*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 15174:2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-
fc143f28ee97/iso-15174-2012](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012)



Numéros de référence
ISO 15174:2012(F)
FIL 176:2012(F)

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2012

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

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Avant-propos	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Principe	1
3 Réactifs et produits	1
4 Appareillage	3
5 Échantillonnage	3
6 Préparation de l'échantillon pour essai	4
6.1 Coagulant microbien liquide	4
6.2 Coagulant microbien en poudre	4
7 Mode opératoire	4
7.1 Préparation du substrat	4
7.2 Préparation de la solution de référence de coagulant microbien	4
7.3 Préparation de la solution d'essai de coagulant microbien	5
7.4 Coagulation	5
8 Calcul et expression des résultats	6
8.1 Calcul	6
8.2 Expression des résultats	6
9 Fidélité	6
9.1 Essai interlaboratoires	6
9.2 Répétabilité	7
9.3 Reproductibilité	7
10 Rapport d'essai	7
Annexe A (informative) Essai interlaboratoires	8
Bibliographie	9

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.

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 15174|FIL 176 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.

Cette deuxième édition de l'ISO 15174|FIL 176 annule et remplace la première édition (ISO 15174|FIL 176:2002), dont elle constitue une révision technique.

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.

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 15174|FIL 176 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 les *Coagulants microbiens* du Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse pour les auxiliaires technologiques et indicateurs*, sous la conduite de ses chefs de projet, Mme M. Harboe (DK) et Prof. A. Andren (SE).

Cette deuxième édition de l'ISO 15174|FIL 176 annule et remplace la première édition (ISO 15174|FIL 176:2002), dont elle constitue une révision technique.

Introduction

Les coagulants microbiens proviennent de différentes sources microbiennes, dont les plus courantes sont le *Rhizomucor miehei* (CE 3.4.23.23), le *R. pusillus* (CE 3.4.23.23) et la *Cryphonectria parasitica*, autrefois appelée *Endothia parasitica* (CE 3.4.23.22).

Chacune de ces enzymes présente des caractéristiques spécifiques sous l'angle de son activité de coagulation du lait et de ses propriétés lors de la fabrication du fromage. Il existe des différences de sensibilité à la température, de sensibilité au pH, de sensibilité aux ions calcium et de l'effet sur la rhéologie du gel de lait formé.

Pour des raisons pratiques et économiques, il est donc très important de définir une méthode internationale de détermination de l'activité totale de coagulation du lait des coagulants microbiens par rapport à un étalon de référence reconnu à l'échelle internationale. Également pour des raisons pratiques, il a été décidé d'utiliser l'enzyme *R. miehei* comme étalon de référence pour tous les types de coagulants microbiens.

Cette méthode est conforme à l'essai d'activité de coagulation relative pour présures de veaux et coagulants issus de bovins adultes décrit dans l'ISO 11815|FIL 157.

Une détermination qualitative des coagulants microbiens présents dans un échantillon peut être réalisée conformément à l'ISO 15613|FIL 110.—[7], Annexe A. En présence de mélanges de différentes enzymes de coagulation du lait, il est impossible de déterminer correctement l'activité totale de coagulation du lait pour l'échantillon en question.

ISO 15174:2012
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012>

Lait et produits laitiers — Coagulants microbiens — Détermination de l'activité totale de coagulation du lait

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode permettant de comparer l'activité totale de coagulation du lait d'un échantillon de coagulant microbien à l'activité de coagulation du lait d'un étalon de référence de coagulant microbien reconnu à l'échelle internationale, sur un substrat de lait étalon préparé avec une solution de chlorure de calcium à une concentration de 0,5 g/l (pH ~ 6,5).

2 Principe

Le temps requis pour observer visuellement l'apparition d'une floculation d'un substrat de lait étalon préparé avec une solution de chlorure de calcium à 0,5 g/l (pH ~ 6,5) est déterminé. Le temps de coagulation d'un échantillon de coagulant microbien est comparé avec celui de l'étalon de référence de coagulant microbien d'activité de coagulation du lait connue, dans les mêmes conditions chimiques et physiques.

(standards.iteh.ai)

3 Réactifs et produits

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

3.1 Solution tampon, pH 5,5. À l'aide d'une pipette (4.1), ajouter 10,0 ml d'acide acétique à 1 mol/l (CH_3COOH) à 10,0 g d'acétate de sodium trihydraté (CH_3COONa , $3\text{H}_2\text{O}$) et mélanger. Compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Au besoin, ajuster le pH à 5,5 avec de l'acide acétique à 1 mol/l ou une solution d'acétate de sodium à 1 mol/l.

3.2 Solution mère de chlorure de calcium, $\rho(\text{CaCl}_2) = 500$ g/l. Des solutions de chlorure de calcium à la concentration en chlorure de calcium exacte requise de 500 g/l et avec l'indication de la masse volumique effective sont disponibles dans le commerce¹⁾. Conserver la solution conformément aux instructions du fabricant.

Avant utilisation, porter la solution mère de chlorure de calcium à température ambiante (18 °C à 22 °C). Vérifier tous les ans sa concentration par titrage à l'aide d'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique).

3.3 Solution de travail de chlorure de calcium, $\rho(\text{CaCl}_2) = 0,5$ g/l. Utiliser la masse volumique de la solution mère de chlorure de calcium (3.2) pour calculer la masse nécessaire pour obtenir une concentration finale en chlorure de calcium de 0,5 g/l dans la solution de travail.

Il convient que la masse de la solution soit équivalente à l'ajout de 2,00 ml de solution mère avec une concentration exacte de $\rho(\text{CaCl}_2) = 500$ g/l, auquel cas la masse de la solution est ~ 2,70 g.

1) Chr. Hansen's A/S, Hvidovre, Danemark, est un exemple de fournisseur approprié. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du fournisseur ainsi désigné.

Il est recommandé de peser la solution mère de chlorure de calcium (3.2) pour pouvoir préparer la solution de travail, car la solution visqueuse est difficile à prélever avec une pipette.

Dans une fiole jaugée à un trait de 2 000 ml, peser à 0,01 g près, environ 2,70 g de solution mère de chlorure de calcium (3.2) de concentration connue avec précision, à température ambiante (18 °C à 22 °C). Compléter jusqu'au trait avec de l'eau et mélanger. La solution de chlorure de calcium doit être fraîchement préparée le jour même de son utilisation.

NOTE En alternative, une solution intermédiaire de chlorure de calcium à 50 g/l peut être préparée et ensuite diluée avant emploi.

3.4 Poudres de lait à faible teneur en matière grasse, séchées par atomisation à basse température, présentant une bonne coagulation et une bonne qualité bactériologique.

NOTE Des poudres de lait à faible teneur en matière grasse, séchées par atomisation à basse température et conformes à ces exigences sont disponibles dans le commerce.^{1) 2)}

3.5 Poudre étalon de référence de coagulant microbien (*Rhizomucor miehei*), contenue dans des ampoules en verre. L'activité totale de coagulation du lait est indiquée sur les étiquettes des ampoules.

Conserver la poudre étalon de référence de coagulant microbien à une température de -18 °C, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Pour de courtes périodes, par exemple pendant le transport, la poudre peut être conservée à température ambiante.

La poudre étalon de référence de coagulant microbien est un étalon de référence primaire; un étalon liquide secondaire peut être réalisé et utilisé si l'obtention du même résultat est garantie.

L'activité totale de coagulation du lait de la poudre étalon de référence de coagulant microbien reconnue à l'échelle internationale (*R. miehei*) est la quantité d'activité établie par rapport au premier lot de poudre étalon de référence de présure de veau reconnue à l'échelle internationale, défini comme contenant 1 000 IMCU/g (voir l'ISO 11815|FIL 157^[6]).
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-61437016475m/iso-15174-2012>

NOTE 1 L'activité totale de coagulation du lait est exprimée en pourcentage de la moyenne arithmétique des résultats d'essai.

L'activité totale de coagulation du lait de la poudre étalon de référence de coagulant microbien figure sur les ampoules en verre et/ou est indiquée sur le certificat fourni. Il est exigé que les futures préparations d'étalons de référence microbiens soient définies par rapport aux lots antérieurs d'étalons de référence microbiens.

NOTE 2 L'activité protéolytique totale (coagulation du lait) de la poudre étalon de référence de coagulant microbien est vérifiée tous les deux ans par une méthode alternative, par exemple sur un substrat à base d'hexapeptide synthétique du NIZO³⁾.

La poudre étalon de référence de coagulant microbien, reconnue à l'échelle internationale, est commercialement disponible auprès de DSM Food Specialities⁴⁾.

2) Cecalait, Poligny, France, est un exemple de fournisseur approprié. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du fournisseur ainsi désigné.

3) NIZO Food Research BV, Ede, Pays-Bas, est un exemple de fournisseur approprié. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du fournisseur ainsi désigné.

4) DSM Food Specialties, Dairy Ingredients Group, Delft, Pays-Bas, est un exemple de fournisseur approprié. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuvent ou recommandent l'emploi exclusif du fournisseur ainsi désigné.

4 Appareillage

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

4.1 Micropipette ou toute autre pipette, permettant l'écoulement de 0,5 ml en moins de 1 s avec une répétabilité de 0,2 % ou mieux.

4.2 Pipettes à un trait, permettant une distribution des volumes appropriés, ISO 648^[1], classe A.

Un **diluteur** (par exemple un diluteur Hamilton) ayant la même précision peut également être utilisé pour diluer les coagulants. Pour mesurer le substrat, une **seringue** ou un **distributeur** permettant la distribution de la quantité appropriée, avec une répétabilité de 0,4 %, peut également être utilisé.

4.3 Fioles jaugées à un trait, avec les capacités requises, ISO 1042^[3], classe A.

4.4 Thermomètre, étalonné, gradué entre 20 °C et 45 °C, d'une précision de $\pm 0,1$ °C.

4.5 pH-mètre, pouvant être lu à 0,01 unité pH près.

4.6 Balance analytique, pouvant être lue à 1 mg près.

4.7 Chronomètre, pouvant être lu à la seconde près.

4.8 Fioles ou tubes à essai, pour l'essai de coagulation du lait, d'une capacité appropriée (voir 7.4).

4.9 Bain-marie, pouvant être maintenu à une température de $32\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et à une température constante à $\pm 0,2\text{ °C}$ près. Il convient que le bain-marie soit équipé des dispositifs suivants.

4.9.1 Moteur électrique, avec un axe rotatif permettant la fixation de la fiole ou des tubes à essai (4.8), de façon à leur imprimer un mouvement rotatif à un angle approprié d'environ 30° par rapport à la surface du bain-marie.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/08b079d9-a315-4791-8e1f-fc143f28ee97/iso-15174-2012>

NOTE La fréquence de rotation n'a pas d'importance pour la présente Norme internationale. Une fréquence de rotation de 2 r/min à 4 r/min convient.

4.9.2 Ampoule électrique, positionnée de façon à éclairer efficacement la fiole ou le tube à essai (4.8).

NOTE Un écran fournissant un arrière-plan sombre, placé dans le bain-marie, peut être utilisé afin de mieux observer la coagulation du lait dans la fiole ou dans le tube à essai.

5 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée pour un coagulant microbien liquide (6.1) est donnée dans l'ISO 707|FIL 50:2008^[2], Article 9 et pour un coagulant microbien en poudre (6.2) dans l'ISO 707|FIL 50:2008^[2], Article 13.

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

Conserver les échantillons pour essai à l'abri de la lumière à une température comprise entre 0 °C et 5 °C.