

NORME
INTERNATIONALE

ISO
11816-2

FIL
155-2

Deuxième édition
2016-08-15

**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: Fluorimetric method for cheese

ISO 11816-2:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/e8b0498e-3044-4067-8b63-e8a5d58e4bba/iso-11816-2-2016>



Numéros de référence
ISO 11816-2:2016(F)
FIL 155-2:2016(F)

© ISO et FIL 2016

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 11816-2:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/e8b0498e-3044-4067-8b63-e8a5d58e4bba/iso-11816-2-2016>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2016, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B • B-1030 Brussels
Tel. + 32 2 325 67 40
Fax + 32 2 325 67 41
info@fil-idf.org
www.fil-idf.org

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Réactifs	2
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	4
9 Mode opératoire	5
9.1 Vérification des performances de l'instrument	5
9.1.1 Généralités	5
9.1.2 Essais de contrôle quotidien des instruments	5
9.1.3 Contrôles	5
9.2 Contrôles de réactifs pour évaluer l'adéquation du substrat de travail prêt à l'emploi (5.3)	6
9.3 Étalonnage	6
9.4 Détermination	7
9.5 Contrôles relatifs aux échantillons pour essai	8
9.5.1 Essais recommandés de contrôle négatif et positif	8
9.5.2 Essai de substance interférente	8
9.5.3 Essais de contrôle de la phosphatase alcaline microbienne stable à la chaleur	8
10 Calcul et expression des résultats	9
10.1 Rapport d'étalonnage	9
10.2 Calcul	9
10.2.1 Surnageant	9
10.2.2 Fromage	10
10.3 Expression des résultats	10
11 Fidélité	10
11.1 Essai interlaboratoires	10
11.2 Répétabilité	10
11.3 Reproductibilité	10
12 Rapport d'essai	10
Annexe A (informative) Essais interlaboratoires	12
Annexe B (informative) Exemples de préparation d'un échantillon pour essai	14
Bibliographie	16

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](#).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers* ainsi que la Fédération internationale du lait (FIL). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette deuxième édition de l'ISO 11816-2|FIL 155-2 annule et remplace la première édition (ISO 11816-2|FIL 155-2:2003), qui a fait l'objet d'une révision technique.

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*

La FIL (Fédération internationale du lait) est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement sur toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/patents).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

L'ISO 11816|FIL 155 a été élaborée par le Comité permanent de la FIL chargé des *Méthodes d'analyse pour les auxiliaires technologiques et indicateurs* et par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*.

L'ensemble des travaux a été confié au groupe de projet mixte ISO/FIL relatif à l'*Activité de la phosphatase alcaline dans le fromage (P06)*, du Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse pour les auxiliaires technologiques et indicateurs*, sous la conduite de son chef de projet, Mme M. Nicolas (France).

La présente Norme internationale ISO 11816-2|FIL 155-2 annule et remplace l'ISO 11816-2|FIL 155-2:2003, qui a fait l'objet d'une révision technique.

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*

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 (ALP, EC 3.1.3.1) dans le fromage.

La présente méthode est applicable aux fromages à pâte molle, pâte pressée non cuite et pâte pressée cuite, à condition que la moisissure ne soit présente que sur la surface du fromage et ne se soit pas propagée à l'intérieur, comme dans le cas des fromages veinés de bleu, par exemple. Pour les gros fromages à pâte pressée cuite, des conditions d'échantillonnage spécifiques s'appliquent (voir [l'Article 7](#)).

L'instrument permet de détecter des activités dans le surnageant de l'ordre de 7 000 milliunités par litre (mU/l).

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 5725-1, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions*.

ISO 5725-2, *Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée*.

3 Termes et définitions

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

3.1

activité de la phosphatase alcaline

activité ALP

activité de la phosphatase alcaline présente dans le produit, déterminée suivant le mode opératoire décrit

Note 1 à l'article: L'activité de la phosphatase alcaline est exprimée en milliunités d'activité enzymatique par gramme d'échantillon (mU/g).

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

4 Principe

L'activité de la phosphatase alcaline de l'échantillon se mesure en effectuant un essai cinétique direct fluorimétrique continu. Un substrat d'ester monophosphorique aromatique non fluorescent, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate, en présence de phosphatase alcaline issue de l'échantillon, subit une hydrolyse de son radical phosphate et produit un composé hautement fluorescent. Le mesurage fluorimétrique de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP) est effectué à 38 °C sur une période de 3 min lorsque l'on utilise le Fluorophos^{®1)}. Ce mesurage comprend la préincubation du substrat et de l'échantillon, suivie de plusieurs lectures cinétiques de la vitesse de réaction.

NOTE Bien que l'essai dure 3 min, la première minute est une période d'équilibrage afin de s'assurer que l'échantillon est à 38 °C. Les mesurages d'activité sont en effet réalisés du début de la deuxième minute à la fin de la troisième minute (c'est-à-dire sur une période de 2 min).

5 Réactifs

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

5.1 Substrat Fluorophos^{®2)} en flacons, contenant chacun 144 mg de poudre de substrat Fluorophos[®], masse molaire de 580 grammes par mole.

Il s'agit d'un substrat d'ester monophosphorique aromatique non fluorescent, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate.

Ce substrat reste stable pendant 2 ans après sa date de fabrication lorsqu'il est conservé, dans le flacon non ouvert, à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Garder à l'abri de la lumière.

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

La solution tampon de substrat reste stable pendant 2 ans après sa date de fabrication lorsqu'elle est conservée, dans le flacon non ouvert, à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Garder à l'abri de la lumière.

5.3 Substrat de travail

Amener le substrat Fluorophos[®] (5.1) et la solution tampon de substrat (5.2) à température ambiante. Ajouter le contenu d'un flacon de solution tampon de substrat (240 ml) (5.2) à un flacon de substrat Fluorophos[®] (144 mg) (5.1) et mélanger avec soin en retournant pendant 3 min. Utiliser du verre de couleur ambre pour le protéger de la lumière.

Laisser la solution ainsi obtenue reposer à température ambiante pendant au moins 30 min avant utilisation.

Utiliser l'essai analogique/numérique (A/D) donné en 9.2 pour vérifier que le substrat de travail prêt pour utilisation est bon. Ne pas utiliser le substrat de travail en cas d'obtention d'une valeur supérieure à 1 200 FLU (unités de fluorescence).

1) Fluorophos est une marque déposée. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ces produits. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2) Les réactifs spécifiés en 5.1 à 5.6 et les appareils spécifiés en 6.1 à 6.4 (sauf 6.3.1) sont commercialisés par la société Advanced Instruments, Inc., Two Technology Way, Norwood, Massachusetts 02062, États-Unis. La configuration des emballages fournis avec le Fluorophos Test System peut être modifiée par le fabricant. Il convient que l'utilisateur se réfère aux instructions du fabricant pour la préparation des réactifs s'ils se révèlent différents de ceux spécifiés dans le présent document. Fluorophos et Fluoroyellow sont des marques déposées d'Advanced Instruments, Inc. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ces produits.

Le substrat de travail reste stable pendant 60 jours lorsqu'il est conservé à l'abri de la lumière à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, ou pendant 6 h à 38 °C.

5.4 Solutions étalons de travail, Fluoroyellow® (FY) [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole] dans une solution tampon de substrat (5.2).

Les solutions étalons de travail restent stables pendant 18 mois après leur date de fabrication lorsqu'elles sont conservées, dans le flacon non ouvert, à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

5.4.1 Solution étalon A, contenant 0 µmol/l de Fluoroyellow®.

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

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

5.5 Solution de contrôle quotidien des instruments, contenant $34,48 \times 10^{-3}$ µmol/l de Fluoroyellow®.

La solution de contrôle quotidien des instruments reste stable pendant 18 mois après sa date de fabrication lorsqu'elle est conservée, dans le flacon non ouvert, à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

5.6 Tampon d'extraction de fromage Fluorophos®, tampon de diéthanolamine (DEA), pH 8,0 avec magnésium et Triton X-100.

Le tampon d'extraction de fromage reste stable pendant 3 ans après sa date de fabrication lorsqu'il est conservé, dans le flacon non ouvert, à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

5.7 Contrôles positif, négatif et Phosphacheck-N™.

6 Appareillage

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

6.1 Fluorimètre à filtre, avec un support de cuvettes à contrôle thermostatique, capable de fonctionner à $38 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ et avec une optique à angle droit, permettant une excitation à une longueur d'onde de 440 nm et une émission entre 520 nm et 560 nm [instrument Fluorophos®¹⁾ par exemple].

6.2 Cuvettes, jetables, en verre non fluorescent, de 12 mm de diamètre et de 75 mm de longueur.

6.3 Pipettes

6.3.1 Pipettes, de 2,0 ml et 3,0 ml de capacité.

6.3.2 Pipette à déplacement positif ou pipette à piston, de 0,075 ml de capacité.

6.4 Bloc chauffant, pouvant maintenir une température de $38 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ et pouvant contenir des cuvettes.

6.5 Film plastique de paraffine (par exemple Parafilm®³⁾ ou autre film approprié de qualité pour laboratoire.

6.6 Agitateur/mélangeur vortex

6.7 Broyeur

6.8 Bécher en verre, de 5 ml (d'environ 20 mm de diamètre et 30 mm de longueur) et 10 ml (d'environ 25 mm de diamètre et 30 mm de longueur) de capacité.

6.9 Homogénéisateur à haute vitesse (par exemple Ultra turrax®³⁾) fourni avec une tige d'environ 6 mm à 8 mm de diamètre.

6.10 Fioles jaugées à un trait, de 25 ml de capacité.

6.11 Centrifugeuse, pouvant centrifuger à 1 000g à 4 °C.

6.12 Tube à essai en verre, d'environ 12 mm de diamètre et 10 cm de longueur.

6.13 Pipette Pasteur en verre, une pipette à piston peut également être utilisée.

6.14 Bain d'eau, pouvant maintenir une température de $63\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

7 Échantillonnage

Il convient d'envoyer un échantillon représentatif au laboratoire. Il convient qu'il n'ait été ni endommagé ni altéré au cours 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|FIL 50^[1].

Toutefois, l'ISO 707|FIL 50 ne convient pas pour les gros fromages à pâte pressée cuite où le mélange de caillé et de lactosérum a été chauffé à des températures supérieures à 50 °C. Si le fromage est fabriqué à partir de lait cru, l'activité ALP n'est pas répartie de façon homogène dans ces fromages. L'activité est 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 voire indétectable au centre de la meule.

Des échantillons de gros fromages à pâte pressée cuite de 1 cm doivent donc être prélevés à 0,5 cm au-dessous de la croûte du bord arrondi (voir [Figure B.1](#)).

Si l'on ne sait pas s'il s'agit d'un fromage à pâte pressée cuite ou non cuite, effectuer l'échantillonnage comme pour un gros fromage à pâte pressée cuite.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Retirer la croûte ou la surface de l'échantillon pour essai avec un couteau propre. S'assurer que l'échantillon pour essai n'est pas contaminé par des micro-organismes de surface pendant sa préparation. En particulier pour les fromages à pâte molle dont la surface est fleurie, retirer toute la croûte mais sur une partie aussi fine que possible, de façon à ne pas éliminer la partie grasse sous la surface fleurie (voir [Figure B.2](#)). Pour les gros fromages à pâte pressée cuite, procéder comme décrit à [l'Article 7](#). Broyer l'échantillon pour essai à l'aide d'un mixer ou de tout autre dispositif approprié ([6.7](#)) et bien mélanger. Conserver l'échantillon préparé dans un récipient étanche à l'air.

3) Parafilm® et Ultra Turrax® sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs du présent document et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ces produits.