

PROJET DE NORME INTERNATIONALE  
**ISO/DIS 11816-2**  
**FIL 155-2**

ISO/TC 34/SC 5

Secrétariat: NEN

Début de vote:  
2014-07-10

Vote clos le:  
2014-12-10

---

---

**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: Fluorometric method for cheese*

ICS: 67.100.30

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e8b0498e-3044-4067-8b63-e8a5d58e4bba/iso-11816-2-2016>

CE DOCUMENT EST UN PROJET DIFFUSÉ POUR OBSERVATIONS ET APPROBATION. IL EST DONC SUSCEPTIBLE DE MODIFICATION ET NE PEUT ÊTRE CITÉ COMME NORME INTERNATIONALE AVANT SA PUBLICATION EN TANT QUE TELLE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

**TRAITEMENT PARRALLÈLE ISO/CEN**

Le présent projet a été élaboré dans le cadre de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et soumis selon le mode de collaboration **sous la direction de l'ISO**, tel que défini dans l'Accord de Vienne.

Le projet est par conséquent soumis en parallèle aux comités membres de l'ISO et aux comités membres du CEN pour enquête de cinq mois.

En cas d'acceptation de ce projet, un projet final, établi sur la base des observations reçues, sera soumis en parallèle à un vote d'approbation de deux mois au sein de l'ISO et à un vote formel au sein du CEN.

Pour accélérer la distribution, le présent document est distribué tel qu'il est parvenu du secrétariat du comité. Le travail de rédaction et de composition de texte sera effectué au Secrétariat central de l'ISO au stade de publication.



Numéro de référence  
ISO/DIS 11816-2:2014(F)  
FIL 155-2:2014(F)

© ISO et FIL 2014

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e8b0498e-3044-4067-8b63-e8a5d58e4bba/iso-11816-2-2016>

### Notice de droit d'auteur

Ce document de l'ISO est un projet de Norme internationale qui est protégé par les droits d'auteur de l'ISO. Sauf autorisé par les lois en matière de droits d'auteur du pays utilisateur, aucune partie de ce projet ISO ne peut être reproduite, enregistrée dans un système d'extraction ou transmise sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, les enregistrements ou autres, sans autorisation écrite préalable.

Les demandes d'autorisation de reproduction doivent être envoyées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Toute reproduction est soumise au paiement de droits ou à un contrat de licence.

Les contrevenants pourront être poursuivis.

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Termes et définitions</b> .....	1
3 <b>Principe</b> .....	1
4 <b>Réactifs</b> .....	2
5 <b>Appareillage</b> .....	3
6 <b>Échantillonnage</b> .....	4
7 <b>Préparation de l'échantillon pour essai</b> .....	4
8 <b>Mode opératoire</b> .....	4
9 <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	8
10 <b>Fidélité</b> .....	10
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	10
<b>Annexe A (informative) Essais interlaboratoires</b> .....	11
<b>Annexe B (informative) Exemples de préparation d'un échantillon pour essai</b> .....	13
<b>Bibliographie</b> .....	15

**ITeH STANDARD PREVIEW**  
 (standards.iteh.ai)  
 Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ec10498e-3044-4067-8b63-e8a5d58e4bbaf/iso-11816-2-2015>

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/IEC, 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.

Le comité technique chargé de l'élaboration de l'ISO 11816-2 est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*.

Cette deuxième/troisième/... édition annule et remplace la première/deuxième/... édition (ISO 11816-2 | FIL 155-2:2003), dont [le ou les article(s) / paragraphe(s) / tableau(x) / figure(s) / annexe(s)] [a / ont] fait l'objet d'une révision technique.

L'ISO 11816 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*

## Avant-propos

La FIL (Fédération Internationale du Lait) est une fédération mondiale du secteur laitier ayant un comité national dans chaque pays membre. 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 du lait et des produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les équipes d'action et les comités permanents sont soumis aux comités nationaux pour vote. 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 11816-2 | FIL 155-2 a été élaborée par la Fédération internationale du lait (FIL) et par 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 réalisé par le Groupe de projet mixte ISO-FIL relatif à l'Activité de la phosphatase alcaline dans le fromage (P06), du Comité permanent chargé des Méthodes analytiques pour les aides et indicateurs de procédés industriels, sous la conduite de son chef de projet, Mme M. Nicolas (France).

La présente édition de l'ISO 11816-2 | FIL 155-2 annule et remplace sa 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*

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

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

# 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 soit pas propagée à l'intérieur, comme dans le cas des fromages veinés de bleu, par exemple.

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

NOTE Les gros fromages à pâte pressée cuite ou le mélange de caillé et de lactosérum est chauffé à des températures supérieures à 50 °C conservent des températures élevées pendant une durée relativement longue, notamment au centre de ces fromages, ce qui favorise l'inactivation de la phosphatase. Pour déterminer l'activité de la phosphatase alcaline dans ce type de fromage, un échantillonnage spécifique pour le fromage doit être appliqué (voir l'article 6).

## 2 Termes et définitions

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

### 2.1

#### **activité de la phosphatase alcaline** **activité ALP**

activité de la phosphatase alcaline présente dans le produit, déterminée suivant le mode opératoire décrit dans la présente partie de l'ISO 11816 | FIL 155

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

### 2.2

#### **unité d'activité de la phosphatase alcaline**

quantité d'enzyme phosphatase alcaline qui catalyse la transformation de 1  $\mu$ mol de substrat par minute

## 3 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<sup>®</sup>. 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'équilibration 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).

## 4 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.

**4.1 Substrat Fluorophos<sup>®1)</sup>** en flacons, contenant chacun 144 mg de poudre de substrat Fluorophos<sup>®</sup>.

Il s'agit d'un substrat d'ester monophosphorique aromatique non fluorescent, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazole phosphate (Fluorophos<sup>®</sup>).

Le substrat Fluorophos<sup>®</sup> reste stable pendant 2 ans après sa date de fabrication lorsqu'il est conservé, dans le flacon non ouvert, entre 2 °C et 8 °C.

**4.2 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, entre 2 °C et 8 °C.

**4.3 Substrat de travail**

Amener un flacon de substrat Fluorophos<sup>®</sup> (4.1) et un flacon de solution tampon de substrat (4.2) à température ambiante. Ajouter le contenu d'un flacon de solution tampon de substrat (240 ml) (4.2) à un flacon de substrat Fluorophos<sup>®</sup> (144 mg) (4.1) et mélanger avec soin en retournant doucement pendant 3 min.

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 8.2.1 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 1200 FLU.

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

**4.4 Solutions étalons de travail**, Fluoroyellow<sup>®</sup> (FY) [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole] dans une solution tampon de substrat (4.2).

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

Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

1) Les réactifs spécifiés en 4.1 à 4.6 et les appareils spécifiés en 5.1 à 5.4 (sauf 5.3.1) 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 de Advanced Instruments, Inc. 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 de ces produits.

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

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

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

**4.5 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, entre 2 °C et 8 °C.

Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

**4.6 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, entre 2 °C et 8 °C.

## 5 Appareillage

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

**5.1 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 [appareillage Fluorophos®<sup>(1)</sup> par exemple].

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

**5.3 Pipettes**

**5.3.1 Pipettes**, de 2,0 ml et 3,0 ml de capacité.

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

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

**5.5 Parafilm®<sup>(2)</sup>** ou autre film approprié de qualité pour laboratoire.

**5.6 Agitateur/mélangeur vortex**

**5.7 Broyeur**

**5.8 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.

**5.9 Ultra Turrax®<sup>(2)</sup>** fourni avec une tige d'environ 6 mm à 8 mm de diamètre.

**5.10 Fioles jaugées à un trait**, de 25 ml de capacité.

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

<sup>2)</sup> 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 de l'ISO 11816-2 | FIL 155-2 et ne saurait constituer un engagement de l'ISO ou de la FIL à l'égard de ces produits.

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

**5.13 Pipette Pasteur en verre ; une pipette à piston peut également être utilisée.**

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

## 6 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, voir [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  $50\text{ °C}$ . 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. (Annexe B).

NOTE 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.

## 7 Préparation de l'échantillon pour essai

### 7.1 Préparation

Retirer la croûte ou la surface de l'échantillon d'essai avec un couteau propre. S'assurer que l'échantillon d'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 (Annexe B). Pour les gros fromages à pâte pressée cuite, procéder comme décrit à l'article 6. Broyer l'échantillon pour essai à l'aide d'un mixer ou de tout autre dispositif approprié (5.7) et bien mélanger. Conserver l'échantillon préparé dans un récipient étanche à l'air.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Vérification des performances de l'appareillage

#### 8.1.1 Généralités

Il est important de vérifier les performances de l'appareillage en matière d'écarts, de lumière parasite et de stabilité avant de procéder à l'analyse des échantillons pour essai. Veiller à utiliser le fluorimètre à filtre (5.1) conformément aux principes de bonnes pratiques de laboratoire.

Les essais réalisés dans le cadre du contrôle qualité comprennent :

- a) l'essai quotidien A/D (analogique/numérique) utilisé pour vérifier le bon fonctionnement de l'équipement,
- b) l'essai pour le contrôle quotidien de l'appareillage en utilisant la solution de contrôle quotidien de l'instrument (4.5) pour identifier tout écart électronique ou optique du fluorimètre, et