

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
27105

FIL  
216

Première édition  
2016-04-01

---

---

**Lait et fromages — Détermination de  
la teneur en lysozyme de blanc d'oeuf  
par chromatographie liquide haute  
performance**

*Milk and cheese — Determination of hen's egg white lysozyme  
content by high performance liquid chromatography*

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

[ISO 27105:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb-b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb-  
b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb-b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016)



Numéros de référence  
ISO 27105:2016(F)  
FIL 216:2016(F)

© ISO et FIL 2016

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

ISO 27105:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb-b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016>



### 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

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vi</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Principe</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Réactifs et substances de référence</b> .....	<b>1</b>
4.1    Réactifs et matériaux.....	1
4.2    Lysozyme.....	2
<b>5</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>7</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>3</b>
7.1    Préparation de la solution étalon de lysozyme.....	3
7.1.1    Solution étalon mère de lysozyme.....	3
7.1.2    Solution étalon de travail de lysozyme.....	3
7.2    Prise d'essai.....	3
7.2.1    Lait.....	3
7.2.2    Fromage.....	3
7.2.3    Préparation de la solution pour essai.....	3
7.3    Détermination par CLHP.....	4
7.3.1    Conditions chromatographiques.....	4
<b>8</b> <b>Calcul et expression des résultats</b> .....	<b>5</b>
8.1    Étalonnage à un seul point.....	5
8.2    Expression des résultats.....	6
<b>9</b> <b>Fidélité</b> .....	<b>6</b>
9.1    Essai interlaboratoires.....	6
9.2    Répétabilité.....	6
9.3    Reproductibilité.....	6
<b>10</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>6</b>
<b>Annexe A (informative) Vérification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM)</b> .....	<b>8</b>
<b>Annexe B (informative) Essai interlaboratoires</b> .....	<b>10</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>11</b>

## 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](http://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](http://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'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [Avant-propos — Informations supplémentaires](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/65448454-6666-46eb-b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016).

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 première édition de l'ISO 27105|FIL 216 annule et remplace l'ISO/TS 27105|FIL/MR 216:2009, qui a fait l'objet d'une révision technique.

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/brevets](http://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.

L'ISO 27105|FIL 216 a été élaborée par le Comité permanent de la FIL chargé des *Méthodes d'analyse des additifs et contaminants* 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, *Détermination de la teneur en lysozyme de blanc d'œuf par chromatographie liquide haute performance* du Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse des additifs et contaminants*, sous la conduite de leurs chefs de projet, T. Berger (CH) et Prof. L. Pellegrino (IT).

Cette première édition de l'ISO 27105|FIL 216 annule et remplace l'ISO/TS 27105|FIL/MR 216:2009, qui a fait l'objet d'une révision technique.

## **Introduction**

Le lysozyme (EC 3.2.1.17, muramidase) est une enzyme très répandue dans la nature; elle est présente, par exemple, dans le blanc d'œuf (environ 3 % à 4 %), la salive et les larmes. Le lysozyme a un effet conservateur en raison de l'activité lytique sur la paroi de la cellule de certaines bactéries. Le lysozyme de blanc d'œuf est utilisé dans la fabrication du fromage afin d'empêcher le gonflement tardif des fromages à pâte demi-dure ou dure.

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

[ISO 27105:2016](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb-b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb-b163-126fe49d0c75/iso-27105-2016>

# Lait et fromages — Détermination de la teneur en lysozyme de blanc d'œuf par chromatographie liquide haute performance

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour la détermination quantitative de la teneur en lysozyme de blanc d'œuf dans le lait et les fromages.

La méthode est adaptée au mesurage de faibles niveaux de lysozyme de blanc d'œuf, avec une limite de quantification de 10 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'œuf

fraction massique de substance, déterminée selon le mode opératoire spécifié

Note 1 à l'article: 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 du fromage à pH 4,3 (fromage) ou à pH 2,2 (lait), puis détermination du lysozyme de blanc d'œuf 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 couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) (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 pureté équivalente.

### 4.1 Réactifs et matériaux

#### 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 Acide chlorhydrique, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ .

Dissoudre 4,0 ml d'acide chlorhydrique de fraction massique 37 % dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml. Compléter au trait de jauge avec de l'eau.

#### 4.1.3 Hydroxyde de sodium, $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ .

Dissoudre 2,6 ml d'hydroxyde de sodium de fraction massique 50 % dans une fiole jaugée à un trait de 50 ml. Compléter au trait de jauge avec de l'eau.

4.1.4 **Acide trifluoroacétique** (CF<sub>3</sub>COOH), qualité analytique.

4.1.5 **Acétonitrile**, (CH<sub>3</sub>CN), qualité CLHP.

4.1.6 **Eau**, qualité CLHP.

## 4.2 Lysozyme

Lysozyme de blanc d'œuf pur<sup>1)</sup>. Un lysozyme suffisamment pur et caractérisé est difficile à obtenir. Il est nécessaire de contrôler la variabilité d'un lot à l'autre.

## 5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, les matériels suivants:

5.1 **pH-mètre**, ayant une précision de 0,1 unité.

5.2 **Filtre cylindrique**, de diamètre 15 cm<sup>2)</sup>.

5.3 **Membrane filtrante**, de taille de pore 0,22 µm<sup>3)</sup>.

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**.

ISO 27105:2016

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/63448434-66bb-46eb->

5.7 **Homogénéisateur**<sup>4)</sup>, capable de tourner à une fréquence de rotation de 3 000 tr/min à 3 500 tr/min.

5.8 **Matériel de CLHP**.

5.8.1 **Système de pompage permettant de réaliser une élution par gradient**, capable de fonctionner à une vitesse de 1,0 ml/min.

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

5.8.3 **Four à colonne**, capable de maintenir une température de 45 °C ± 2 °C.

---

1) Lysozyme SIGMA L-6876 est un exemple de produit disponible sur le marché. 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 ce produit.

2) Fluted filter Schleicher&Schuell 595 ½ est un exemple de produit disponible sur le marché. 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 ce produit.

3) Millipore Millex-GV PVDF 0,22 µm est un exemple de produit disponible sur le marché. 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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4) Ultra turrax® est un exemple de produit disponible sur le marché. 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 ce produit. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

**5.8.4 Colonne**, phase inverse<sup>5)</sup>, 5 µm, 250 mm × 4,6 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.

## 6 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est indiquée dans l'ISO 707|FIL 50.<sup>[1]</sup>

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, n'ayant été ni endommagé, ni modifié lors du transport ou du stockage.

## 7 Mode opératoire

### 7.1 Préparation de la solution étalon de lysozyme

#### 7.1.1 Solution étalon mère de lysozyme

Peser, à 0,01 mg près, 10 mg de lysozyme (4.2) dans une fiole jaugée à un trait de 10 ml et attendre la dissolution complète. Compléter au trait de jauge avec la solution de chlorure de sodium (4.1.1).

Préparer les solutions étalons 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, introduire à la pipette 80 µl de solution étalon mère de lysozyme (voir 7.1.1). Compléter au trait de jauge avec la solution de chlorure de sodium (4.1.1).

La solution étalon de travail de lysozyme obtenue contient 8,0 mg de lysozyme par litre.

### 7.2 Prise d'essai

#### 7.2.1 Lait

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

#### 7.2.2 Fromage

Avant la pesée, râper les échantillons de fromage pour essai. Peser, à 0,01 g près, 2,00 g d'échantillon pour essai dans un bécher de 100 ml.

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

#### 7.2.3 Préparation de la solution pour essai

Ajouter 20 ml de solution de chlorure de sodium (4.1.1) à la prise d'essai (voir 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.

Homogénéiser la solution pour essai pendant 30 s à l'aide de l'homogénéisateur (5.7) à une fréquence de rotation de 2 500 tr/min à 3 000 tr/min. Rincer l'homogénéisateur dans un bécher séparé de 100 ml

5) PLRP-S 300 Å (Polymer Laboratories, Royaume-Uni) est un exemple de produit disponible sur le marché. 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 ce produit.