



# Norme internationale

**ISO 11816-2**

**FIL 155-2**

## 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 11816-2:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8842b2a4-2819-429e-8e73-06f1e8a04879/iso-11816-2-2024>

**Troisième édition  
2024-01**

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

ISO 11816-2:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8842b2a4-2819-429e-8e73-06f1e8a04879/iso-11816-2-2024>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO et FIL 2024

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée 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 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +41 22 749 01 11

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

Publié en Suisse

International Dairy Federation  
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B  
B-1030 Brussels  
Tél.: + 32 2 325 67 40  
Fax: + 32 2 325 67 41  
E-mail: [info@fil-idf.org](mailto:info@fil-idf.org)  
Web: [www.fil-idf.org](http://www.fil-idf.org)

# Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b>	<b>iv</b>
<b>1 Domaine d'application</b>	<b>1</b>
<b>2 Références normatives</b>	<b>1</b>
<b>3 Termes et définitions</b>	<b>1</b>
<b>4 Principe</b>	<b>1</b>
<b>5 Réactifs</b>	<b>2</b>
<b>6 Appareillage</b>	<b>3</b>
<b>7 Échantillonnage</b>	<b>4</b>
<b>8 Préparation de l'échantillon pour essai</b>	<b>4</b>
<b>9 Mode opératoire</b>	<b>5</b>
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 Utilisation du FLM200	5
9.1.4 Utilisation du FLM300	5
9.1.5 Contrôles	6
9.2 Contrôles de réactifs pour évaluer l'adéquation du substrat de travail prêt à l'emploi (5.3)	6
9.3 Étalonnage	6
9.3.1 Généralités	6
9.3.2 Utilisation du FLM200	7
9.3.3 Utilisation du FLM300	7
9.4 Détermination	7
9.5 Contrôles relatifs aux échantillons pour essai	9
9.5.1 Essais recommandés de contrôle négatif et positif	9
9.5.2 Essai de substance interférente	9
9.5.3 Essais de contrôle de l'ALP microbienne stable à la chaleur	9
<b>10 Calcul et expression des résultats</b>	<b>9</b>
10.1 Rapport d'étalonnage	9
10.2 Calcul	10
10.2.1 Surnageant	10
10.2.2 Fromage	10
10.3 Expression des résultats d'essai	11
<b>11 Fidélité</b>	<b>11</b>
11.1 Essai interlaboratoires	11
11.2 Répétabilité	11
11.3 Reproductibilité	11
<b>12 Rapport d'essai</b>	<b>11</b>
<b>Annexe A (informative) Essai interlaboratoires</b>	<b>13</b>
<b>Annexe B (informative) Exemples de préparation d'un échantillon pour essai</b>	<b>15</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>17</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'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets). L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de brevet.

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 nature volontaire des normes, 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 [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et par la Fédération Internationale du Lait (FIL), en collaboration avec le comité technique CEN/TC 302, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse*, du Comité européen de normalisation (CEN), conformément à l'accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 11816-2 | FIL 155-2:2016), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- l'instrument FLM200 (qui a été abandonné) a été remplacé par la version FLM300;
- les instructions d'utilisation de l'instrument et le flux de ces instructions ont été révisés conformément au FLM300, qui dispose d'une interface utilisateur et d'un système électronique améliorés (l'essai ou la procédure d'essai n'ont pas été modifiés à la suite des modifications apportées au logiciel et à l'interface);
- le bloc chauffant, qui était un élément séparé, fait désormais partie de l'instrument.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 11816 | FIL 155 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

**ISO 11816-2:2024(fr)**  
**FIL 155-2:2024(fr)**

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.

La FIL attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. La FIL ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, la FIL n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets). La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

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.

Le présent document a été élaboré 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*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié au groupe de travail mixte ISO/FIL P19 du *Comité permanent chargé des Méthodes d'analyse pour les auxiliaires technologiques et indicateurs*, sous la conduite de son chef de projet, M. Rick Zampa (États-Unis).

ISO 11816-2:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/8842b2a4-2819-429e-8e73-06f1e8a04879/iso-11816-2-2024>



# Lait et produits laitiers — Détermination de l'activité de la phosphatase alcaline —

## Partie 2: Méthode fluorimétrique pour le fromage

### 1 Domaine d'application

Le présent document 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 utilisé pour la détermination de l'ALP peut lire des activités jusqu'à 7 000 mU/kg (milliunités par kilogramme).

### 2 Références normatives

Le présent document ne contient aucune référence normative.

### 3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

#### 3.1 activité de la phosphatase alcaline activité ALP

activité de l'enzyme présente dans le produit, déterminée suivant le mode opératoire spécifié

Note 1 à l'article: L'activité ALP est exprimée en milliunités d'activité enzymatique par kilogramme d'échantillon (mU/kg).

### 4 Principe

L'activité ALP 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 d'ALP issue de l'échantillon, subit une hydrolyse de son radical phosphate et produit un composé hautement fluorescent. Le mesurage fluorimétrique de l'activité ALP est effectué à 38 °C

sur une période de 3 min lorsque l'on utilise un Fluorophos<sup>®1)</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'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

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, sauf indication contraire, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente.

Les réactifs spécifiés en 5.1 à 5.7 et les appareils spécifiés en 6.1 à 6.4 (sauf 6.3.1) comprennent le Fluorophos<sup>®</sup> Test System<sup>2)</sup>. La configuration des emballages fournis avec le Fluorophos<sup>®</sup> 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.

**5.1 Substrat Fluorophos<sup>®</sup>** en flacons, contenant chacun 144 mg de poudre de substrat Fluorophos<sup>®</sup>, masse molaire de 580 g/mol.

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, entre 2 °C et 8 °C. Garder à l'abri de la lumière.

**5.2 Solution tampon de substrat**, solution tampon de diéthanolamine (DEA),  $c(\text{DEA}) = 2,4 \text{ mol/l}$ , avec valeur de 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. Garder à l'abri de la lumière.

### 5.3 Substrat de travail

Amener le substrat Fluorophos<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> (144 mg) (5.1) et mélanger avec soin en retournant pendant 3 min. Utiliser du verre de couleur ambre pour protéger le produit 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 9.1.3 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).

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 lorsqu'il est conservé à 38 °C.

---

1) Fluorophos<sup>®</sup> est la marque déposée d'un produit distribué par Advanced Instruments, LLC. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.

2) Le Fluorophos<sup>®</sup> Test System est l'appellation commerciale d'un produit distribué par Advanced Instruments, LLC. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils aboutissent aux mêmes résultats.



**5.4 Solutions étalons**, Fluoroyellow<sup>®3)</sup> (FY) [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazole] dans une solution tampon de substrat (5.2).

Les solutions étalons restent stables pendant 18 mois après leur date de fabrication lorsqu'elles sont conservées dans des flacons non ouverts 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<sup>®</sup>.

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

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

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

La solution de contrôle quotidien des instruments reste stable pendant 18 mois après sa date de fabrication lorsqu'elle est conservée dans des flacons non ouverts entre 2 °C et 8 °C. Mélanger doucement avant utilisation pour obtenir des résultats optimaux.

**5.6 Tampon d'extraction de fromage Fluorophos<sup>®</sup>**, tampon de diéthanolamine (DEA), valeur de 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.

**5.7 Contrôles positif, négatif et PhosphaCheck-N<sup>TM4)</sup>**.

## 6 Appareillage

Utiliser le 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<sup>®</sup>) 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.

---

3) Fluoroyellow<sup>®</sup> est la marque déposée d'un produit distribué par Advanced Instruments, LLC. 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 des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

4) Les contrôles et les instructions de contrôle des performances de l'instrument sont disponibles auprès d'Advanced Instruments, LLC. 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 des produits ainsi désignés. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

**6.5 Film plastique de paraffine** (par exemple Parafilm®<sup>5)</sup>) 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®<sup>6)</sup>) 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 1 000 *g* 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 °C ±1 °C.

## 7 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif ait été envoyé au laboratoire. Il convient qu'il n'ait été ni endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Une méthode d'échantillonnage recommandée est fournie dans l'ISO 707 | FIL 50.

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 couche externe de la meule, entre 0 cm et 4 cm sous la croûte du bord arrondi, mais très faible ou même indétectable au centre.

Par conséquent, les échantillons de gros fromages à pâte pressée cuite doivent être recueillis en prélevant une portion de 1 cm à 0,5 cm sous la croûte du bord arrondi (voir [Figure B.1](#)).

En cas de doute concernant le type de fromage (fromage à pâte pressée cuite ou fromage à pâte pressée non cuite), procéder à l'échantillonnage décrit pour les gros fromages 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

5) Parafilm® est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuve l'emploi du produit ainsi désigné.

6) ULTRA-TURRAX® est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO ou la FIL approuve l'emploi du produit ainsi désigné.