

## I

(Actes dont la publication est une condition de leur applicabilité)

## RÈGLEMENT (CEE) n° 2188/81 DE LA COMMISSION

du 28 juillet 1981

modifiant le règlement (CEE) n° 625/78 relatif aux modalités du stockage public du lait écrémé en poudre

LA COMMISSION DES COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES,

vu le traité instituant la Communauté économique européenne,

vu le règlement (CEE) n° 804/68 du Conseil, du 27 juin 1968, portant organisation commune des marchés dans le secteur du lait et des produits laitiers <sup>(1)</sup>, modifié en dernier lieu par l'acte d'adhésion de la Grèce, et notamment son article 7 paragraphe 5,

considérant que, à l'annexe I du règlement (CEE) n° 625/78 de la Commission <sup>(2)</sup>, modifié en dernier lieu par le règlement (CEE) n° 2937/80 <sup>(3)</sup>, définissant les conditions de qualité auxquelles doit répondre le lait écrémé en poudre pour être offert à l'intervention, figurent notamment certaines prescriptions relatives aux procédés d'analyse en vue du dépistage du lactosérum par le dosage de certains composants dans le lait écrémé en poudre; que la note 2 de ladite annexe a prévu de procéder à la fixation de valeurs limites communautaires à retenir pour lesdits composants, après une certaine période d'expérimentation dans les États membres;

considérant qu'il est à présent possible d'instaurer, sur le plan communautaire, une méthode d'analyse permettant la détermination du lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre par le dosage de l'acide sialique libre; qu'il convient toutefois de ne rendre obligatoire cette méthode de contrôle qu'après une certaine période destinée à familiariser les organismes de contrôle et les opérateurs avec ce procédé analytique;

considérant que les mesures prévues au présent règlement sont conformes à l'avis du comité de gestion du lait et des produits laitiers,

A ARRÊTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT :

*Article premier*

1. L'annexe I du règlement (CEE) n° 625/78 est modifiée comme suit :

a) au point 2 sous b), le texte du deuxième tiret est remplacé par le texte suivant :

« — lactosérum :

dosage de l'acide sialique libre <sup>(2)</sup> et/ou du complexe cystéine-cystéine pour autant qu'au moins une des trois épreuves obligatoires, à savoir celle des glycomacropéptides du lactosérum (déterminés par une épreuve simplifiée), celle des lactates ou celles des cendres, soit supérieure respectivement à 3 %, à 150 mg/100 g et à 8 % » ;

b) le texte de la note 2 est remplacé par le texte suivant :

« <sup>(2)</sup> En ce qui concerne la recherche du lactosérum présure par le dosage de l'acide sialique libre, la méthode d'analyse applicable à partir du 1<sup>er</sup> janvier 1982 est celle fixée à l'annexe IV.»

2. L'annexe du présent règlement est ajoutée comme annexe IV au règlement (CEE) n° 625/78.

*Article 2*

Le présent règlement entre en vigueur le troisième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel des Communautés européennes*.

<sup>(1)</sup> JO n° L 148 du 28. 6. 1968, p. 13.

<sup>(2)</sup> JO n° L 84 du 31. 3. 1978, p. 19.

<sup>(3)</sup> JO n° L 305 du 14. 11. 1980, p. 13.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 28 juillet 1981.

*Par la Commission*

*Le président*

Gaston THORN

## ANNEXE

## « ANNEXE IV

**RECHERCHE DU LACTOSÉRUM PRÉSURE DANS LE LAIT ÉCRÉMÉ EN POUDRE DESTINÉ AU STOCKAGE PUBLIC PAR LE DOSAGE DE L'ACIDE SIALIQUE LIBRE****1. Objet et domaine d'application**

Cette méthode permet la détermination du lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre destiné au stockage public.

**2. Principe de la méthode**

Lors de la coagulation du lait sous l'action de la présure, des glycomacropéptides de la caséine, ayant une teneur en acide sialique élevée, sont libérés. Le dosage de l'acide sialique (acide N-acétylneuraminique) permet d'établir la présence éventuelle de lactosérum présure dans le lait écrémé en poudre. Après reconstitution du lait, les glycomacropéptides renfermant l'acide sialique sont précipités par l'acide phosphotungstique à partir d'un filtrat trichloracétique à 12 %. L'acide sialique libéré par hydrolyse acide forme, avec le résorcinol, un complexe coloré mesuré par spectrophotométrie à 580 nm.

**3. Réactifs**

Tous les réactifs doivent être d'une pureté analytique. L'eau doit être distillée ou désionisée.

**3.1. Solution d'acide trichloracétique (TCA)**

Dissoudre 240 g d'acide trichloracétique dans de l'eau et compléter à 1 000 ml.

**3.2. Solution d'acide phosphotungstique**

Dissoudre 20 g d'acide phosphotungstique dans de l'eau et compléter à 100 ml.

**3.3. Éthanol à 95 % (v/v)****3.4. Solution d'acide sulfurique environ 0,1 N**

Diluer 28,1 ml d'acide sulfurique concentré (95 % de  $H_2SO_4$ ) dans de l'eau et compléter à 1 000 ml de manière à obtenir une solution d'acide sulfurique 1 N. Diluer 100 ml d'acide sulfurique 1 N dans de l'eau et compléter à 1 000 ml de manière à obtenir une solution d'acide sulfurique 0,1 N.

**3.5. Tampon acétate, pH 4,8**

Dissoudre 19,7 g d'acétate de sodium anhydre dans de l'eau, ajouter 9 ml d'acide acétique glacial et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Vérifier et ajuster éventuellement le pH.

**3.6. Solution de sulfate de cuivre 0,1 M**

Dissoudre 2,497 g de sulfate de cuivre ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) dans de l'eau et compléter à 100 ml.

**3.7. Solution de résorcinol à 2 %**

Dissoudre 2 g de résorcinol dans de l'eau et compléter à 100 ml. Cette solution peut se conserver 4 mois à 5-8 °C.

- 3.8. Réactif au résorcinol  
Mélanger 10 ml de solution de résorcine (3.7), 80 ml d'acide chlorhydrique concentré ( $d_{20}^{\circ}\text{C} = 1,19 \text{ g/l}$ ) et 0,25 ml de solution de sulfate de cuivre (3.6) et compléter à 100 ml avec de l'eau. Préparer cette solution le jour de l'utilisation
- 3.9. Alcool isoamylique
- 3.10. Solution d'acide N-acétylneuraminique (acide sialique)  
Dissoudre 20 mg d'acide N-acétylneuraminique dans de l'eau et compléter à 100 ml. Cette solution ne peut se conserver plus d'une semaine à + 4 °C.
4. **Appareillage**
- 4.1. Balance analytique.
- 4.2. Agitateur magnétique, barreaux magnétiques revêtus de téflon de 2 cm de long.
- 4.3. pHmètre.
- 4.4. Centrifugeuse permettant d'atteindre une force centrifuge de 3 000 g.
- 4.5. Tubes à centrifuger d'une capacité de 75 ml environ.
- 4.6. Bain d'eau avec thermostat réglable à 80 °C.
- 4.7. Bain d'eau bouillante.
- 4.8. Filtres de 125 mm de diamètre (Schleicher et Schüll n° 589<sup>2</sup>, type « Weissband » ou de qualité équivalente).
- 4.9. Entonnoirs en verre, d'un diamètre de 7 cm environ.
- 4.10. Bêchers de 100 et de 150 ml.
- 4.11. Fioles jaugées de 50, 100 et 1 000 ml.
- 4.12. Tubes à essai à bouchon fileté d'une capacité de 10 ml.
- 4.13. Spectrophotomètre.
- 4.14. Cuves en verre pour spectrophotomètre (4.13), trajet optique 10 mm,
- 4.15. Pipettes graduées de 1, 2, 5, 10, 20, 25 et 50 ml.
- 4.16. Baguettes en verre.
- 4.17. Étuve thermostatée à 35 °C.
5. **Préparation de l'échantillon**  
L'échantillon, après avoir été homogénéisé, est examiné selon les indications prévues aux points 6 et suivants.
6. **Mode opératoire**
- 6.1. Isolement de l'acide sialique libre.
- 6.1.1. Peser  $5 \pm 0,005 \text{ g}$  de lait écrémé en poudre dans un bécher de 150 ml.  
Ajouter 50 ml d'eau. Bien mélanger par agitation magnétique (4.2) jusqu'à complète dissolution.  
Ajouter lentement, en poursuivant l'agitation, 50 ml de la solution d'acide trichloracétique (3.1).  
Laisser reposer 30 minutes (à température ambiante).

- 6.1.2. Agiter puis filtrer aussitôt (4.8).
- 6.1.3. Introduire dans un tube à centrifuger (4.5) 50 ml de filtrat prélevés dans les 60 minutes qui suivent le début de la filtration.  
Ajouter 1 ml d'acide phosphotungstique (3.2). Rendre homogène par agitation et laisser reposer 10 minutes à température ambiante. Centrifuger à 3 000 g pendant 10 minutes.
- 6.1.4. Éliminer le surnageant. Laver 2 fois le sédiment avec 5 ml d'éthanol (3.3) en ayant soin de le mettre en suspension à l'aide d'un agitateur magnétique ou d'une baguette de verre (4.16). (Dans le dernier cas, introduire 2 ml d'éthanol pour la remise en suspension et rincer la baguette à l'aide des 3 ml d'éthanol restants). Centrifuger chaque fois à 3 000 g pendant 10 minutes.  
Laisser sécher le sédiment ainsi obtenu soit pendant une nuit à température ambiante, soit pendant 90 minutes à 35 °C.
- 6.1.5. Ajouter 4 ml d'acide sulfurique 0,1 N (3.4) au sédiment sec et agiter pour le mettre en suspension.  
Boucher les tubes à centrifuger et les placer 40 minutes dans un bain d'eau à 80 °C en les agitant de temps en temps pour assurer une bonne dispersion. Refroidir à température ambiante et ajouter 4 ml de tampon acétate (3.5). Mélanger soigneusement.
- 6.1.6. Centrifuger 10 minutes à 3 000 g. Le dosage de l'acide sialique ou acide N-acétylneuraminique s'effectue sur le surnageant.
- 6.2. Dosage spectrophotométrique de l'acide sialique libre.
- 6.2.1. Introduire 2 ml de surnageant dans un tube à essai (4.12) et ajouter 2 ml de réactif au résorcinol (3.8).
- 6.2.2. Boucher les tubes, mélanger soigneusement le contenu, placer les tubes pendant 15 minutes exactement dans un bain d'eau à 100 °C (4.7). Refroidir à température ambiante sous l'eau courante.
- 6.2.3. Ajouter 5 ml d'alcool isoamylique (3.9), boucher et mélanger soigneusement le contenu en agitant vigoureusement les tubes puis les placer 15 minutes dans un bain d'eau glacée.
- 6.2.4. Centrifuger à 1 000 g pendant 2 minutes pour bien séparer les deux phases.
- 6.2.5. Introduire environ 3 ml de la couche supérieure (phase alcoolique) dans une cuve en verre et mesurer l'extinction à 580 nm par rapport à l'essai à blanc dans les 30 minutes qui suivent le retrait des tubes du bain d'eau glacée.
- 6.3. Essai à blanc.  
Préparer un essai à blanc conformément aux points 6.2.1 à 6.2.5 en utilisant 1 ml de solution d'acide sulfurique 0,1 N (3.4) et 1 ml de tampon acétate (3.5) au lieu de 2 ml de filtrat comme prévu au point 6.2.1.
- 6.4. Courbe d'étalonnage
- 6.4.1. Introduire exactement 0-2-5-10-20 et 30 ml de la solution (3.10) correspondant à 0-0,4-1-2-4-6 mg d'acide sialique, dans des fioles jaugées d'une capacité de 50 ml, compléter à 50 ml avec la solution d'acide sulfurique 0,1 N (3.4) et bien mélanger.
- 6.4.2. Introduire 1 ml du contenu de chaque fiole jaugée dans un tube à essai (4.12). Ajouter 1 ml de tampon acétate (3.5), afin d'obtenir une série de solutions témoins contenant 0 (valeur zéro), 8, 20, 40, 80, 120 µg d'acide sialique. Après avoir bien mélangé, procéder au dosage conformément aux points 6.2.2 à 6.2.5.
- 6.4.3. Pour établir la courbe d'étalonnage, porter sur un graphique les extinctions obtenues au point 6.4.2 et les quantités d'acide sialique correspondantes en microgrammes indiquées au point 6.4.2.

**7. Expression des résultats****7.1. Mode de calcul**

Calculer la teneur en acide sialique, exprimée en microgrammes par gramme, selon la formule suivante :

$$\frac{C \cdot 8}{E}$$

dans laquelle C représente la masse d'acide sialique en microgrammes, lue sur la courbe d'étalonnage correspondant à la mesure d'extinction obtenue au point 6.2.5 et E est la masse de la prise d'essai (6.1.1) en grammes. Exprimer le résultat au microgramme près.

**7.2. Répétabilité**

La différence entre les résultats de deux déterminations effectuées simultanément ou rapidement l'une après l'autre par le même analyste ne doit pas excéder 5 % de la moyenne arithmétique des résultats.

**8. Interprétation des résultats**

Cette méthode permet de quantifier la présence éventuelle de lactosérum dans le lait écrémé en poudre.

**8.1. Calcul de la valeur moyenne d'acide sialique libre en microgrammes par gramme de l'échantillon, rapportée à sa teneur en protéines exprimée en pourcentage (m/m)**

$$Y = 40 + 3(X - 34)^2$$

où :

40 est la teneur moyenne en acide sialique en microgrammes par gramme pour un lait écrémé en poudre renfermant 34 % au moins de protéines,

X est la teneur en protéines totales, déterminée selon la méthode Kjeldahl FIL IDF 20 : 1962.

**8.2. Calcul du pourcentage de lactosérum en poudre éventuellement présent**

$$\% \text{ lactosérum} = \frac{Z - Y}{10}$$

où :

Z est la teneur en acide sialique de l'échantillon déterminée au point 7.1 en microgrammes par gramme,

Y est la teneur moyenne en acide sialique libre de l'échantillon calculée au point 8.1,

10 représente, par convention, la teneur en acide sialique libre exprimée en microgrammes, d'un gramme de lactosérum présumé en poudre.

**8.3. Suite aux erreurs inhérentes à la méthode et aux variations naturelles de composition de l'échantillon, on peut conclure définitivement à l'absence de lactosérum quand la valeur obtenue au point 8.2 est inférieure ou égale à 2,0.**

Dans le cas d'une valeur supérieure, la conclusion sur la présence de lactosérum est affirmative. Elle est quantifiée selon la formule donnée au point 8.2. »

---