



PROGRAMME MIXTE FAO/OMS SUR LES NORMES ALIMENTAIRES

COMITÉ DU CODEX SUR LES ADDITIFS ALIMENTAIRES

Quarante-cinquième session

Beijing, Chine, 18-22 mars 2013

NORMES D'IDENTITÉ ET DE PURETÉ DES ADDITIFS ALIMENTAIRES DÉCOULANT DE LA SOIXANTE-SEIZIÈME RÉUNION DU JECFA

Les observations suivantes ont été reçues des membres et des observateurs du Codex

Chili, Égypte et AMFEP

CHILI

Le Chili souscrit au document et considère que les informations disponibles délivrées par le JECFA sont très utiles pour analyser les différents additifs et vérifier s'ils sont conformes aux normes indiquées par le fournisseur d'additifs alimentaires. Par conséquent, nous soutenons le document et acceptons les normes préparées lors de la soixante-seizième réunion du JECFA.

ÉGYPTE

Se référant à votre document CX/FA 13/45/15 concernant la demande de normes pour l'identité et la pureté des additifs alimentaires découlant de la réunion du soixante-seizième JECFA.

Nous aimerions vous informer que l'Égypte souscrit à la teneur du document.

ASSOCIATION OF MANUFACTURERS AND FORMULATORS OF ENZYME PRODUCTS (AMFEP)

AMFEP demande de bien vouloir prendre en compte les additions/corrections ci-joint aux normes de la phytase pour permettre le contrôle approprié des préparations enzymatiques de la phytase par rapport à ces normes. Les modifications proposées sont d'ordre éditorial mineur mais importantes pour la performance correcte de la partie méthodologique dans les normes.

3-PHYTASE D'ASPERGILLUS NIGER EXPRIMÉE EN ASPERGILLUS NIGER

Nouvelles normes préparées lors du soixante-seizième JECFA (2012) et publiées dans les monographies FAO JECFA 13 (2012). Une DJA « non spécifiée » a été établie lors du soixante-seizième JECFA (2012).

SYNONYMES	Phytase, 3-phytase
SOURCES	La phytase est produite par fermentation à écoulement discontinu submergé d'une souche d' <i>Aspergillus niger</i> non pathogène et non toxigène génétiquement modifiée, qui contient le gène codant la phytase dérivé d' <i>Aspergillus niger</i> . L'enzyme est sécrétée et ensuite isolée dans un bouillon de fermentation par filtration pour retirer la biomasse et concentrée par ultrafiltration. Le concentré enzymatique est soumis au filtrage de germes et est ensuite formulé et normalisé à l'activité désirée en utilisant des composés de nature alimentaire.
Principes actifs	3-phytase
Noms systématiques et nombres	Myo-Inositol hexakisphosphate 3-phosphohydrolase, EC 3.1.3.8, CAS 37288-11-2
Réactions catalysées	Hydrolyse de myo-inositol hexakisphosphate (phytate) en inositol pentaphosphate (IP5), et ensuite pour donner un mélange de myo-inositol di-phosphate (IP2), myo-inositol mono-phosphate (IP1) et d'orthophosphate libre.

Activités enzymatiques secondaires	Pas de niveaux significatifs des activités enzymatiques secondaires
DESCRIPTION	Liquide brunâtre ou jaune jusqu'à une poudre marron clair
EMPLOIS FONCTIONNELS	Préparation enzymatique. Utilisée pour dégrader le phytate contenu dans les aliments dérivés des végétaux en particulier les grains de céréales et les légumineuses, afin d'améliorer la biodisponibilité minérale.
NORMES GÉNÉRALES	Doivent être conformes à l'édition actuelle des normes générales et considérations relatives aux préparations enzymatiques utilisées dans la transformation des aliments du JECFA.
CARACTÉRISTIQUES	
IDENTIFICATION	
Activité de la phytase	L'échantillon montre l'activité de la phytase. Voir description dans la rubrique TESTS.
TESTS	
<u>Activité de la phytase</u>	<p>Principe Cette procédure est utilisée pour déterminer l'activité des enzymes qui libèrent le phosphate à partir du phytate. Le dosage repose sur l'hydrolyse enzymatique du phytate de sodium dans des conditions contrôlées par la mesure de la quantité de ortho phosphate inorganique libéré.</p> <p>L'activité de la phytase est exprimée en unités de phytase (FTU). Une unité de phytase (FTU) est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 micromole de phosphore inorganique par minute à partir de 0,0051 mol/l de phytate de sodium à 37° et au pH de 5,50 dans les conditions du test.</p> <p>Réactifs et solutions</p> <p>[NOTE- S'assurer de l'absence de phosphate dans le verre utilisé.]</p> <p>[NOTE- La protéine d'enzyme est facilement absorbée par le plastique. Ne pas utiliser de tubes de plastique à jeter. Il est par ailleurs recommandé de ne pas utiliser des cuvettes de plastique à jeter.]</p> <p>Tampon d'acétate au pH 5,50:</p> <p>Dissoudre 1,76 g (1,68 ml) d'acide acétique glacial (C₂H₄O₂), 30,02 g d'acétate de sodium trihydraté (C₂H₃O₂ Na·H₂O), et 0,147g de chlorure de calcium dihydraté (CaCl₂·2H₂O) dans environ 900 ml d'eau. Transférer la solution dans un flasque volumétrique de 1000-ml, diluer avec de l'eau jusqu'à remplissage, et mélanger. Ajuster le pH à 5,50 ± 0,05.</p> <p>Solution de substrat:</p> <p>Dissoudre 0,8 8,40 g de phytate de sodium décahydraté (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂·10H₂O) dans 9400 ml de tampon d'acétate. Ajuster le pH à 5,50±0,05 à 37 °C en ajoutant 4 M d'acide acétique. Refroidir à la température ambiante. Transférer quantitativement le mélange dans un flasque volumétrique de 1000 ml, diluer avec le tampon d'acétate jusqu'à remplissage, et mélanger. Renouveler quotidiennement la préparation.</p> <p>Solution d'acide nitrique (27%):</p> <p>Tout en mélangeant, ajouter lentement 70 ml d'acide nitrique à 65% à 130 ml d'eau.</p> <p>Solution d'heptamolybdate d'ammonium:</p> <p>Dissoudre 100 g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O] dans 900 ml d'eau dans un flasque volumétrique de 1000-ml. Ajouter 10 ml de solution d'ammoniac à 25% (NH₄OH hydroxyde d'ammonium), diluer avec de l'eau jusqu'à remplissage, et mélanger. Cette solution est stable pendant 4 semaines quand elle est entreposée à température ambiante et protégée de la lumière.</p> <p>Solution de vanadate d'ammonium:</p> <p>Dissoudre 2,35 g de monovanadate d'ammonium (NH₄VO₃) dans 400 ml d'eau tiède</p>

(60°). Tout en mélangeant, ajouter lentement 20 ml de la solution d'acide nitrique (27%). Refroidir à la température ambiante. Transférer quantitativement le mélange dans un flasque volumétrique de 1000-ml, diluer avec de l'eau jusqu'à remplissage, et mélanger. Cette solution est stable pendant 4 semaines quand elle est entreposée à température ambiante et protégée de la lumière.

Solution d'arrêt/de couleur:

Tout en mélangeant, ajouter 25 ml de la solution de vanadate d'ammonium dans 25 ml de la solution d'heptamolybdate d'ammonium. Continuer de mélanger et ajouter lentement 16,5 ml d'acide nitrique à 65%. Refroidir à la température ambiante, transférer quantitativement le mélange dans un flasque volumétrique de 100-ml, diluer avec de l'eau jusqu'à remplissage, et mélanger. Renouveler quotidiennement la préparation.

Solution de phosphate dihydrogène de potassium:

Sécher une quantité suffisante de phosphate dihydrogène de potassium (KH₂PO₄) de pureté >99% dans un four à 105° pendant 4 h. Refroidir à la température ambiante dans un dessiccateur placé au-dessus de gel de silice séché. Dans deux flasques volumétriques d'1l chacun, peser avec exactitude 0,245 g de phosphate dihydrogène de potassium séché et diluer avec le tampon d'acétate pour obtenir 1l de solutions A et B de phosphate dihydrogène de potassium, chacune contenant 1,80 mmol/l de phosphate dihydrogène de potassium.

Phytase étalon: obtenu auprès de Gist-BrocadesDSM, Delft, Pays-Bas, avec une activité attribuée ou équivalent.

Solution de phytase étalon: En double, peser avec exactitude une quantité adéquate de phytase étalon et dissoudre et diluer dans le tampon d'acétate pour obtenir une solution contenant 0,06 ±0,01 d'unités de phytase par 2,0 ml. Quantifier l'activité de la phytase étalon conformément à la procédure décrite ci-dessous.

Procédure de quantification de l'activité de la phytase étalon

À l'aide de 6 éprouvettes de verre individuelles de 20-x150-mm ajouter dans une éprouvette 2,00 ml de la solution de phytase étalon, ajouter dans 3 éprouvettes 2,00 ml de la solution A de phosphate dihydrogène de potassium, et dans les 2 autres éprouvettes ajouter 2,00 ml de la solution B de phosphate dihydrogène de potassium. Placer les éprouvettes dans un bain d'eau à 37,0±0,1°, à intervalles réguliers et permettre à leur contenu de s'équilibrer pendant 5 min.

À 5 min. d'intervalle, dans le même ordre et dans les mêmes intervalles de temps que celui auquel les éprouvettes ont été ajoutées, ajouter 4,0 ml de la solution de substrat (préalablement équilibrée à 37,0±0,1°), dans chacune de ces éprouvettes. Mélanger les éprouvettes et replacer dans un bain d'eau à 37,0±0,1°.

À 35 min. d'intervalle, dans le même ordre et dans les mêmes intervalles de temps, terminer l'incubation en ajoutant 4,0 ml de la solution d'arrêt/de couleur dans chacune des éprouvettes. Mélanger, et refroidir à la température ambiante. Préparer un blanc d'enzyme en ajoutant 2,00 ml de la solution de phytase étalon dans une éprouvette en verre de 20-x150-mm. Préparer des blancs réactifs en ajoutant 2,00 ml d'eau dans une série de cinq éprouvettes en verre distinctes. Ajouter 4,0 ml de la solution d'arrêt/de couleur dans toutes les éprouvettes de blanc et mélanger. Ajouter ensuite 4,0 ml de la solution de substrat, et mélanger. Déterminer l'absorbance de toutes les solutions à 415 nm dans une cellule d'1-cm de longueur avec un spectrophotomètre, à l'aide d'eau pour remettre l'instrument à zéro.

Calcul de l'activité de la phytase étalon

Calculer les absorbances corrigées (AR) pour chaque préparation d'échantillon (absorbance de la solution de la phytase étalon moins l'absorbance correspondante du blanc) et pour chaque solution de phosphate dihydrogène de potassium, Ap (absorbance de la solution de phosphate dihydrogène de potassium moins l'absorbance moyenne des blancs réactifs). Calculer C, la concentration de phosphate de chaque solution de phosphate dihydrogène de potassium:

$$C \text{ (mmol/2 ml)} = (W \times 1000 \times 2) / MW.$$

Calculer les absorbances (D) pour chaque solution de phosphate dihydrogène de potassium après correction pour la quantité de phosphate dihydrogène de potassium pesé:

$Ap/C = D$ (unités d'absorbance/mmol de phosphate par 2 ml).

Calculer la moyenne des résultats de D, qui donne E (différence admissible maximale, 5%).

Calculer l'activité de la phytase étalon:

$FTU/g = (AR \times f)/(30 \times R \times E)$,

où,

AR est l'absorbance corrigée de la solution de phytase étalon;

f est le facteur de dilution totale de la préparation étalon;

60 est le temps d'incubation, en min; R est le poids de l'échantillon, en g;

E est la moyenne des facteurs D;

W est le poids du phosphate dihydrogène de potassium, en g;

MW est le poids moléculaire du phosphate dihydrogène de potassium,

136,09 (g/mol).

Détermination de l'activité de la phytase dans les échantillons

Préparation des échantillons: suspendre ou dissoudre et diluer des quantités pesées avec exactitude d'échantillons dans le tampon d'acétate de sorte que 2,0 ml de la solution finale contienne entre 0,01 et 0,08 d'unités de phytase.

Préparation de la courbe de la phytase étalon: peser, en double, avec une exactitude de ± 1 mg, une quantité de phytase étalon sur la base de l'activité qui correspond à environ 20,000 unités de phytase dans des flasques volumétriques de 200-ml. Dissoudre et diluer avec le tampon d'acétate jusqu'à remplissage, et mélanger. Utiliser cette solution-mère et diluer avec le tampon d'acétate pour obtenir des solutions étalon contenant approximativement 0,01, 0,02, 0,04, 0,06, et 0,08 unités de phytase par 2,0 ml.

Ajouter 2,00 ml de chaque solution de phytase étalon et 2,00 ml de la solution étalon dans des éprouvettes en verre distinctes de 20-x150-mm. Placer les éprouvettes dans un bain d'eau à $37,0 \pm 0,1^\circ$, à intervalles de temps réguliers et permettre à leur contenu de s'équilibrer pendant 5 min. À 5 min d'intervalle, dans le même ordre que celui auquel les tubes ont été ajoutés, ajouter 4,0 ml de la solution de substrat (préalablement équilibrée à $37,0 \pm 0,1^\circ$) dans chacune des éprouvettes. Mélanger et replacer dans un bain d'eau à $37,0 \pm 0,1^\circ$. À 35 min. d'intervalle, dans le même ordre et dans les mêmes intervalles de temps, terminer l'incubation en ajoutant 4,0 ml de la solution d'arrêt/de couleur dans chacune des éprouvettes. Mélanger et refroidir à la température ambiante.

Préparer les blancs d'enzyme tel que décrit pour la quantification de l'activité de la phytase étalon. Centrifuger toutes les éprouvettes pendant 5 min à 3000 xg. Déterminer l'absorbance de chaque solution à 415 nm dans une cellule d'1-cm de longueur avec un spectrophotomètre, à l'aide d'eau pour remettre l'instrument à zéro.

Calcul de l'activité de la phytase dans les échantillons

Calculer l'absorbance corrigée (échantillon moins blanc) pour chaque préparation d'échantillon et solution de phytase étalon. Marquer l'activité de la phytase calculée (FTU par 2 ml) pour chaque solution de phytase par rapport à l'absorbance correspondante. A partir de la courbe, déterminer l'activité de la phytase dans chaque préparation d'échantillon (FTU par 2 ml):

Activité (FTU/g) = (FTU par 2 ml x dilution)/poids de l'échantillon