



PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS

COMITÉ DEL CODEX SOBRE ADITIVOS ALIMENTARIOS

45ª reunión

Beijing (China), 18 al 22 de marzo de 2013

**ESPECIFICACIONES DE IDENTIDAD Y PUREZA DE LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS FORMULADAS
POR EL JECFA EN SU 76ª REUNIÓN**

Se han recibido las observaciones siguientes de los siguientes miembros y observadores del Codex

Chile, Egipto y AMFEP

CHILE

Chile está de acuerdo con el documento, y considera la información disponible entregada por JECFA de gran utilidad para analizar los diversos aditivos y comprobar si cumplen las especificaciones indicadas por el proveedor de aditivos alimentarios. Por lo tanto, apoya el documento y acoge las especificaciones preparadas por JECFA en su 76ª reunión.

EGIPTO

Haciendo referencia a su documento CX/FA 13/45/15, en que se solicitan especificaciones de identidad y pureza de los aditivos alimentarios formuladas por el JECFA en su 76ª reunión, deseamos informarle que Egipto está de acuerdo con el contenido del documento.

ASOCIACIÓN DE FABRICANTES Y FORMULADORES DE PRODUCTOS DE ENZIMAS (AMFEP)

AMFEP solicita que se tengan en cuenta las adiciones y correcciones adjuntas a las especificaciones sobre fitasa, a fin de permitir un control adecuado de las preparaciones enzimáticas de fitasa con respecto a estas especificaciones. Los cambios propuestos son pequeñas modificaciones de redacción, pero importantes para el funcionamiento correcto de la parte metodológica de las especificaciones.

FITASA DE ASPERGILLUS NIGER EXPRESADA EN A. NIGER

En la 76ª reunión del JECFA (2012) se prepararon nuevas especificaciones y se publicaron en el número 13 de las Monografías del JECFA para la FAO (2012). En la 76ª reunión del JECFA (2012) se estableció una IDA "no especificada".

SINÓNIMOS	Fitasa, 3-fitasa
FUENTES	La fitasa es producida por fermentación sumergida en lote alimentado de una cepa de <i>Aspergillus niger</i> no patógena y no toxígena genéticamente modificada que contiene el gen de codificación de la fitasa derivada de <i>Aspergillus niger</i> . La enzima es secretada y aislada del caldo de fermentación por filtración para eliminar la biomasa, y concentrada por ultrafiltración. El concentrado enzimático se somete a filtración de gérmenes y seguidamente se formula y estandariza según la actividad deseada utilizando compuestos de calidad alimentaria.
Principios activos	3-fitasa
Nombres sistemáticos y números	Mio-inositol hexakisfosfato 3-fosfohidrolasa, EC 3.1.3.8, CAS 37288-11-2
Reacciones catalizadas	Hidrólisis de mio-inositol hexakisfosfato (fitato) hasta inositol pentafosfato (IP5), y también para dar una mezcla de mio-inositol di-fosfato (IP2), mio-inositol monofosfato (IP1) y ortofosfato libre.

Actividades enzimáticas secundarias	No hay niveles significativos de actividades enzimáticas secundarias
DESCRIPCIÓN	Líquido pardusco o amarillo hasta polvo marrón claro.
USOS FUNCIONALES	Preparación enzimática. Se utiliza para degradar el fitato que se encuentra en alimentos derivados de plantas, especialmente en cereales en grano y legumbres, a fin de mejorar la biodisponibilidad mineral.
ESPECIFICACIONES GENERALES	Debe cumplir la edición actual de las Especificaciones y Consideraciones Generales del JECFA para Preparaciones Enzimáticas Utilizadas como Coadyuvantes de Elaboración.
CARACTERÍSTICAS	
IDENTIFICACIÓN	
Actividad de la fitasa	La muestra indica la actividad de la fitasa. Véase la descripción en ENSAYOS.
ENSAYOS	
<u>Actividad de la fitasa</u>	<p>Principio: este procedimiento se utiliza para determinar la actividad de enzimas que liberan fosfato de fitato. El ensayo está basado en la hidrólisis enzimática de fitato de sodio en condiciones controladas, por medición de la cantidad de ortofosfato inorgánico liberado.</p> <p>La actividad de la fitasa se expresa en unidades de fitasa (FTU). Una unidad de fitasa (FTU) se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de fósforo inorgánico por minuto de 0,0051 mol/l de fitato de sodio a 37° y pH de 5,50 bajo las condiciones del ensayo.</p> <p>Reactivos y soluciones</p> <p>[NOTA - Asegurarse de la ausencia de fosfato en todo el material de vidrio.]</p> <p>NOTA - La proteína enzimática es fácilmente absorbida por plástico. No utilizar tubos de ensayo de plástico desechables. Se recomienda también no utilizar cubetas de plástico desechables.]</p> <p>Amortiguador de acetato pH 5,50:</p> <p>Disolver 1,76 g (1,68 ml) de ácido acético glacial (C₂H₄O₂), 30,02 g de trihidrato de acetato de sodio (C₂H₃O₂ Na·H₂O), y 0,147g de cloruro de calcio dihidratado (CaCl₂·2H₂O) en 900 ml de agua aproximadamente. Transferir la solución a un matraz volumétrico de 1000-ml, diluir con agua hasta el volumen deseado y mezclar. Regular el pH a 5,50 ± 0,05.</p> <p>Solución del sustrato:</p> <p>Disolver 0,8,40 g de fitato de sodio decahidratado (C₆H₆O₂₄P₆Na₁₂·10H₂O) en 9400 ml de amortiguador de acetato. Regular el pH a 5,50±0,05 a 37 °C añadiendo 4 M de ácido acético. Enfriar hasta temperatura ambiente. Transferir cuantitativamente la mezcla a un matraz volumétrico de 1000 ml, diluir con el amortiguador de acetato hasta el volumen deseado y mezclar. Preparar la solución cada día.</p> <p>Solución de ácido nítrico (27%):</p> <p>Mientras se agita añadir lentamente 70 ml de 65% de ácido nítrico hasta 130 ml de agua.</p> <p>Solución de heptamolibdato de amonio:</p> <p>Disolver 100 g de heptamolibdato de amonio tetrahidrato [(NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O] en 900 ml de agua en un matraz volumétrico de 1000-ml. Añadir 10 ml de 25% de solución de amonía (NH₄OH hidróxido amónico), diluir con agua hasta el volumen deseado y mezclar. Esta solución es estable durante 4 semanas si se guarda a temperatura ambiente y protegida de la luz.</p>

Solución de vanadato de amonio:

Disolver 2,35 g de monovanadato de amonio (NH_4VO_3) en 400 ml de agua caliente (60°). Mientras se agita añadir lentamente 20 ml de solución de ácido nítrico (27%). Enfriar hasta temperatura ambiente. Transferir cuantitativamente la mezcla a un matraz volumétrico de 1000-ml, diluir con agua hasta el volumen deseado y mezclar. Esta solución es estable durante 4 semanas si se guarda a temperatura ambiente y protegida de la luz.

Solución de color/integral:

Añadir mientras se agita 25 ml de solución de vanadato de amonio a 25 ml de solución de heptamolibdato de amonio. Seguir agitando y añadir lentamente 16,5 ml de 65% de ácido nítrico. Enfriar hasta temperatura ambiente y transferir cuantitativamente la mezcla a un matraz volumétrico de 100-ml, diluir con agua hasta el volumen deseado y mezclar. Preparar la solución cada día.

Solución de fosfato diácido de potasio:

Secar una cantidad suficiente de fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) de pureza $>99\%$ en un horno a 105° durante 4 h. Enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador sobre gel de sílice desecado. En dos matraces volumétricos de 1l, pesar exactamente 0,245 g de fosfato diácido de potasio desecado y diluir con amortiguador de acetato hasta 1 l para obtener soluciones A y B de fosfato diácido de potasio, que contengan cada una 1,80 mmol/l de fosfato diácido de potasio.

Fitasa estándar: se adquiere en Gist-BrocadesDSM, Delft (Países Bajos), con una actividad o equivalente asignados.

Solución de fitasa estándar: pesar exactamente por duplicado una cantidad adecuada de fitasa estándar, disolver y diluir en amortiguador de acetato para obtener una solución que contenga $0,06 \pm 0,01$ unidades de fitasa por 2,0 ml. Cuantificar la actividad de la fitasa estándar según el procedimiento descrito a continuación.

Procedimiento para cuantificar la actividad de la fitasa estándar

Utilizando 6 tubos de ensayo individuales de cristal de 20-x150-mm añadir a un tubo 2,00 ml de solución de fitasa estándar, a 3 tubos, 2,00 ml de solución A de fosfato diácido de potasio y a los 2 tubos restantes 2,00 ml de solución B de fosfato diácido de potasio. Colocar los tubos en un baño de agua a $37,0 \pm 0,1^\circ$, a intervalos regulares y permitir que sus contenidos se equilibren durante 5 minutos.

A intervalos iguales de 5 minutos, añadir a cada uno de los tubos en el mismo orden y en los mismos intervalos de tiempo en que se han añadido los tubos, 4,0 ml de solución de sustrato (equilibrada anteriormente hasta $37,0 \pm 0,1^\circ$). Mezclar los tubos, y sustituirlos en el baño de agua a $37,0 \pm 0,1^\circ$.

Finalizar la incubación a intervalos iguales de 35 min. en el mismo orden y en los mismos intervalos de tiempo, mediante la adición de 4,0 ml de solución de color/integral a cada uno de los tubos. Mezclar y enfriar hasta temperatura ambiente. Preparar un blanco de enzima añadiendo 2,00 ml de solución de fitasa estándar a un tubo de ensayo de vidrio de 20-x150-mm. Preparar blancos reactivos añadiendo 2,00 ml de agua a una serie de cinco tubos de ensayo de vidrio de 20-x150. Añadir 4,0 ml de solución de color/integral a todos los tubos de blanco y mezclar. Añadir después 4,0 ml de solución de sustrato y mezclar. Determinar la absorbencia de todas las soluciones a 415 nm en una célula de longitud de camino de 1-cm con un espectrofotómetro, utilizando agua para ajustar a cero el instrumento.

Cálculo de la actividad de la fitasa estándar

Calcular las absorbencias corregidas (AR) para cada preparación de muestras (absorbencia de la solución de fitasa estándar menos la absorbencia correspondiente del blanco) y para cada solución de fosfato diácido de potasio, A_p (absorbencia de la solución de fosfato diácido de potasio menos la absorbencia media de los blancos reactivos). Calcular C, la concentración de fosfato de cada solución de fosfato diácido de potasio:

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

Calcular las absorbencias (D) para cada solución de fosfato diácido de potasio después de corregir la cantidad pesada de fosfato diácido de potasio:

$$Ap/C = D \text{ (unidades de absorbencia/nmol de fosfato por 2 ml).}$$

Calcular el promedio de los resultados D, dando E (máxima diferencia permisible, 5%).

Calcular la actividad de la fitasa estándar:

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

donde,

AR es la absorbencia corregida de la solución de fitasa estándar;

f es el factor de dilución total de la preparación estándar;

60 es el tiempo de incubación en minutos; R equivale al peso de la muestra en g;

E es el promedio de los factores D;

W es el peso del fosfato diácido de potasio en g;

MW es el peso molecular del fosfato diácido de potasio,

136,09 (g/mol).

Determinación de la actividad de fitasa en muestras

Preparación de la muestra: suspender o disolver y diluir cantidades pesadas exactamente de la muestra en amortiguador de acetato para que 2,0 ml de la solución final contengan entre 0,01 y 0,08 unidades de fitasa.

Preparación de la curva de fitasa estándar: pesar por duplicado con una precisión de ± 1 mg una cantidad de fitasa estándar basada en la actividad que corresponde a aproximadamente 20.000 unidades de fitasa en matraces volumétricos de 200-ml. Disolver y diluir con amortiguador de acetato hasta el volumen deseado y mezclar. Utilizar esta solución matriz y diluir con amortiguador de acetato para obtener soluciones estándar que contengan aproximadamente 0,01, 0,02, 0,04, 0,06 y 0,08 unidades de fitasa por 2,0 ml.

Añadir 2,00 ml de cada una de las soluciones estándar de fitasa y 2,00 ml de la solución de muestra a tubos de ensayo de vidrio separados de 20-x150. Colocar los tubos en un baño de agua a $37,0 \pm 0,1^\circ$, a intervalos de tiempo regulares y permitir que sus contenidos se equilibren durante 5 min. A intervalos iguales de 5 minutos, añadir en el mismo orden en que se añadieron los tubos, 4,0 ml de solución de sustrato (equilibrada anteriormente a $37,0 \pm 0,1^\circ$) a cada uno de los tubos de ensayo. Mezclar y sustituirlos en el baño de agua a $37,0 \pm 0,1^\circ$. Finalizar la incubación a intervalos iguales de 35 min. en el mismo orden y en los mismos intervalos de tiempo mediante la adición de 4,0 ml de solución de color/integral a cada uno de los tubos. Mezclar y enfriar hasta temperatura ambiente.

Preparar blancos de enzima como se ha descrito para la cuantificación de la actividad de la fitasa estándar. Centrifugar todos los tubos de ensayo durante 5 min. a 3000 xg. Determinar la absorbencia de cada una de las soluciones a 415 nm en una célula de longitud de camino de 1-cm con un espectrofotómetro, utilizando agua para ajustar a cero el instrumento.

Cálculo de la actividad de fitasa en muestras

Calcular la absorbencia corregida (muestra menos blanco) para cada preparación de muestra y solución de fitasa estándar. Representar la actividad calculada de la fitasa (FTU por 2 ml) de cada solución de fitasa con respecto a la absorbencia correspondiente. Determinar desde la curva la actividad de la fitasa en cada preparación de muestra (FTU por 2 ml):

$$\text{Actividad (FTU/g)} = (\text{FTU por 2 ml} \times \text{dilución}) / \text{peso de la muestra}$$