
**Aliments des animaux — Détermination
de l'activité phytasique**

Animal feeding stuffs — Determination of phytase activity

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

ISO 30024:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 30024:2009](https://standards.itih.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009)

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2009

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Termes et définitions	1
3 Principe	1
4 Réactifs	2
5 Appareillage	3
6 Échantillonnage	4
7 Préparation de l'échantillon	4
8 Mode opératoire	4
8.1 Solutions à blanc	4
8.2 Étalons	4
8.3 Courbe d'étalonnage	5
8.4 Témoin de niveau d'activité phytasique	6
8.5 Prises d'essai d'aliments pour animaux	6
9 Calculs	7
9.1 Formule de la courbe d'étalonnage	7
9.2 Calcul de l'activité phytasique	8
9.3 Correction relative à la pureté et à la teneur en eau de l'acide phytique	9
9.4 Interférence avec les valeurs de blanc	10
10 Fidélité	10
10.1 Limite de détection et limite de quantification	10
10.2 Essai interlaboratoires	10
10.3 Répétabilité	10
10.4 Reproductibilité	10
11 Rapport d'essai	11
Annexe A (informative) Résultats de l'étude interlaboratoires	12
Bibliographie	13

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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

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.

L'ISO 30024 a été élaborée par le comité technique CEN/TC 327, *Aliments des animaux — Méthodes d'échantillonnage et d'analyse*, du Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

ISO 30024:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009>

Introduction

La présente Norme internationale a été élaborée en vue de quantifier les préparations commerciales de phytases incorporées dans les échantillons d'aliments pour animaux afin de permettre à la Commission européenne de contrôler la teneur en phytase des produits d'alimentation animale. Toutefois, la méthode ne peut pas être utilisée pour évaluer l'efficacité in vivo des phytases.

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

ISO 30024:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009>

Aliments des animaux — Détermination de l'activité phytasique

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie la détermination de l'activité phytasique dans des échantillons d'aliments pour animaux.

Le méthode ne fait pas la distinction entre la phytase ajoutée comme additif aux aliments pour animaux et la phytase endogène déjà présente dans les matières premières entrant dans la composition des aliments.

La méthode ne peut pas être utilisée pour évaluer ou comparer l'efficacité in vivo des phytases. Il ne s'agit pas d'une méthode prédictive de l'efficacité in vivo des phytases disponibles sur le marché car celles-ci peuvent développer une efficacité in vivo différente par unité d'activité.

La méthode est adaptée et validée exclusivement pour la détermination de l'activité phytasique dans les aliments complets pour animaux.

NOTE La méthode harmonisée a été mise au point sur la base des phytases actuellement disponibles [E1600 (EC 3.1.3.8, 3-phytase), E1614 (EC 3.1.3.26, 4-phytase), et E1640 (EC 3.1.3.26, 4-phytase)]. Par conséquent, elle peut ne pas être nécessairement appropriée en tant que telle pour les phytases développées à l'avenir. La méthode harmonisée constitue ainsi un outil qui sert uniquement à évaluer l'activité phytasique totale dans les échantillons d'aliments pour animaux.

2 Termes et définitions

ISO 30024:2009

http://www.iso.org/iso/30024-2009 Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

2.1

unité de phytase

U

quantité d'enzyme qui libère 1 μmol de phosphate inorganique par minute à partir de phytate dans les conditions de réaction spécifiées dans la présente Norme internationale

3 Principe

La phytase libère du phosphate à partir du substrat hexakisphosphate de *myo*-inositol (phytate). Le phosphate inorganique libéré est révélé en formant un complexe jaune avec un réactif acide vanado-molybdique. La densité optique du complexe jaune est mesurée à une longueur d'onde de 415 nm et le phosphate inorganique libéré est quantifié à l'aide d'une courbe d'étalonnage de phosphate.

4 Réactifs

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

AVERTISSEMENT — Cette méthode nécessite la manipulation de substances dangereuses. Respecter les réglementations locales traitant de la manipulation des substances potentiellement dangereuses afin de minimiser les risques sur le plan technique, organisationnel et de la sécurité du personnel.

4.1 Ammoniaque, solution à 25 % (fraction massique); NH_3 .

4.2 Heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

4.3 Monovanadate d'ammonium, NH_4VO_3 .

4.4 Acide chlorhydrique, 25 % (fraction massique); HCl .

4.5 Acide nitrique, 65 % (fraction massique); HNO_3 .

4.6 Dihydrogénophosphate de potassium, KH_2PO_4 .

4.7 Phytate, acide phytique, hydrate de dodécasodium, $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_{12}\text{O}_{24}\text{P}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, de riz, Sigma® P0109¹⁾.

4.8 Acétate de sodium trihydraté, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

4.9 Polysorbate 20²⁾.

4.10 Acide nitrique dilué. Diluer 1 volume d'acide nitrique à 65 % en fraction massique (4.5) avec 2 volumes d'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est illimitée.

4.11 Solution d'heptamolybdate d'ammonium. Dissoudre 100,0 g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté (4.2) dans environ 800 ml d'eau. Ajouter 10 ml de solution d'ammoniaque à 25 % en fraction massique (4.1) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante à l'abri de la lumière. La durée de conservation maximale est de 2 mois.

4.12 Solution de vanadate d'ammonium. Dissoudre entièrement 2,35 g de monovanadate d'ammonium (4.3) dans environ 400 ml d'eau (50 °C à 60 °C). Ajouter 20 ml d'acide nitrique dilué (4.10) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante à l'abri de la lumière. La durée de conservation maximale est de 2 mois.

4.13 Réactif d'arrêt vanado-molybdique. Mélanger 1 volume de solution de vanadate d'ammonium (4.12) avec 1 volume de solution d'heptamolybdate d'ammonium (4.11) et ajouter 2 volumes d'acide nitrique dilué (4.10). Mélanger et conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de une journée.

4.14 Polysorbate 20, 10 % (fraction massique). Dissoudre 10,0 g de polysorbate 20 (4.9) avec de l'eau et compléter à 100 ml. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de 6 mois.

1) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

2) Tween 20 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

4.15 Tampon acétate, pH 5,5; 0,25 mol/l. Dissoudre 34,0 g d'acétate de sodium trihydraté (4.8) dans environ 900 ml d'eau. Ajuster le pH à $5,50 \pm 0,02$ avec de l'acide chlorhydrique à 25 % en fraction massique et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de 2 semaines.

4.16 Tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique, pH 5,5; 0,25 mol/l. Dissoudre 34,0 g d'acétate de sodium trihydraté (4.8) dans environ 900 ml d'eau. Ajuster le pH à $5,50 \pm 0,02$ avec de l'acide chlorhydrique à 25 % en fraction massique (4.4). Ajouter 1 ml de polysorbate 20 à 10 % en fraction massique (4.14) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de 2 semaines.

4.17 Tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique, pH 5,5; 0,50 mol/l. Dissoudre 68,0 g d'acétate de sodium trihydraté (4.8) dans environ 900 ml d'eau. Ajuster le pH à $5,50 \pm 0,02$ avec de l'acide chlorhydrique à 25 % en fraction massique (4.4). Ajouter 1 ml de polysorbate 20 à 10 % en fraction massique (4.14) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de 2 semaines.

4.18 Solution de substrat de phytate, 7,5 mmol/l (concentration finale 5 mmol/l dans la réaction). Dissoudre 2,00 g de phytate de dodécasodium (4.7) avec une teneur en phosphore inorganique $\leq 0,1$ % en fraction massique (voir 9.3) dans environ 200 ml de tampon acétate (4.15). Ajuster le pH à $5,50 \pm 0,02$ avec de l'acide chlorhydrique à 25 % en fraction massique (4.4) et compléter à 250 ml avec du tampon acétate (4.15). La durée de conservation maximale est de 2 semaines à 4 °C.

4.19 Solution mère étalon de phosphate, 50 mmol/l. Sécher environ 10 g de dihydrogénophosphate de potassium (4.6) à 105 °C pendant 2 h et les conserver dans un dessiccateur. Peser environ 682 mg de dihydrogénophosphate de potassium séché, les transférer dans une fiole jaugée de 100 ml et compléter à 100 ml avec le tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique à 0,25 mol/l (4.16). Calculer la concentration exacte de la solution mère étalon de phosphate. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de 2 semaines.

4.20 Solution mère de phytase de référence. Peser 100,0 mg à 300,0 mg de phytase de référence d'activité certifiée, les transférer dans une fiole jaugée de 100 ml et les dissoudre dans 100 ml de tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique à 0,25 mol/l (4.16). Agiter pendant 15 min à 45 min. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de une journée.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009>

5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire et, en particulier, ce qui suit.

- 5.1 Bain marie**, thermorégulé (muni d'inserts pour des tubes de 2 ml).
- 5.2 pH-mètre**, pouvant être lu jusqu'à au moins deux décimales.
- 5.3 Agitateurs magnétiques** (puissance ≥ 20 W).
- 5.4 Barreaux d'agitateur de forme ovale** (40 mm \times 20 mm).
- 5.5 Balance analytique**, avec une précision de lecture d'au moins 0,1 mg.
- 5.6 Balance**, avec une précision de lecture d'au moins 0,01 g.
- 5.7 Agitateur Vortex**.
- 5.8 Centrifugeuse**, pour microtubes à centrifuger (5.12), capable d'une accélération de 11 000g à 20 000g.
- 5.9 Distributeur électronique**.
- 5.10 Pipettes** (électroniques et manuelles), de capacité 10 μ l à 2 000 μ l.

5.11 Spectrophotomètre, double faisceau ou lecteur de microplaque.

5.12 Microtubes à centrifuger, de capacité 2 ml.

6 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 la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée figure dans l'ISO 6497 [1].

7 Préparation de l'échantillon

Effectuer deux pesées pour chaque échantillon.

Peser deux portions sous forme granulée ou non granulée (mash), chacune de 50 g environ, dans des fioles coniques de 500 ml. Ajouter 500 ml d'eau et 0,5 ml de polysorbate 20 à 10 % en fraction massique (4.14) aux aliments pour animaux et mélanger vigoureusement sur un agitateur magnétique (5.3) pendant 45 min avec des barreaux d'agitateur de forme ovale (5.4). Transférer 2 ml de l'extrait d'aliment dans un microtube à centrifuger (5.12) et centrifuger (5.8) pendant 3 min à une accélération de 11 000g à 20 000g.

L'hétérogénéité de l'échantillon peut conduire à des coefficients de variation (CV) élevés. En ce qui concerne les échantillons d'aliments pour animaux présentant des CV > 15 %, une telle hétérogénéité peut provenir d'une granulométrie non homogène des produits ou d'une préparation non homogène des aliments pour animaux. Si les échantillons d'aliments présentent des CV élevés, broyer les échantillons d'aliments pour animaux au moyen d'un broyeur Ultra centrifuge³⁾ muni d'un tamis de dimension nominale d'ouvertures de 1 mm. Broyer 150 g d'aliments pour animaux et extraire comme décrit dans le présent article.

8 Mode opératoire

ISO 30024:2009

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9b62f778-acc2-4de6-a76c-5165059938e9/iso-30024-2009>

8.1 Solutions à blanc

Le phosphate inorganique présent dans l'échantillon induit une coloration. Des blancs sont donc réalisés pour chaque échantillon. Pour le calcul de l'activité phytasique, les valeurs des blancs sont soustraites des valeurs obtenues à partir des échantillons.

8.2 Étalons

8.2.1 Solutions étalons de phosphate

La solution mère étalon de phosphate (4.19) est diluée avec du tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique à 0,25 mol/l (4.16) conformément au Tableau 1.

3) Exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.