



**Norme
internationale**

ISO 30024

**Alimentation animale —
Détermination de l'activité
phytasique**

Animal feeding stuffs — Determination of phytase activity

**Deuxième édition
2024-04**

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

[ISO 30024:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024>

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

[ISO 30024:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 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
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire	Page
Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	3
5 Réactifs	3
6 Appareillage	5
7 Échantillonnage et préparation des échantillons	6
8 Extraction des échantillons	6
8.1 Pour les aliments composés (hors aliments minéraux)	6
8.2 Pour les aliments minéraux et les prémélanges	7
8.3 Pour les additifs	7
9 Mode opératoire	7
9.1 Généralités	7
9.2 Solution à blanc	8
9.3 Étalons	8
9.3.1 Solution étalon de phosphate	8
9.3.2 Témoin de niveau d'activité phytasique	8
9.4 Courbe d'étalonnage	8
9.5 Témoin de niveau d'activité phytasique	9
9.6 Pour les aliments composés (hors aliments minéraux)	10
9.7 Pour les aliments minéraux et les prémélanges	11
9.8 Pour les additifs	11
10 Calculs	12
10.1 Formule de la courbe d'étalonnage	12
10.2 Calcul de l'activité phytasique	13
10.3 Correction relative à la pureté et à la teneur en eau de l'acide phytique	13
10.4 Interférence avec les valeurs de blanc	14
11 Fidélité	14
11.1 Limite de détection et limite de quantification	14
11.2 Essais interlaboratoires	15
11.3 Répétabilité	15
11.4 Reproductibilité	15
12 Rapport d'essai	15
Annexe A (informative) Résultats des études interlaboratoires pour les aliments composés (hors aliments minéraux)	17
Annexe B (informative) Résultats de l'étude interlaboratoires pour les aliments minéraux et les prémélanges	21
Annexe C (informative) Résultats des études interlaboratoires pour les additifs	22
Bibliographie	24

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).

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. L'ISO 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.

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.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 10, *Aliments des animaux*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 327, *Alimentation animale - 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).

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 30024:2009), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- le domaine d'application a été élargi aux aliments composés complémentaires, aliments minéraux, prémélanges et additifs destinés à l'alimentation animale;
- les spécifications de l'acide phytique (substrat de phytate) ont été ajoutées.

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.

Introduction

Le présent document a été élaboré en vue de quantifier les préparations commerciales de phytases dans les échantillons de l'alimentation animale afin d'y contrôler la teneur en phytase. 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 30024:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024>

Alimentation animale — Détermination de l'activité phytasique

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie la détermination de l'activité phytasique dans les échantillons d'aliments pour animaux, y compris dans les matières premières d'origine végétale, aliments composés (complets, complémentaires et minéraux), prémélanges et additifs destinés à l'alimentation animale.

La méthode est applicable et validée de manière collaborative pour la détermination de l'activité phytasique dans les aliments complets, les aliments complémentaires, y compris les aliments minéraux, les prémélanges et les additifs, destinés à l'alimentation animale.

La méthode ne fait pas la distinction entre la phytase ajoutée en tant qu'additif destiné à l'alimentation animale et la phytase endogène déjà présente dans les matières premières pour l'alimentation animale. Par conséquent, la méthode est également applicable aux matières premières d'origine végétale pour l'alimentation animale.

La méthode ne s'applique pas 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.

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 unité de phytase

U
quantité d'enzyme qui libère 1 μmol de phosphate inorganique par minute à partir de phytate dans un tampon acétate de pH 5,5 à 37 °C

Note 1 à l'article: Cette valeur est déterminée par les conditions de réaction spécifiées dans le présent document.

3.2 prémélange

prémélange

mélange homogène d'un ou de plusieurs micro-ingrédients/additifs (3.4) avec un diluant et/ou un support, qui n'est pas destiné à l'alimentation directe des animaux

Note 1 à l'article: Les prémélanges sont utilisés pour faciliter l'homogénéisation des micro-ingrédients/additifs dans un mélange de volume plus important.

[SOURCE: ISO 20588:2019, 3.2.39]

3.3 aliment minéral

mélange de minéraux

supplément de minéraux

aliment composé essentiellement d'éléments minéraux, sous forme de mélange s'écoulant librement

Note 1 à l'article: Dans la législation européenne, un aliment minéral contient au moins 40 % de cendres brutes.

Note 2 à l'article: L'aliment minéral est une forme d'*aliment composé* (3.5) et d'aliment complémentaire (voir Note 1 à l'article du 3.5).

[SOURCE: ISO 20588:2019, 3.2.37, modifiée — «aliment minéral» remplace «mélange de minéraux» en tant que terme privilégié. Notes à l'article ajoutées.]

3.4 additif

substance délibérément ajoutée à l'alimentation animale et/ou à l'eau, non consommée comme aliment en tant que tel, avec ou sans valeur nutritionnelle, qui influe sur les caractéristiques, notamment organoleptiques, des aliments pour animaux, les produits animaux, la production animale, la performance, le bien-être animal ou l'environnement

Note 1 à l'article: Les micro-organismes, les enzymes, les régulateurs d'acidité, les oligo-éléments, les vitamines et d'autres produits relèvent du domaine d'application de cette définition, en fonction de l'usage prévu et de la méthode d'administration.

Note 2 à l'article: Les coccidiostatiques et les histomonostatiques constituent une catégorie d'additifs.

Note 3 à l'article: Les *matières premières* (3.6) et les *prémélanges* (3.2) ne font pas partie des additifs.

[SOURCE: ISO 20588:2019, 3.2.18]

3.5 aliment composé

formulation d'alimentation animale

mélange d'alimentation animale

mélange d'au moins deux *matières premières* (3.6), comprenant ou non des *additifs* (3.4), qui est destiné à l'alimentation animale par voie orale, sous la forme d'un aliment complémentaire pour animaux ou d'un aliment complet pour animaux

Note 1 à l'article: Un aliment complémentaire pour animaux est une forme d'aliment composé tel que défini dans l'ISO 20588:2019, 3.2.9.

Note 2 à l'article: Un aliment complet pour animaux est une forme d'aliment composé tel que défini dans l'ISO 20588:2019, 3.2.10.

[SOURCE: ISO 20588:2019, 3.2.11]

3.6 matières premières

produits d'origine végétale ou animale, comprenant ou non des *additifs* (3.4), qui sont destinés à l'alimentation des animaux par voie orale afin de répondre à leurs besoins nutritionnels

Note 1 à l'article: Les matières premières peuvent être à l'état naturel, fraîches ou conservées, être des dérivés de leur transformation industrielle ou des substances organiques ou inorganiques.

Note 2 à l'article: Les matières premières peuvent être utilisées pour l'alimentation des animaux, soit directement en l'état, soit après transformation, ou pour la préparation d'*aliments composés* (3.5), ou en tant que supports des *prémélanges* (3.2).

[SOURCE: ISO 20588:2019, 3.2.23, modifiée — «et les dérivés de leur transformation industrielle, ainsi que les substances organiques ou inorganiques» déplacé de la définition à la Note 1 à l'article.]

4 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 vanadomolybdique. 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 du phosphate.

5 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. Il incombe à l'utilisateur du présent document d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène, de santé et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

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

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

5.3 **Monovanadate d'ammonium**, NH_4VO_3 .

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

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

5.6 **Dihydrogénophosphate de potassium**, KH_2PO_4 .

5.7 **Phytate** (forme anionique de l'acide phytique), **acide phytique**:

- toutes les formes de phytate ou d'acide phytique peuvent être utilisées, par exemple l'acide phytique (PA), l'hydrate de dodécasodium d'acide phytique (Na-PA), l'hydrate de dodécapotassium d'acide phytique (K-PA) et le n-hydrate d'hexamagnésium d'acide phytique (Mg-PA);
- $\leq 0,1$ % en fraction massique de phosphore inorganique;
- titre \geq à 90 % par rapport à la teneur théorique en phosphore (P) (sur sec);
- il convient que le substrat présente un pourcentage d'IP6 (= hexaphosphate d'inositol comprenant six groupes phosphate) supérieur à 95.

Le taux ou le pourcentage d'IP6 peut être obtenu sur demande auprès du fournisseur.

Les hydrates d'acide phytique étant proposés avec différentes teneurs en eau de cristallisation, s'assurer que cette teneur correspond à une quantité stœchiométrique comprise entre 10 mol et 13 mol. En cas d'écart, voir [10.3](#).

Pour le contrôle du phytate, la densité optique du blanc, obtenue à partir de la courbe d'étalonnage (voir [9.4](#)), doit être inférieure à 0,2. Une densité optique plus élevée indique que les réactifs utilisés ont été contaminés par du phosphate ou de la phytase.

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

5.9 **Polysorbate 20**¹⁾.

1) Tween® 20 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 approuve l'emploi du produit ainsi désigné.

5.10 Acide nitrique dilué.

Diluer un volume d'acide nitrique à 65 % en fraction massique (5.5) avec deux volumes d'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de deux ans.

5.11 Solution d'heptamolybdate d'ammonium.

Dissoudre 100,0 g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté (5.2) dans environ 800 ml d'eau (de l'eau chaude à une température comprise entre 50 °C et 60 °C peut être utilisée pour faciliter la dissolution du sel). Ajouter 10 ml de solution d'ammoniacale à 25 % en fraction massique (5.1) 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 deux mois.

5.12 Solution de vanadate d'ammonium.

Dissoudre complètement 2,35 g de monovanadate d'ammonium (5.3) dans environ 400 ml d'eau (de l'eau chaude à une température de 50 °C à 60 °C peut être utilisée pour faciliter la dissolution du sel). Ajouter 20 ml d'acide nitrique dilué (5.10) 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 deux mois.

5.13 Réactif d'arrêt vanado-molybdique.

Mélanger un volume de solution de vanadate d'ammonium (5.12) avec un volume de solution d'heptamolybdate d'ammonium (5.11) et ajouter deux volumes d'acide nitrique dilué (5.10). Mélanger et conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est d'une journée.

5.14 Polysorbate 20, 10 % (fraction massique).

Dissoudre 10,0 g de polysorbate 20 (5.9) avec de l'eau et compléter à 100 ml. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de six mois.

5.15 Tampon acétate, pH 5,5; 0,25 mol/l.

Dissoudre 34,0 g d'acétate de sodium trihydraté (5.8) 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 (5.4) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de deux semaines.

5.16 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 (5.8) 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 (5.4). Ajouter 1 ml de polysorbate 20 à 10 % en fraction massique (5.14) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de deux semaines.

5.17 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 (5.8) 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 (5.4). Ajouter 1 ml de polysorbate 20 à 10 % en fraction massique (5.14) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver à température ambiante. La durée de conservation maximale est de deux semaines.

5.18 Solution de substrat de phytate, 7,5 mmol/l (concentration finale de 3 mmol/l dans la réaction).

Dissoudre 2,00 g de phytate (5.7) dans environ 200 ml de tampon acétate (5.15). En fonction de la pureté et/ou de la teneur en eau de l'acide phytique (voir 10.3), si nécessaire, ajuster légèrement la masse de 2,00 g. Ajuster le pH à $5,50 \pm 0,02$, par exemple avec de l'acide chlorhydrique à 25 % en fraction massique (5.4), et compléter à 250 ml avec le tampon acétate (5.15). La durée de conservation maximale est de deux semaines à 4 °C.

5.19 Solution mère étalon de phosphate, 50 mmol/l.

Sécher environ 10 g de dihydrogénophosphate de potassium (5.6) à 105 °C pendant 2 h et les conserver dans un dessiccateur. Peser environ 682 mg de dihydrogénophosphate de potassium séché, les transférer quantitativement 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 (5.16). Calculer la concentration exacte de la solution mère étalon de phosphate. Conserver à 4 °C. La durée de conservation maximale est de deux semaines.

5.20 Phytase de référence, servant d'échantillon de contrôle qualité, avec activité phytasique d'au moins 3 500 U/g.

5.21 Solution mère de phytase de référence.

Peser 100,0 mg à 300,0 mg de phytase de référence (5.20), les transférer quantitativement dans une fiole jaugée de 100 ml et les dissoudre dans environ 80 ml de tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique à 0,25 mol/l (5.16). Agiter pendant 15 min à 45 min. Retirer le barreau d'agitateur et compléter au volume avec du tampon acétate additionné de polysorbate 20 à 0,01 % en fraction massique à 0,25 mol/l (5.16). La durée de conservation maximale est d'une journée à température ambiante ou, si elle est stockée en parties aliquotes, la durée de conservation maximale à -18 °C est de six mois.

5.22 Farine de maïs.

Broyer du maïs en grains non transformé ou du maïs concassé jusqu'à obtention d'une farine de granulométrie inférieure à 1 mm ou 2 mm et l'utiliser comme matrice de dilution pour l'analyse des aliments minéraux et des prémélanges (voir 8.2). De la farine de maïs ordinaire peut également être utilisée. L'activité phytasique dans la farine de maïs est en soi négligeable. Toutefois, afin de l'exclure complètement et d'empêcher une influence significative par la multiplication des dilutions dans le résultat du calcul, il est recommandé de chauffer la farine pendant une nuit à 130 °C.

Il est possible d'utiliser une matrice équivalente au maïs telle que le concentré protéique de soja, sans activité phytasique, mais il convient alors de la valider en interne.

6 Appareillage

ISO 30024:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/9dbfa537-9df3-45b6-b889-16128afb9359/iso-30024-2024>

Utiliser le matériel courant de laboratoire et, en particulier, le matériel ci-dessous doit être utilisé.

6.1 Bain-marie, thermorégulé à 37 °C ± 0,2 °C (muni d'inserts pour des tubes de 2 ml).

6.2 pH-mètre, pouvant être lu jusqu'à au moins deux décimales.

6.3 Agitateurs magnétiques (puissance ≥ 20 W).

6.4 Barreaux d'agitateur de forme ovale (40 mm × 20 mm) ou barreaux d'agitateur cylindriques (60 mm × 10 mm) ou équivalent.

6.5 Balance analytique, avec une précision de lecture d'au moins 0,1 mg.

6.6 Balance, avec une précision de lecture d'au moins 0,01 g.

6.7 Agitateur vortex.

6.8 Centrifugeuse, pour microtubes à centrifuger (6.12), capable d'une accélération de 11 000 g à 20 000 g.