

Comparaison de la vitesse d'hydrolyse du phytate à pH 2,5 et 4,0 et phosphore libéré *in-vitro* avec une phytase issue de *Buttiauxella sp.* ou d'*Escherichia coli*

Trine CHRISTENSEN (1), Rie MEJDAL (1), Anne-Marie DEBICKI-GARNIER (2), Bertrand MESSAGER (3)

(1) Dupont Feed Technical Service, Brabrand, Danemark

(2) Danisco France, 22 rue Brunel, 75017 Paris, France

(3) Altilis Nutrition Animale, 23 avenue Henri Brulle, 33500 Libourne, France

anne-marie.debicki-garnier@dupont.com

Efficiency of a new phytase derived from *Buttiauxella sp.* compared to an *Escherichia coli* phytase – Speed of phytate hydrolysis at pH 2.5 and 4.0 & release of phosphorus *in-vitro*

The aim of these *in-vitro* analyses was to evaluate the speed of degradation rate of phytate (IP6), also called phytic acid, at different pH to mimic the environments of different areas within the gut intestinal tract. Phytic acid degradation was studied by incubation of sodium phytate from rice with phytase – from *Buttiauxella sp.* and from *Escherichia coli* – for 0 to 120 minutes at 40°C. Incubations were performed at pH 2.5 and 4.0. Hydrolysates were analysed by HPLC according to the method described by Skoglund *et al.* (1997a, 1997b and 1998) using a Dionex CarboPac Guard PA-100 column. Separation was aided by a gradient of HCl. The eluent from the column was reacted in-line with Fe³⁺ perchloric acid solution. IP6 and isomers were detected at 290 nm as positive peaks resulting from the formation of IPisomer- Fe³⁺-ClO₄ complex. Peaks were identified by their relative retention times compared with IP6. The *Buttiauxella sp.* phytase showed the fastest phytate degradation at pH 2.5 and 4.0. After 30 minutes, no IP6 remained in the solution whereas this required 60 minutes with the addition of the *E. coli* phytase. The *Buttiauxella sp.* phytase gave the fastest phosphorus release demonstrating its increased bio efficacy versus the *E. coli* phytase at pH 2.5 and 4.0, pH found in the gizzard and proventriculus of poultry and the stomach of pigs.

INTRODUCTION

Le phytate, appelé également acide phytique ou inositol hexaphosphate (IP6), est un composant inhérent des matières premières végétales utilisées en alimentation animale. C'est une source de phosphore mais aussi un facteur antinutritionnel. A pH acide, le phytate peut se lier directement aux acides aminés basiques, formant des complexes protéine/phytate (Selle *et al.*, 2012) insolubles et résistants à l'hydrolyse par la pepsine, réduisant l'efficacité d'utilisation digestive de la protéine. Le phytate peut aussi augmenter les pertes endogènes (Cowieson *et al.*, 2008 ; Woyengo et Nyachoti, 2013). A un pH plus élevé, le phytate peut se chélater avec des minéraux di- et trivalents (calcium, fer, zinc) en formant des complexes insolubles (Angel *et al.*, 2002) réduisant leur disponibilité. La capacité d'une phytase exogène à dégrader le phytate le plus rapidement et complètement possible à bas pH est donc déterminant pour contrecarrer le potentiel antinutritionnel de la molécule de phytate. L'objectif de cette étude était d'évaluer la vitesse de dégradation de l'acide phytique et la libération de phosphore par une phytase issue de *Buttiauxella sp.* (Axta PHY, Danisco Animal Nutrition, DuPont IB) comparée à une phytase issue d'*Escherichia coli* (Phyzyme XP, Danisco Animal Nutrition, DuPont IB) en faisant varier le pH pour simuler ce qui se passe dans les différentes parties du tube digestif.

1. MATERIEL ET METHODES

La dégradation de l'acide phytique a été évaluée par incubation de phytate de sodium de riz en présence de phytase – issue de *Buttiauxella sp.* et issue d'*Escherichia coli* à 500 FTU/kg - de 0 à 120 minutes et à une température de 40°C. Les incubations ont été réalisées à pH 2,5 et 4,0. Toutes les mesures ont été effectuées en double soit deux répliques par critère. La dégradation de l'acide phytique a été mesurée par HPLC selon la méthode décrite par Skoglund *et al.* (1997a, 1997b et 1998) avec une colonne Dionex CarboPac Guard PA-100. La séparation entre esters a été effectuée grâce à un gradient d'acide chlorhydrique (HCl). L'éluant a été mis en réaction avec une solution d'acide perchlorique Fe³⁺. Les pics résultant de la formation de complexes IPisomère-Fe³⁺-ClO₄ (IP6 et ses isomères IP1-5) ont été détectés à 290 nm. Les pics ont été identifiés par leur temps de rétention comparés à IP6. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes focalisés sur la dégradation d'IP6, molécule qui possède le plus fort potentiel de liaison avec les protéines. Les résultats ont été analysés avec la procédure ANOVA (Minitab® 17.2.1). Un test de Tukey a été utilisé pour mettre en évidence les différences entre moyennes significatives à P < 0,05.

2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

La phytase issue de *Buttiauxella sp.* entraîne une dégradation plus rapide du phytate (IP6) à pH 2,5 et 4,0. Après 30 minutes, il n'y a plus d'IP6 dans la solution alors qu'il faut 60 minutes pour obtenir un résultat comparable avec la phytase issue

d'*Escherichia coli* (Figure 1) Aux pH étudiés, la phytase issue de *Buttiauxella sp.* provoque une libération de phosphore plus rapide qu'avec la phytase issue d'*Escherichia coli* (Figure 2) : elle libère 71,1% et 48,5% plus de phosphore dans les 120 minutes d'incubation, respectivement à pH 2,5 et 4,0.

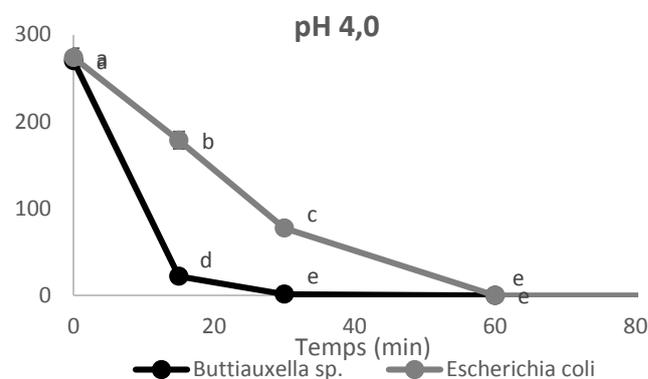
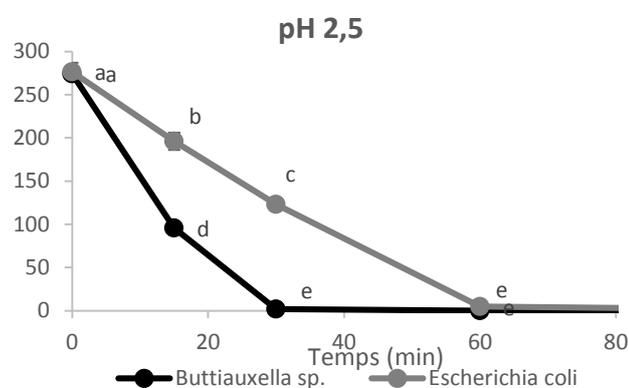


Figure 1 – Dégradation d'IP6 à pH 2,5 et 4,0*

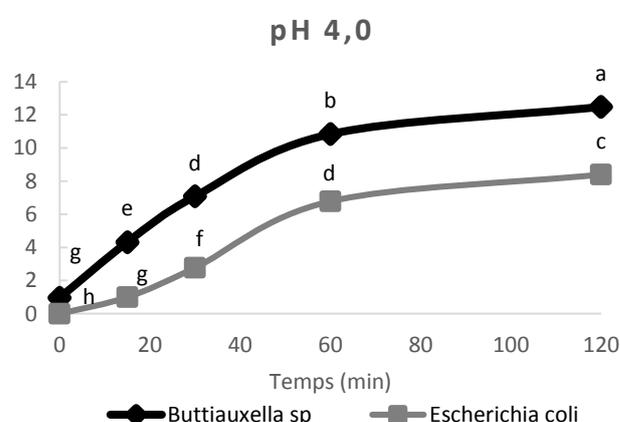
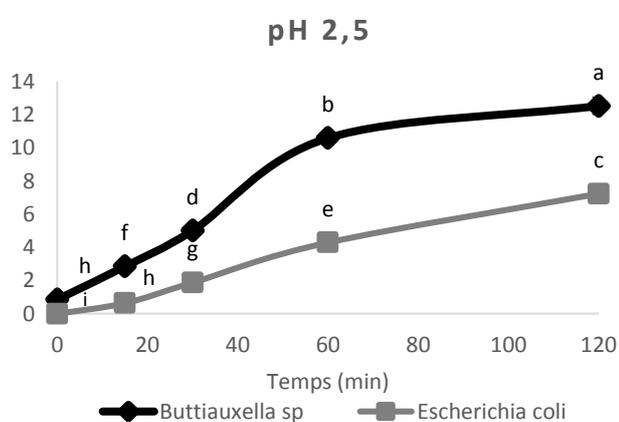


Figure 2 - Libération de phosphore (mM) à pH 2,5 et 4,0*

*Des lettres différentes indiquent une différence significative ($P < 0,05$)

CONCLUSION

Cette étude *in-vitro* démontre que la phytase issue de *Buttiauxella sp.* dégrade plus rapidement le phytate (IP6) comparativement à la phytase *Escherichia coli*, ce qui est déterminant pour réduire le potentiel antinutritionnel de la molécule de phytate très tôt dans le tube digestif. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Menezes-Blackburn *et al.* (2015). En parallèle, elle montre que cette nouvelle phytase libère

le phosphore très rapidement dans la gamme de pH étudiés. Cette étude souligne ainsi un potentiel de plus grande efficacité de la phytase d'origine *Buttiauxella sp.* aux pH observés dans l'estomac des porcs, élément-clé pour expliquer l'effet sur les performances de cette nouvelle phytase, observé dans certains essais *in-vivo* et sur le terrain, qui va au-delà de la simple libération de phosphore.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Angel R., Tamim N.M., Applegate T.J., Dhandu A.S., Ellestad L.E., 2002. Phytic acid chemistry: influence on phytin-phosphorus availability and phytase efficiency. *J. Appl. Poult. Res.*, 11, 417-480.
- Cowieson A.J., Ravindran V., Selle P.H., 2008. Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acid flows in broiler chickens. *Poult. Sci.*, 87, 2287-2299.
- Menezes-Blackburn D., Gabler S., Greiner R., 2015. Performance of seven commercial phytases in an in vitro simulation of poultry digestive tract. *J. Agric. Food Chem.*, 63, 6142-6249.
- Selle P.H., Cowieson A.J., Cowieson N.P., Ravindran V., 2012. Protein-phytate interactions in pig and poultry nutrition: a reappraisal. *Nutrition Research Review*, 25, 1-17.
- Skoglund E., Nils-Gunnar Carlsson N.G., Sandberg A.S., 1997a. Analysis of inositol mono- and diphosphate isomers using high-performance ion chromatography and pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4668-4673
- Skoglund E., Nils-Gunnar Carlsson N.G., Sandberg A.S., 1997b. Determination of isomers of inositol mono- to hexaphosphates in selected foods and intestinal contents using high-performance ion chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 431-436
- Skoglund E., Nils-Gunnar Carlsson N.G., Sandberg A.S., 1998. High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1877-1882
- Woyengo T.A., Nyachoti C.M., 2013. Review: Anti-nutritional effects of phytic acid in diets for pigs and poultry - current knowledge and directions for future research. *Can. J. Anim. Sci.*, 93, 9-21.