2019. Journées Recherche Porcine, 51, 113-114.

Activité phytasique relative dans une gamme de pH allant de 1,5 à 6,5 et taux de dégradation du phytate (IP6) à pH 3,5 : résultats d'une étude *in vitro* comparant trois phytases

Trine CHRISTENSEN (1), Rie MEJLDAL (1), Yueming DERSJANT-LI (2), Anne-Marie DEBICKI-GARNIER (3), Bertrand MESSAGER (4)

(1) DuPont Nutrition Biosciences ApS, DuPont Industrial Biosciences, Brabrand, Danemark
(2) Danisco Animal Nutrition, DuPont Industrial Biosciences, Marlborough, UK
(3) Danisco France SAS, Paris, France
(4) Altilis Nutrition Animale, Libourne, France

anne-marie.debicki-garnier@dupont.com

Phytase relative activity in the pH range 1.5-6.5 and IP6 degradation rate at pH 3.5: an *in vitro* study comparing three phytases

Standard phytase activity is, according to ISO 30024 method, measured at pH 5.5. Phytate is an anti-nutritional factor, and to degrade it quickly and completely, a phytase should be highly active at stomach pH. This *in vitro* study determined 1) the activity of different phytases in a large pH range and 2) their efficacy in degrading phytate in a corn/soya diet. Three phytases were tested: *Buttiauxella* sp. ("B", expressed in *Trichoderma reesei*), *Citrobacter* sp. ("C", expressed in *Aspergillus oryzae*) and *Hafnia* sp. ("H", expressed in *Aspergillus niger*). In test 1, each phytase was reacted with Na-phytate in a multi-buffer solution (pH 1.5-6.5) at 37°C for 60 minutes. Relative activity was measured with a spectrophotometer at OD 415nm. In test 2, each phytase, corresponding to 250, 500 and 1000 FTU/kg, respectively, was incubated in a corn/soya feed aqueous solution at pH 3.5 buffer preparation for 10 minutes at 37°C. Phytic acid (IP6) was measured with HPLC at 290 nm and the degradation rate was established by determining IP6 peaks. Test 1 demonstrated that at pH 3.5, the activity relative to activity at pH 5.5 was 188%, 97% and 89% for phytase B, C and H, respectively. In test 2, at pH 3.5, phytases B, C and H degraded IP6 phytate by 65%, 48% and 17% at 500 FTU/kg, and 85%, 75% and 36% at 1000 FTU/kg, respectively. The *in vitro* tests are useful tools for predicting efficacy in the animals. In these tests, strong differences were highlighted between phytases B, C and H. *In vivo* tests are now needed to validate these results.

INTRODUCTION

Les phytases sont utilisées en nutrition animale depuis les années 1990. L'objectif consistait alors à remplacer une partie du phosphore inorganique pour réduire l'excrétion de phosphore (P) dans les déjections. Ces dernières années, des phytases « nouvelles générations » avec des propriétés catalytiques améliorées, ont vu le jour. D'autre part, le rôle du phytate en tant que facteur antinutritionnel a été étudié et ses impacts sur les performances en production porcine décrits (Woyengo *et al.*, 2010). Le phytate (IP6) a une capacité de chélation importante. Il peut former des complexes avec les minéraux (zinc, cuivre, fer, calcium…), l'amidon ou les protéines (Selle *et al.*, 2000), réduisant ainsi leur disponibilité pour l'animal. Afin de contrecarrer cet effet antinutritionnel et libérer le phosphore, le phytate doit être dégradé dans la première partie du tube digestif, à bas pH où le phytate est soluble et sensible à l'hydrolyse enzymatique (Bedford *et al.*, 1998). L'objectif de cette étude était de comparer l'activité phytasique *in vitro* de trois phytases dans une large gamme de pH de 1,5 à 6,5, et leur capacité à dégrader les phytates à bas pH dans un aliment maïs/soja.

1. MATERIEL ET METHODES

L'activité phytasique est mesurée, selon la méthode ISO 30024, à pH 5,5. Des essais *in vitro* ont été conduits pour évaluer l'activité de trois phytases dans une large gamme de pH, de 1,5 à 6,5 : phytase B (issue de *Buttiauxella* sp., Axtra PHY® de Danisco Animal Nutrition, DuPont), phytase C (issue de *Citrobacter* sp.) et phytase H (issue de *Hafnia* sp.). Pour cela, des activités phytasiques identiques (0,03 FTU/ml, mesuré à pH 5,5, à 37°C, pendant 60 minutes avec 5 mM de phytate de sodium) de chacune des trois phytases, ont été ajoutées à des solutions tampon composées de glycine, acétate, MES (sel sodique d'acide 2-(N-Morpholino) éthanesulfonique). Du phytate de sodium issu de riz (5 mM) a été ajouté aux solutions, puis elles ont été incubées à 37°C pendant 60 minutes. Un réactif coloré molybdate/vanadate a été ajouté pour stopper la réaction. Les solutions ont finalement été centrifugées et l'activité phytasique a été déterminée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre à 415 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage relatif à l'activité à pH 5,5.

La capacité des trois phytases à dégrader les phytates alimentaires a été mesurée *in vitro* à pH 3,5 et comparée à celle d'un témoin sans phytase. Le substrat était un aliment commercial maïs/soja, granulé à 95°C. Les granulés ont été moulus à environ 0,7 µm. Une suspension contenant 10% de substrat a été réalisée dans un tampon de glycine 0,1 M à pH 3,5. Puis des activités identiques de chacune des trois phytases correspondant à 250, 500 et 1000 FTU/kg d'aliment respectivement (activité mesurée à pH 5,5, à 37°C, pendant 60 minutes avec 5 mM de phytate de sodium), ont été ajoutées à la suspension maïs/soja. Les échantillons ont été incubés au bain-marie pendant 10 minutes à 37°C sous agitation. La réaction a été stoppée par addition d'acide chlorhydrique (0,5M) et la solution extraite a été remise en incubation pendant 60 minutes supplémentaires à 37° pour une extraction complète du phytate de sa matrice. Après centrifugation du surnageant, la teneur en IP6 a été déterminée par HPLC selon la méthode décrite par Skoglund *et al.* (1997, 1998) avec une colonne Dionex CarboPac Guard PA-100, à 290 nm. Les aires de chacun des pics ont été comparées à une courbe standard d'acide phytique (Sigma #3168). Le taux de dégradation du phytate a été établi en comparant les pics d'IP6 de chaque phytase à celui du témoin sans phytase. Les données ont été analysées par ANOVA (Minitab® 18.1) suivi d'un test de Tukey pour détecter les moyennes significativement différentes à $P < 0,05$.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

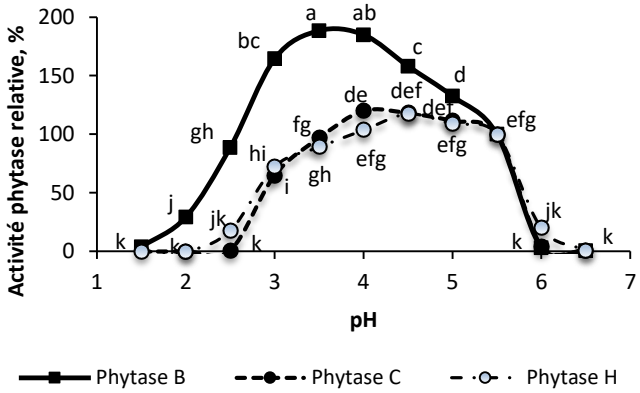

Figure 1 – Activité phytasique relative dans une gamme de pH allant de 1,5 à 6,5*

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

Aux pH de 1,5 et 2,0, seule la phytase B présente une activité phytasique (4% et 29% respectivement). A pH 3,0, 3,5 et 4,0, l'activité phytasique relative de la phytase B est respectivement 2,5; 2,0 et 1,5 fois plus importante que celle des phytases C et H. La synthèse de nombreuses études en monogastriques, démontre qu'en conditions acides, comme dans l'estomac chez le porc, des interactions calcium-phytate génèrent des complexes pouvant aussi impacter négativement l'activité des phytases exogènes (Selle *et al.*, 2009).

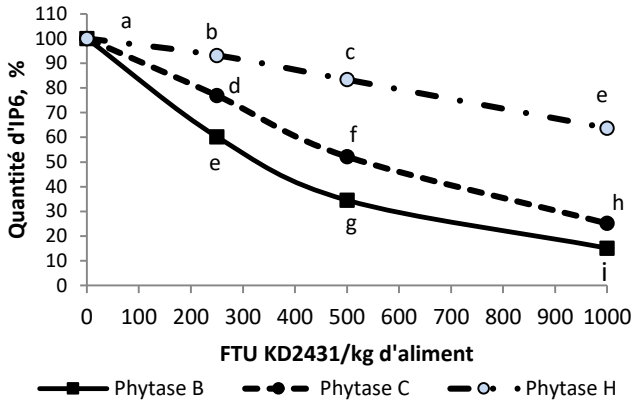

Figure 2 – Dégradation du phytate (IP6) dans un aliment KD2431 maïs/soja à pH 3,5

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

Aux doses testées, la phytase B dégrade une plus grande quantité de phytate (IP6) que les phytases C et H. Par exemple, à 250 FTU/kg, elle dégrade autant de phytate que la phytase H à 1000 FTU/kg. Dans un essai *in vivo*, la phytase issue de *Buttiauxella* a démontré son efficacité à dégrader le phytate (IP6) à des doses croissantes chez des porcs en croissance, parallèlement à une amélioration de la digestibilité de certains acides aminés (Zeng *et al.*, 2016). Chez des porcelets nourris à base de blé ou de maïs et soja, des doses de 0 à 2000 FTU/kg d'aliment ont amélioré linéairement ($P < 0,05$) le gain moyen quotidien et l'indice de consommation, et réduit l'excrétion de P et Ca (Dersjant-Li *et al.*, 2017).

CONCLUSION

La phytase B issue de *Buttiauxella* sp. est capable de libérer plus de P et de dégrader plus rapidement les phytates à bas pH. Cette aptitude peut se révéler d'une importance majeure pour optimiser les performances et le bilan environnemental en production porcine.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bedford MR, Schulze H, 1998. Exogenous enzymes for pigs and poultry. Nutr Res Rev. 11, 91-114.
- Dersjant-Li Y, Wealleans AL, Barnard LP, Lane S, 2017. Effect of increasing *Buttiauxella* phytase dose on nutrient digestibility and performance in weaned piglets fed corn or wheat based diets. Anim Feed Sci Technol. 234, 101-109.
- Selle PH, Ravindran V, Caldwell A, Bryden WL, 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. Nutr Res Rev. 13, 255-278.
- Selle PH, Cowieson AJ, Ravindran V, 2009. Consequences of calcium interactions with phytate and phytase for poultry and pigs. Livest Sci. 124, 126-141.
- Skoglund E., Nils-Gunnar Carlsson N.G., Sandberg A.S., 1997. 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., 1997. 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., 1998. High-performance chromatographic separation of inositol phosphate isomers on strong anion exchange columns. J. Agric. Food Chem., 46, 1877-1882.
- Woyengo TA, Adeola O, Udenigwe CC, Nyachoti CM, 2010. Gastro-intestinal digesta pH, pepsin activity and soluble mineral concentration responses to supplemental phytic acid and phytase in piglets. Livest Sci. 134, 91-93.
- Zeng ZK, Li QY, Zhao PF, Xu X, Tian QY, Wang HL, Pan L, Yu S, Piao XS, 2016. A new *Buttiauxella* phytase continuously hydrolyzes phytate and improves amino acid digestibility and mineral balance in growing pigs fed phosphorous-deficient diet. J Anim Sci. 94, 629-638.