

INTERET D'UNE PROTEASE DANS UN ALIMENT CONTENANT DES CARBOHYDRASES POUR AMELIORER LA DIGESTIBILITE DES PROTEINES ET DES ACIDES AMINES CHEZ LE JEUNE POULET

Romero Luis¹, Debicki-Garnier Anne-Marie², Messenger Bertrand³,

¹*Danisco Animal Nutrition - Dupont Industrial Biosciences - Marlborough, SN8 1XN, UK*

²*Danisco France - 20 rue Brunel - 75017 Paris, France*

³*Altilis Nutrition Animale - 31 rue Pistouley – 33500 Libourne, France*

anne-marie.debicki-garnier@dupont.com

RÉSUMÉ

Quatre essais de digestibilité ont été conduits dans deux sites expérimentaux (Nouvelle Zélande et USA) sur des poulets mâles Ross 308 nourris de un à 21 jours d'âge. Chaque site a réalisé 2 essais, avec et sans drèches de maïs. Tous les essais comportaient 3 régimes : sans enzymes, supplémentés avec une préparation xylanase/amylase (XA) ou une préparation xylanase/amylase/protéase (XAP). De l'oxyde de titane a été ajouté à tous les aliments en tant que marqueur indigestible. Les animaux ont eu accès à volonté à l'eau et à l'aliment sous forme de farine. A 21 jours d'âge les contenus de l'iléon ont été collectés. L'azote (N), les acides aminés (AA) et le titane ont été analysés dans les échantillons de digesta et d'aliments et les coefficients de digestibilité iléale apparente (DIA) ont été déterminés en se basant sur la concentration en marqueur indigestible. Une analyse par essai a été effectuée, suivie d'une analyse des quatre essais combinés. L'ajout de XAP a amélioré significativement la DIA de N et de tous les AA à l'exception de la méthionine, tandis que XA n'a permis aucune amélioration significative de N ou des AA, quelque soit l'AA considéré. L'amélioration moyenne de la DIA des AA en présence de XAP était de 2.8%. Les AA qui ont montré la réponse la plus forte à l'ajout de protéase étaient la cystéine, la thréonine, la glycine et la valine. La méthionine et la lysine ont montré une réponse faible, qui peut s'expliquer par la présence partielle de ces AA sous forme libre. Une relation linéaire forte a été mise en évidence entre la quantité d'AA non digestibles et la réponse à l'ajout de XAP ($P < 0.0001$). XAP a augmenté l'hydrolyse de la fraction indigestible des acides aminés dans l'iléon de 12 à 13%. L'amélioration de la DIA des AA pourrait donc s'expliquer par la libération d'acides aminés inclus dans des protéines ou des peptides peu ou pas hydrolysables par l'hôte. Sa mise en œuvre permettrait de réduire l'excrétion d'azote dans l'environnement et d'améliorer le bien-être animal en améliorant la qualité des litières.

ABSTRACT

Benefit of the addition of a protease in diets containing carbohydrases to improve protein and amino acid ileal digestibility in broilers

Four digestibility trials were carried out in two experimental sites (New Zealand and USA) on male Ross 308 broilers from 1 to 21 days of age. Each site has done two trials, with/without corn DDGS. In each trial the control was either unsupplemented or supplemented with a xylanase/amylase combination (XA) or a xylanase/amylase/protease combination (XAP). Birds were allowed free access to water and feed in mash form. Titanium dioxide was added to all diets as an indigestible marker. At 21 days of age, contents of the lower ileum were obtained by gentle flushing with distilled water. Samples of digesta and diets were analysed for dry matter, nitrogen (N), amino acids (AA) and titanium and calculation of apparent ileal digestibility (AID) coefficients based on the concentration of indigestible marker was performed. Results of each trial was analysed, then combined analyses of the four trials were performed. XAP significantly improved the AID of N and all AA but methionine, whilst XA didn't exhibit significant differences on the AID of any of the evaluated AA compared to the control. The average increment in the AID of AA from the addition of XAP was 2.8%. The AA with the greatest digestibility response to XAP were cysteine, threonine, glycine and valine. In contrast, methionine and lysine exhibited low response, part of it may be explained by the inclusion of crystalline AA, which are highly digestible. A strong linear relationship between the amount of undigested AA and the response to XAP addition was found ($P < 0.0001$): XAP increased the AID of the indigestible fraction of AA by 12 to 13%. Improvement of AID of AA could be explained by the release of AA from proteins and peptides the host is not, or not enough, able to hydrolyse. The implementation of this enzyme in feed might lead to a substantial reduction in nitrogen excretion in the environment and the improvement of animal well-fare through a higher litter quality.

INTRODUCTION

Les protéines des aliments poulets de chair proviennent principalement du tourteau et des graines de soja, mais aussi de sources alternatives comme les tourteaux de colza et de tournesol, en particulier en Europe, des légumineuses, des co-produits de céréales et dans certains pays des farines de viande. Les protéines du tourteau de soja sont considérées comme bien valorisées par les poulets mais la digestibilité des acides aminés des autres sources de protéines n'est pas aussi bonne que celle du soja. Les protéases exogènes d'origine microbienne sont de plus en plus utilisées dans les aliments volailles, en combinaison avec des carbohydrases ayant pour cibles les parois cellulaires et la part d'amidon peu digestible. Cette étude avait pour objectif d'étudier l'intérêt de l'ajout d'une protéase exogène, en complément d'une xylanase et d'une amylase, sur l'amélioration de la digestibilité de la protéine et des acides aminés de l'aliment sur des poulets de 1 à 21 jours d'âge. Comprendre l'amplitude et la variabilité de la réponse en fonction des acides aminés permettrait de mieux valoriser le potentiel de cette protéase.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux et dispositif expérimental

Quatre essais de digestibilité ont été conduits sur des poulets mâles Ross 308 nourris de un à 21 jours d'âge avec des aliments maïs-soja (deux essais) ou maïs-soja-drèches de maïs (deux essais). Tous les essais comportaient 3 régimes : sans enzymes (Témoin), supplémentés avec une préparation enzymatique contenant une xylanase et une amylase (XA*) ou une xylanase, une amylase et une protéase subtilisine (XAP**), voir les détails en fin de page 3. Les essais 1 et 2 ont été conduits à l'université de Massey (Nouvelle Zélande) et comprenaient 6 répétitions par traitement, avec 6 poulets par cage/répétition. Les essais 3 et 4 ont été conduits à l'université de l'Illinois (USA), et consistaient en 8 répétitions par traitement avec 5 poulets par cage/répétition. Les aliments principalement à base de maïs et de soja étaient distribués sous forme de farine (tableau 1). Dans chacun des sites, un essai mettait en œuvre un aliment avec et sans drèches de maïs. De l'oxyde de titane a été ajouté à tous les aliments en tant que marqueur indigestible. Pour chaque essai, un seul lot d'aliment a été fabriqué puis divisé en trois aliments expérimentaux dont deux contenaient des enzymes. Les préparations enzymatiques concentrées ont été sprayées sur un support blé, puis mélangées à du maïs et ajoutées à 0.5kg/tonne d'aliment. Les poulets étaient soumis à un programme 20 heures de lumière/4 heures d'obscurité et avaient accès à volonté à l'eau et à l'aliment. Les poulets ont été nourris avec l'aliment témoin de 1 à 12 jours d'âge pour les essais 1 et 2, et de 1 à 7 jours d'âge pour les

essais 3 et 4, puis avec les aliments expérimentaux jusqu'à 21 jours d'âge.

1.2. Mesures et calculs réalisés

A 21 jours d'âge les oiseaux ont été euthanasiés et les contenus de l'iléon ont été collectés par lavage avec de l'eau distillée. Les contenus digestifs ont été poolés par cage et immédiatement congelés, lyophilisés, puis analysés. L'azote (N), les acides aminés (AA) et le titane ont été analysés dans les échantillons de digesta et d'aliments. Le calcul des coefficients de digestibilité iléale apparente basé sur la concentration en marqueur indigestible a été effectué comme rapporté par Ravindran et al (2005). Les résultats de chaque essai ont d'abord été analysés séparément en utilisant un modèle linéaire à un facteur (Proc Mixed ; SAS, 1997) incluant l'effet du traitement alimentaire. Les résultats des quatre essais ont ensuite été réunis dans une base de données unique et analysés selon la même procédure SAS. Lorsqu'un effet des traitements était significatif ($P < 0,05$), les comparaisons multiples des moyennes ont été effectuées en utilisant un test t de Student. Les résultats ont ensuite été combinés dans une même base de données ce qui a permis d'augmenter la précision de l'analyse et l'étude de l'interaction entre la présence d'enzymes et la composition de l'aliment. Les résultats ont été analysés en utilisant un modèle linéaire à 2 facteurs (Proc Mixed ; SAS, 1997). Il a été mis en évidence au préalable que les différences liées aux méthodologies et aux conduites d'élevages entre les sites expérimentaux n'étaient pas significatives. Des régressions linéaires ont été effectuées pour calculer l'effet des enzymes sur la quantité d'acides aminés non digérés au niveau iléal comparativement aux aliments témoins, en utilisant la procédure REG de SAS (SAS, 1997).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

L'analyse de chaque essai séparément a mis en évidence un effet significatif ($P < 0,05$) de l'ajout de XAP sur la digestibilité de l'azote dans l'essai 1 uniquement. D'autre part les valeurs de digestibilité iléale apparente de l'azote étaient inférieures en présence de drèches de maïs comparativement aux formules maïs/soja (tableau 2). L'ajout d'enzymes exogènes a amélioré significativement ($P < 0,05$ à 0.001) la digestibilité iléale apparente (DIA) de tous les acides aminés analysés. La présence de drèches de maïs (7 et 10%) dans l'aliment a mis en évidence une DIA significativement inférieure à celle mesurée avec les aliments maïs/soja, pour tous les acides aminés considérés (tableau 3). XAP a amélioré significativement la digestibilité apparente de l'azote et des acides aminés à l'exception de la méthionine, tandis que l'ajout de XA n'a permis aucune amélioration significative quelque soit l'acide aminé

considéré. L'amélioration moyenne de la digestibilité des acides aminés en présence de XAP était de 2.8 %.

L'amélioration de la digestibilité iléale des acides aminés en réponse à l'ajout de xylanases aux aliments volailles a été décrite précédemment et il a été suggéré qu'une partie de cette amélioration serait due à une diminution de la sécrétion de mucines, liée à une meilleure digestion des parois cellulaires et à la réduction de la concentration en composés fibreux responsables d'une irritation de l'épithélium intestinal (Cowieson et Bedford, 2009). Il a aussi été rapporté que la présence d'amylase exogène entraînerait une diminution de l'expression d'alpha-amylase pancréatique (Jiang et al, 2008), diminution qui se traduirait par une amélioration de la digestibilité apparente iléale des acides aminés. Enfin une amélioration de la digestibilité apparente des acides aminés, dans des aliments à base de maïs/soja, par rapport à un témoin sans enzymes, suite à l'ajout d'un complexe xylanase, amylase, protéase a été reportée (Cowieson et Ravindran, 2008). Cependant l'intérêt de la présence d'une protéase en complément de carbohydrases n'avait pas été évalué jusqu'à présent. Les données présentées dans cet essai laissent à penser que, en présence de carbohydrases, l'addition de la protéase serait le principal facteur explicatif de l'amélioration des coefficients de digestibilité des acides aminés. Les acides aminés qui ont montré la réponse la plus forte à l'ajout de protéase étaient la cystéine (+5.38%), la thréonine (+4.36%), la glycine (+3.57%) et la valine (+3.28%). La cystéine et la thréonine ont été décrites comme les acides aminés répondant avec le plus d'intensité à l'ajout de XAP dans des aliments maïs/soja (Cowieson et Ravindran, 2008). A l'opposé les acides aminés exhibant les réponses les plus faibles étaient la méthionine (+0.98%), la glutamine (+1.96%), la lysine (+2.00%) et l'arginine (+2.07%), ce qui est en accord avec les résultats précédemment publiés (Cowieson et Ravindran, 2008). La faible amélioration de digestibilité de la lysine et de la méthionine est à mettre en relation avec la présence partielle de ces acides aminés sous forme libre, hautement digestible. Ainsi la méthionine présentait la plus faible amélioration avec le plus fort taux d'incorporation sous forme libre (environ 40% des apports). Afin de mieux comprendre les raisons de la variabilité de la réponse à l'ajout de XAP sur la digestibilité des différents acides aminés, la réponse sur la fraction indigestible de chaque acide aminé a été analysée.

Dans cette étude il est apparu que la variable la plus pertinente pour expliquer ces divergences n'était pas le coefficient de digestibilité mais la quantité d'acides aminés indigestibles au niveau iléal. Une relation linéaire forte a été mise en évidence entre la quantité d'acides aminés non digestibles et la réponse à l'ajout de XAP ($R^2 = 0.94$ et 0.96 pour les aliments maïs/soja et maïs/soja/drèches de maïs respectivement, $P < 0.0001$), mais pas en réponse à l'ajout de XA ($R^2 = 0.42$ et 0.59 pour les aliments maïs/soja et maïs/soja/drèches de maïs respectivement, $P < 0.01$). XAP a augmenté l'hydrolyse de la fraction indigestible des acides aminés dans l'iléon de 12 à 13% contre moins de 3% pour XA (figure 1). Cette protéase permettrait donc de libérer les acides aminés inclus dans des protéines ou des peptides peu ou pas hydrolysables par l'hôte.

CONCLUSION

L'ajout d'une protéase dans des aliments contenant des carbohydrases a amélioré significativement la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez des poulets nourris avec des aliments maïs/soja avec ou sans drèches de maïs, jusqu'à 21 jours d'âge. La cystéine, la thréonine, la glycine et la valine ont montré une réponse forte à l'ajout de protéase. D'autre part une relation linéaire a été mise en évidence entre la quantité d'acides aminés non digestibles et la réponse à l'ajout de XAP. La mise en œuvre de cette protéase en formulation, en prenant en compte l'amélioration de la digestibilité de la protéine et des acides aminés, permettrait de réduire l'excrétion d'azote dans l'environnement et d'améliorer la qualité des litières donc le bien-être animal. Des essais complémentaires s'avèrent cependant nécessaires pour confirmer l'effet de sa mise en œuvre sur les performances : gain de poids et indice de consommation.

* Prototype XA : 2000 unités de xylanase produites par *Trichoderma reesei* et 1800 unités d'amylase produites par *Bacillus amyloliquefaciens*

** XAP : 1000 unités de xylanase produites par *Trichoderma reesei*, 1800 unités d'amylase produites par *Bacillus amyloliquefaciens* et 4000 unités de protéase produites par *Bacillus subtilis*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cowieson A.J., Bedford M.R., 2009. World's Poult. Sci. J., (65), 609-624
 Cowieson A.J., Ravindran V., 2008. Br. Poult. Sci., (49), 37-44
 Cowieson A.J., Singh D.N., Adeola O., 2006. Br. Poult. Sci., (47), 490-500
 Jiang Z., Zhou Y., Lu F., Han Z., Wang T., 2008. Asian-Aust. J. Anim. Sci. (21), 97-102
 Ravindran V., Hew L.I., Ravindran G., Bryden W.L., 2005. Anim. Sci. (81), 85-97

Tableau 1. Composition et valeurs nutritionnelles des aliments utilisés dans les quatre essais

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4
<i>Matières premières (g/kg)</i>				
Maïs	606.0	548.4	577.0	539.7
Tourteau de soja 48	337.9	289.1	372.1	339.0
Drèches de maïs	0.0	100.0	0.0	70.0
Huile de soja	15.0	22.1	12.4	13.1
Phosphate bicalcique	13.8	12.1	13.5	12.5
Carbonate de calcium	11.7	12.9	11.7	12.1
Bicarbonate de sodium	2.7	1.6	0.0	0.0
Sel	2.0	2.3	3.5	3.5
L-lysine HCl	1.8	2.7	0.5	1.0
DL méthionine	2.6	2.2	2.3	2.1
L-thréonine	0.0	0.1	0.0	0.0
Prémix	3.0	3.0	3.5	3.5
Dioxyde de titane	3.0	3.0	3.0	3.0
Maïs +/- enzymes sprayées sur support blé	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Valeurs nutritionnelles calculées (g/kg)</i>				
Energie métabolisable apparente (MJ/kg)	12.5	12.5	12.4	12.4
Protéine brute	217	217	230	229
Lysine totale	13.0	13.0	13.0	13.0
Méthionine totale	6.0	5.9	5.8	5.7
Méthionine + cystéine totales	9.5	9.5	9.5	9.5
Calcium	8.5	8.5	8.5	8.5
Phosphore disponible	3.8	3.8	3.8	3.8

Tableau 2. Effets de la supplémentation enzymatique sur les coefficients de digestibilité apparente de l'azote (N) chez des poulets de 21 jours d'âge

Essai	Enzyme	Drèches de maïs (g/kg)	Digestibilité iléale apparente de N
Essai 1	Témoin	0	0.806 ^y
	XA	0	0.817 ^{xy}
	XAP	0	0.829 ^x
	SEM		0.005
	Probabilité		0.012
Essai 2	Témoin	100	0.793
	XA	100	0.810
	XAP	100	0.812
	SEM		0.008
	Probabilité		0.18
Essai 3	Témoin	0	0.822
	XA	0	0.821
	XAP	0	0.833
	SEM		0.007
	Probabilité		0.40
Essai 4	Témoin	70	0.780
	XA	70	0.784
	XAP	70	0.800
	SEM		0.011
	Probabilité		0.43

Les aliments témoins ont été supplémentés avec une préparation enzymatique contenant une xylanase et une amylase (prototype XA) ou une xylanase, une amylase et une protéase (XAP)

^{x,y} Les moyennes sans lettres communes diffèrent significativement à P < 0,05

Tableau 3. Effets de la supplémentation enzymatique et de la présence de drèches de maïs sur les coefficients de digestibilité iléale apparente de l'azote et des acides aminés chez des poulets de 21 jours d'âge

	Enzyme				Drèches de maïs (g/kg)			Probabilité		
	Témoin	XA	XAP	SEM	0	70-100	SEM	Enzyme	Drèches de maïs	Enzyme x drèches de maïs
N	0.800 ^y	0.807 ^{xy}	0.818 ^x	0.004	0.822 ^x	0.795 ^y	0.004	0.016	<0.001	0.90
Asparagine	0.796 ^y	0.801 ^y	0.820 ^x	0.004	0.826 ^x	0.785 ^y	0.003	<0.001	<0.001	0.75
Thréonine	0.734 ^y	0.738 ^y	0.766 ^x	0.008	0.766 ^x	0.725 ^y	0.007	<0.001	<0.001	0.56
Sérine	0.793 ^y	0.791 ^y	0.817 ^x	0.006	0.814 ^x	0.786 ^y	0.005	<0.001	<0.001	0.49
Glutamine	0.869 ^y	0.871 ^y	0.886 ^x	0.003	0.886 ^x	0.865 ^y	0.003	<0.001	<0.001	0.79
Proline	0.819 ^y	0.825 ^y	0.841 ^x	0.005	0.834 ^x	0.822 ^y	0.004	<0.001	0.015	0.52
Glycine	0.757 ^y	0.764 ^y	0.784 ^x	0.007	0.785 ^x	0.752 ^y	0.006	0.002	<0.001	0.69
Alanine	0.822 ^y	0.824 ^y	0.843 ^x	0.005	0.839 ^x	0.820 ^y	0.004	0.003	<0.001	0.89
Valine	0.792 ^y	0.800 ^y	0.818 ^x	0.005	0.820 ^x	0.787 ^y	0.004	0.002	<0.001	0.45
Isoleucine	0.815 ^y	0.820 ^y	0.836 ^x	0.005	0.840 ^x	0.808 ^y	0.004	0.005	<0.001	0.72
Leucine	0.837 ^y	0.839 ^y	0.860 ^x	0.005	0.852 ^x	0.840 ^y	0.004	<0.001	0.015	0.66
Tyrosine	0.829 ^y	0.833 ^y	0.852 ^x	0.004	0.853 ^x	0.823 ^y	0.004	<0.001	<0.001	0.92
Phénylalanine	0.844 ^y	0.846 ^y	0.865 ^x	0.007	0.861 ^x	0.842 ^y	0.007	<0.001	<0.001	0.82
Histidine	0.821 ^y	0.823 ^y	0.842 ^x	0.018	0.839 ^x	0.818 ^y	0.018	<0.001	<0.001	0.72
Lysine	0.849 ^y	0.845 ^y	0.866 ^x	0.009	0.874 ^x	0.832 ^y	0.008	0.023	<0.001	0.66
Arginine	0.871 ^y	0.872 ^y	0.889 ^x	0.008	0.891 ^x	0.864 ^y	0.008	0.003	<0.001	0.68
Cystéine	0.706 ^y	0.713 ^y	0.744 ^x	0.006	0.741 ^x	0.701 ^y	0.005	<0.001	<0.001	0.93
Méthionine	0.917 ^{xy}	0.913 ^y	0.926 ^x	0.004	0.933 ^x	0.904 ^y	0.006	0.041	<0.001	0.79

Les aliments témoins ont été supplémentés avec une préparation enzymatique contenant une xylanase et une amylase (prototype XA) ou une xylanase, une amylase et une protéase (XAP), (Avizyme 1502, Danisco Animal Nutrition, Dupont Industrial Biosciences)

^{xy} Les moyennes sans lettres communes diffèrent significativement à P < 0,05

Figure 1. Amélioration de la digestibilité iléale apparente des acides aminés chez des poulets de 21 jours, calculée relativement à la quantité d'acides aminés non digérés au niveau iléal (g/kg), suite à l'ajout de xylanase et d'amylase avec et sans protéase dans des aliments base maïs-soja ou maïs-soya-drèches. Chaque point représente la moyenne des valeurs mesurées pour un acide aminé donné dans les 2 essais.

