

ANALYSE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DES PLANTES FOURRAGÈRES

III. — ÉTUDES SUR LE DOSAGE DE LA LIGNINE

M. JOURNET et R. JARRIGE

avec la collaboration technique de Renée LEFAIVRE et Marie-Térèse GOZZELINO

*Station de Recherches sur l'Élevage,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

Trois études ont été poursuivies pour améliorer le dosage et préciser la composition et la digestibilité de la lignine brute, isolée des plantes fourragères à la suite des traitements suivants (JARRIGE, 1961) : eau, alcool-benzène, SO_4H_2 5 p. 100 pendant 3 heures, SO_4H_2 72 p. 100, SO_4H_2 3 p. 100.

La lignine brute ainsi obtenue contient une proportion extrêmement variable de matières azotées (de 11 à 42 p. 100 dans les 34 fourrages étudiés) qui augmente en même temps que la teneur en matières azotées du fourrage. Elle présente un coefficient de digestibilité variable avec les échantillons mais pratiquement toujours positif. La lignine corrigée, obtenue après déduction des matières azotées, a un coefficient de digestibilité plus faible que celui de la lignine brute, surtout dans les fourrages jeunes, riches en matières azotées : 8,9 au lieu de 10,9 p. 100 dans les 11 foin et 5,6 au lieu de 16,7 p. 100 dans les 14 échantillons de ray-grass anglais et de dactyle étudiés.

Dans le but d'isoler une lignine plus pauvre en azote et plus indigestible, nous avons introduit entre l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 et l'hydrolyse par SO_4H_2 72 p. 100, un traitement à la pepsine (ELLIS et *al.*, 1946), à la trypsine (ARMITAGE et *al.*, 1948) ou au CO_3Na_2 . Ces traitements ont, avec une efficacité variable, diminué la lignine brute en réduisant non seulement la quantité de matières azotées recouvrées dans la lignine, mais encore, et surtout, la lignine corrigée. Par contre, aucun d'eux n'a diminué de façon significative la teneur en azote de la lignine brute des fourrages, pas plus que la digestibilité de la lignine des foin. Cependant, la digestion tryptique et, à un degré moindre, le traitement au carbonate, ont permis d'isoler une lignine nettement moins digestible dans certains fourrages verts.

Sauf pour de tels échantillons, il ne semble pas intéressant d'introduire systématiquement un des traitements précédents dans la méthode de dosage de la lignine utilisé jusqu'à maintenant. L'examen des résultats obtenus par les autres auteurs permet de penser que les autres méthodes de dosage de la lignine n'isolent pas, elles aussi, une lignine dépourvue d'azote ou indigestible dans tous les fourrages, plus spécialement dans les plantes jeunes, riches en matières azotées.

De toute façon, il sera toujours difficile d'apprécier correctement l'intérêt de ces traitements ou de ces méthodes tant qu'on ne disposera pas d'une méthode de référence pour doser la lignine et, par suite, tant qu'on ne connaîtra pas mieux les caractéristiques des lignines des plantes fourragères.

INTRODUCTION

La lignine représente de 2 à 10 p. 100 de la matière sèche des plantes fourragères dont elle détermine, dans une large mesure, le coefficient de digestibilité (LANCASTER, 1943). Elle est en moyenne peu digestible, ce qui permet de l'utiliser comme « marqueur » pour mesurer l'importance de la digestion aux différents niveaux du tractus digestif (HALE, DUNCAN et HUFFMAN, 1947), ainsi que la digestibilité ou la quantité du fourrage ingéré (FORBES et GARRIGUS, 1948).

De nombreuses méthodes de dosage de la lignine ont été proposées ou utilisées pour les études sur la composition, l'utilisation digestive et la valeur alimentaire des plantes fourragères (cf. THOMAS et ARMSTRONG, 1949 — MOON et ABOU RAYA, 1952 — BRAUNS, 1952 — BRAUNS et BRAUNS, 1960 — FISCHER, 1961 *b*). La plupart ont en commun le traitement principal par SO_4H_2 72 p. 100 pour hydrolyser la cellulose mais diffèrent par le nombre et la nature des extractions préalables (dégraissage) et des traitements introduits pour solubiliser les matières azotées et les polysaccharides non cellulosiques. En fonction de ces derniers traitements, elles peuvent être ainsi réparties en quatre groupes (tab. 1) :

a) celles qui ne comportent que des hydrolyses acides, dont la méthode de NORMAN et JENKINS (1934) est la première en date ;

b) celles qui comportent une digestion pepsique et, parmi elles, la méthode d'ELLIS, MATRONE et MAYNARD (1946) qui a été jusqu'ici la plus utilisée ;

c) celles qui comportent une digestion trypsique dont la méthode d'ARMITAGE, ASHWORTH et FERGUSON (1948) est la seule utilisée pour les fourrages ;

d) des méthodes plus complexes comportant plusieurs hydrolyses enzymatiques ou un traitement alcalin.

C'est essentiellement parce que les lignines des plantes fourragères sont très mal connues et probablement variables avec la famille et le stade de développement qu'il n'existe pas une véritable méthode de référence. Toutes les méthodes précédentes sont conventionnelles et isolent des lignines impures contenant une certaine quantité de matières azotées.

L'un d'entre nous (JARRIGE, 1961) a montré qu'on pouvait séparer de façon satisfaisante les différents groupes de constituants glucidiques au cours du dosage de la lignine suivant le schéma de NORMAN et JENKINS (1934), à condition d'introduire une extraction aqueuse préliminaire et d'allonger la durée de la préhydrolyse par l'acide dilué : les glucides cytoplasmiques, les hémicelluloses (ou plutôt, les polysaccharides non cellulosiques) et la cellulose sont estimés respectivement par le pouvoir réducteur de l'extrait aqueux (après hydrolyse), de l'hydrolysate par SO_4H_2 , 5 p. 100 pendant 3 heures et de l'hydrolysate par SO_4H_2 , 72 p. 100. La lignine brute ainsi obtenue contient encore des matières azotées et probablement d'autres substances interférentes ; elle présente un coefficient de digestibilité nettement positif, de l'ordre de 10 à 15 p. 100 pour les fourrages verts.

Nous avons voulu savoir si on pouvait obtenir une lignine plus pure et moins digestible, en introduisant un nouveau traitement entre la préhydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 et l'hydrolyse principale par SO_4H_2 72 p. 100. Nous avons donc comparé, par rapport à la méthode directe, l'influence de la digestion pepsique (ELLIS,

TABLEAU I
Principaux traitements que comportent les méthodes de dosage de la lignine, utilisées dans les études sur la composition et la digestion des plantes fourragères

	Extractions préliminaires	Hydrolyses enzymatiques ou alcalines	Hydrolyses acides			Détermination de la teneur en azote
			préhydrolyse	hydrolyse principale	posthydrolyse	
1 ^o Méthodes ne comportant que des hydrolyses acides						
NORMAN et JENKINS (1933)	alcool-benzène-4 h					
COMMON (1946)	alcool-benzène-30 h					
GRAY, PILGRIM et WELLER (1958)	alcool-benzène-4 h					non
SALO (1957 a)	eau (1/2 h)-alcool-benzène (8 h) après la préhydrolyse					oui
NEHRING et LAUBE (1955)	éther (8 h)-alcool (8 h)					non
II ^o Méthodes comportant une digestion pepsique						
CRAMPTON et MAYNARD (1938)	éther	digestion pepsique 4 h	pas de préhydrolyse mais une imprégnation au formol	SO ₄ H ₂ 72 % précisée	acide acétique-chloroforme (environ 15 minutes)	non
LANCASTER (1943)	alcool-benzène-4 h	digestion pepsique 15 h				
ELLIS, MATRONE et MAYNARD (1946)	alcool-benzène-4 h	digestion pepsique — une nuit				non

TABLEAU I (suite)

	Extraction préliminaires	Hydrolyses enzymatiques ou alcalines	Hydrolyses acides			Détermination de la teneur en azote
			préhydrolyse	hydrolyse principale	posthydrolyse	
MOON et ABOU RAYA (1952)	alcool-benzène-6 h	digestion pepsique ; une nuit	pas de préhydrolyse mais des lavages	SO ₄ H ₂ 72 % ; 2 à 3 heures	pas de posthydrolyse	non
BRUNE et SIECK (1956)	éther eau	digestion pepsique ; une nuit		SO ₄ H ₂ 78 % ; 3 heures	SO ₄ H ₂ 9 %	non
SULLIVAN (1959)	alcool-benzène	digestion pepsique ; 20-24 heures	pas de préhydrolyse mais des lavages	SO ₄ H ₂ 72 % ; 3 heures	pas de posthydrolyse	non
FISCHER (1961 b)	alcool-benzène-24 h	digestion pepsique ; 24 heures	SO ₄ H ₂ 5 % ; 1 heure	SO ₄ H ₄ 73 % ; 2 heures	SO ₄ H ₂ 3 % ; 2 heures	non
III ^o Méthode comportant une digestion trypsique						
ARMITAGE, ASHWORTH et FERGUSON (1948)	alcool-benzène-2 h 1/2	digestion trypsique 18 heures après la préhydrolyse	HCl 5 % ; 1 heure	SO ₄ H ₂ 7 ₂ % ; 2 heures	SO ₄ H ₂ 4,6 % ; 2 heures	oui
IV ^o Méthodes comportant plusieurs traitements						
DAVIS et MILLER (1939)	éther-16 h eau à l'autoclave-1 h	1 ^o digestion pepsique 48 heures 2 ^o digestion par la clare-48 heures 3 ^o digestion pepsique ; 96 heures 1 ^o digestion pepsique une nuit 2 ^o CO ₂ Na ₂ -40 ^o ; une nuit	SO ₄ H ₂ 5 % ; 1 heure	SO ₄ H ₂ 72 % ; 1 heure	SO ₄ H ₂ 3 % ; 2 heures	non
THACKER (1954)	alcool-benzène (lavages)		SO ₄ H ₂ 5 % ; 1 heure	SO ₄ H ₂ 72 % ; 2 heures	SO ₄ H ₂ 3 % ; autoclave	non

MATRONE et MAYNARD, 1946), de la digestion trypsique (ARMITAGE, ASHWORTH et FERGUSON, 1948) et du traitement par CO_3Na_2 0,25 p. 100 (FORBES et HAMILTON, 1952 — THACKER, 1954).

Les résultats de cette première étude nous ont amenés à comparer différentes modalités de traitement au CO_3Na_2 (étude n° 2) et à étudier les variations de la teneur en azote des lignines obtenues par la voie directe (étude n° 3).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des échantillons.

Nous avons choisi des échantillons représentatifs des principaux types de fourrages verts et de foins, fauchés à différents stades de développement : nous avons cependant retenu un plus grand nombre d'échantillons de fourrages verts jeunes dans lesquels le dosage de la lignine présente le plus de difficultés et d'incertitudes. Les échantillons proviennent de 4 groupes de fourrages :

a) des ray-grass S24, des dactyles S37 et des trèfles blancs en provenance du Grassland Research Institute de Hurley : les plantes vertes y ont été immédiatement congelées après la fauche et leur digestibilité y a été déterminée, après décongélation, sur des moutons (cf. MINSON et *al.*, 1960) ;

b) des fourrages verts, dactyle (impur) et ray-grass, étudiés au C. N. R. Z. : ils ont été coupés chaque jour et distribués à 5 moutons pour mesurer leur digestibilité au cours de périodes expérimentales de 7 jours.

c) des foins de luzerne et un foin de trèfle violet récoltés au C. N. R. Z., dont la digestibilité a été mesurée sur 5 moutons pendant des périodes expérimentales de 10 jours ;

d) des foins de prairie à flore complexe (prairie permanente ou prairietemporaire âgée) récoltés dans les départements du Cantal, des Hautes-Alpes et de la Haute-Savoie, à une altitude comprise entre 1 000 et 1 200 mètres. Leur digestibilité a été mesurée au C. N. R. Z. sur 3 moutons pendant des périodes expérimentales de 10 jours.

Le tableau 2 donne les principales caractéristiques des 10 fourrages et 10 échantillons de fèces correspondantes utilisés dans la comparaison des différents traitements.

Préparation de la lignocellulose.

Nous avons préparé une quantité importante de lignocellulose de chacun de ces 20 échantillons : la lignocellulose est le résidu obtenu après un traitement aqueux, un dégraissage et une hydrolyse par SO_4H_2 , 5 p. 100 pendant 3 heures sous reflux (JARRIGE, 1961).

Deux prises d'environ 15 g de chaque échantillon ont été soumises à deux extractions aqueuses, de 60 et de 30 minutes respectivement dans des pots de centrifugeuse, au bain-marie à 40°. Les deux résidus, recueillis chacun sur un filtre, ont été séchés à l'étuve à 80°, pesés, puis dégraissés par le mélange alcool-benzène (2 : 1) au Soxhlet pendant 16 heures. Après évaporation du solvant et séchage à l'étuve à 80°, les deux résidus ont été pesés, mélangés et broyés.

Des prises de 4 g de ce résidu membranaire ont été hydrolysées par 800 cc de SO_4H_2 5 p. 100. pendant 3 heures ; l'hydrolyse a été conduite dans des Erlenmeyers à col rodé de 2 l sous reflux au bain de paraffine à 120°. Les hydrolysats ont été filtrés sur des Buchners garnis d'une rondelle tarée de papier-filtre sans cendres ; les résidus (lignocellulose) ont été lavés, séchés à l'acétone puis à l'étuve à 80°, pesés, séparés du papier-filtre, réunis et broyés à nouveau.

Dosage direct de la lignine.

Le dosage direct de la lignine a été effectué sur quatre prises de 400 mg de lignocellulose. Chaque prise a été hydrolysée dans un petit becher (30 cc) par 8 cc de SO_4H_2 72 p. 100 (P/P) pendant 4 heures, à la température ambiante ; on a pris soin d'écraser complètement les particules de lignocellulose au cours de l'hydrolyse.

L'hydrolysats a été transféré dans un Erlenmeyer à col rodé de 500 cc avec de l'eau distillée, à raison de 23 cc d'eau par cc de SO_4H_2 72 p. 100, de façon à amener la concentration à 3 p. 100. Il a été maintenu à l'ébullition sous reflux pendant 3 heures au bain de paraffine à 120° et filtré sur un Buchner garni d'une rondelle tarée de papier-filtre sans cendres. Le résidu sur le filtre a été lavé, séché à l'acétone, déshydraté à l'étuve à 80° et pesé.

TABLEAU 2
Nature et caractéristiques des échantillons étudiés dans la comparaison entre les traitements

Échantillons		Coefficient de digestibilité de la Matière Sèche	Composition de la matière sèche										
Nature	Caractéristiques		Fourrage					Fécès					
			Matières Azotées	Extrait Aqueux	Extrait Alcool Benzène	Extrait SO ₄ H ₂ 5 %	Matières Azotées	Extrait Aqueux	Extrait Alcool Benzène	Extrait SO ₄ H ₂ 5 %			
1	Ray-grass anglais S24	Repousse d'un mois (août 1958)	23,3	26,6	7,7	35,8	21,8	11,7	14,4	40,2			
2	Ray-grass anglais Pri-mevère	1 ^{er} cycle à l'épiaison (mai 1960)	42,6	37,8	4,8	29,1	16,8	13,9	8,2	38,8			
3	Dactyle S37	Repousse d'un mois (octobre 1958)	26,1	24,3	7,1	37,4	17,4	7,7	14,2	40,5			
4	Dactyle (impur)	1 ^{er} cycle (fin avril)	45,6	41,0	7,0	26,3	15,6	11,3	12,3	39,3			
5	Trèfle blanc S100	Repousse d'un mois (août 1958)	29,9	32,3	7,4	32,5	23,3	9,9	14,9	42,6			
6	Trèfle blanc S100	Repousse d'un mois (sept. 1958)	29,4	33,1	7,1	35,3	23,5	12,9	14,5	41,8			
7	Foin de trèfle violet	1 ^{re} coupe 1959	60,0	29,3	2,8	30,0	11,0	41,6	6,7	39,4			
8	Foin de luzerne	1 ^{re} coupe 1959	16,3	35,0	4,3	27,9	11,6	9,4	6,4	39,7			
9	Foin de luzerne	1 ^{re} coupe 1959	14,5	31,9	4,9	29,5	10,5	9,9	4,8	37,5			
10	Foin de pré	1 ^{re} coupe 1960	42,6	18,4	4,1	36,1	8,6	6,8	5,5	38,2			

Deux des quatre résidus ainsi obtenus pour chaque échantillon ont été incinérés au four à 600° pendant 2 heures : la perte de poids correspond à la lignine brute. Les deux autres ont été transférés dans des matras de 50 cc pour déterminer leur teneur en azote par micro-kjeldahl (1).

Dosage de la lignine après traitement pepsique.

Quatre prises de 400 mg de lignocellulose ont été soumises à une hydrolyse pepsique, dans les conditions définies par ELLIS, MATRONE et MAYNARD (1946).

L'hydrolyse a été réalisée par 100 cc d'une solution à 0,1 p. 100 de pepsine Difco en milieu chlorhydrique 0,1 n, au bain-marie à 40°, pendant 16 heures. Le résidu recueilli sur papier-filtre d'un Buchner a été lavé, séché à l'acétone, puis à l'étuve à 80° pendant une nuit. Il a alors été séparé du filtre, transféré dans un becher de 30 cc taré et remis à l'étuve à 80° jusqu'à poids constant.

Les quatre résidus ont été traités comme les quatre prises de lignocellulose dans le dosage direct de la lignine.

Dosage de la lignine après traitement trypsique.

Quatre prises de 400 mg de lignocellulose ont été soumises à l'hydrolyse trypsique dans les conditions définies par ARMITAGE, ASWORTH et FERGUSON (1948).

L'hydrolyse a été réalisée par 200 cc d'une solution à 0,1 p. 100 de trypsine Difco 1/250 en milieu CO_3Na_2 à 0,5 p. 100, pendant 18 heures, au bain-marie à 38°. Le résidu recueilli sur le filtre d'un Buchner a été lavé successivement à l'alcool, à l'éther et à l'acétone, puis séché à l'étuve à 80° pendant une nuit. Comme le résidu du traitement pepsique, il a été séparé du filtre, transféré dans un Erlenmeyer de 30 cc et remis à l'étuve à 80° jusqu'à poids constant.

Les quatre résidus ont été ensuite traités comme les quatre prises de lignocellulose dans le dosage direct de la lignine.

Dosage de la lignine après traitement au CO_3Na_2 .

Quatre prises de 400 mg de lignocellulose ont été traitées par 200 cc de CO_3Na_2 à 0,25 p. 100, pendant 18 heures au bain-marie à 38°. Elles ont été traitées exactement comme les prises soumises à l'hydrolyse trypsique, à la seule différence qu'on n'a pas mis de trypsine.

Dosage de l'azote.

Pour chacun des traitements de chacun des échantillons, nous avons obtenu quatre résidus représentant la lignine brute non déminéralisée, dont deux ont été utilisés pour mesurer la teneur en cendres, et deux la teneur en matières azotées (Kjeldahl). Les teneurs moyennes ont été appliquées aux quatre résidus pour obtenir :

— la lignine brute = résidu — cendres,

— la lignine corrigée = lignine brute — azote \times 6,25.

Nous avons multiplié la teneur en azote par le facteur conventionnel 6,25 (PALOHEIMO, 1925). Il semble bien en effet, que la majeure partie de l'azote de la lignine brute appartienne à des protéines résiduelles (THOMAS et ARMSTRONG, 1949 — DE MAN et DE HEUS, 1950) plutôt qu'à des produits de condensation partiellement desaminés (NORMAN et JENKINS, 1934) ou à la molécule de lignine elle-même (BONDI et MEYER, 1948 — MEYER et BONDI, 1952). Il est possible cependant que les matières azotées de la lignine brute contiennent moins de 16 p. 100 d'azote et que le facteur de correction à adopté soit donc supérieur à 6,25 (TILLEY 1959; communication personnelle).

RÉSULTATS

I. COMPARAISON DES TROIS TRAITEMENTS

Quantité de matière sèche extraite.

Le traitement pepsique n'a extrait qu'une faible proportion de la lignocellulose (non déminéralisée), aussi bien dans les fourrages que dans les fèces (tab. 3), en moyenne 4,6 p. 100 et 3,4 p. 100 respectivement.

(1) La quantité de lignocellulose préparée pour certains échantillons de fourrages jeunes a été insuffisante pour permettre toutes les comparaisons projetées (échantillons 1, 4, 6).

TABLEAU 3

Quantité de matière sèche extraite par les traitements (en % de la lignocellulose)

	Échantillons	Fourrage			Fèces		
		Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂
1	Ray-grass anglais		9,0	12,7		14,8	16,5
2	Ray-grass anglais	1,8	9,6	9,6	2,0	13,1	14,8
3	Dactyle	5,8	13,4	14,3	5,1	20,6	22,5
4	Dactyle	5,0	18,3	4,5	4,9	20,2	4,9
5	Trèfle blanc	7,5	33,1	32,6	3,7	18,6	20,7
6	Trèfle blanc		29,9	26,3		13,1	13,4
7	Foin de trèfle	3,0	11,1	10,9	3,1	9,8	9,1
8	Foin de luzerne	5,4	10,5	10,9	3,2	3,2	4,2
9	Foin de luzerne	4,8	9,6	9,6	3,7	5,3	5,4
10	Foin de pré	6,2	10,4	11,0	3,9	11,0	12,8

Les traitements à la trypsine et au carbonate ont été beaucoup plus efficaces : en moyenne ils ont solubilisé respectivement 15,5 et 14,2 p. 100 de la lignocellulose des fourrages, 13,0 et 12,4 p. 100 de celle des fèces. Ils ont été particulièrement actifs sur la lignocellulose des deux échantillons de trèfle blanc dont ils ont extrait environ 30 p. 100.

Lignine brute et lignine corrigée.

Par rapport aux valeurs obtenues directement, les teneurs en lignine brute ont été diminuées de façon hautement significative ($P < 0,01$) par les trois traitements étudiées aussi bien dans les fourrages que dans les fèces.

TABLEAU 4

Teneurs en lignine brute

	Échantillons	Fourrage			Fèces				
		Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂	Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂
1	Ray-grass anglais	5,16		3,15	3,33	17,84		13,87	13,82
2	Ray-grass anglais	4,61	4,54	3,84	3,99	13,10	12,27	11,38	11,50
3	Dactyle	4,09	3,60	3,23	3,34	12,51	12,33	10,61	10,84
4	Dactyle	7,31	6,68	4,26	6,70	16,24	15,60	12,55	15,47
5	Trèfle blanc	5,30	4,94	3,08	3,11	20,08	19,60	16,33	15,08
6	Trèfle blanc	5,90	5,86	3,55	3,81	18,24	16,02	14,74	14,50
7	Foin de trèfle	8,18	8,24	7,38	7,09	18,59	17,50	15,67	16,75
8	Foin de luzerne ..	9,27	9,22	8,43	8,47	18,28	17,37	16,95	16,79
9	Foin de luzerne ..	9,80	9,29	8,98	8,77	18,78	17,84	17,19	16,54
10	Foin de pré	9,29	8,82	7,95	8,00	17,63	16,31	14,97	14,43

La diminution a été relativement faible et constante, sous l'action de la digestion pepsique : en moyenne 4,4 p. 100 dans les fourrages et 5,3 p. 100 dans les fèces. Elle a été beaucoup plus accentuée et plus variable sous l'action de la digestion

trypsique, plus élevée pour les échantillons de fourrages jeunes (jusqu'à 40 p. 100) que pour les foins, pour les fourrages que pour les fèces correspondantes. Le traitement au carbonate a entraîné une diminution du même ordre que la digestion trypsique dans les fèces (13,8 p. 100 au lieu de 15,1 p. 100) mais sensiblement plus faible dans les fourrages (18,2 p. 100 au lieu de 22,6 p. 100).

De même que les lignines brutes, les lignines corrigées obtenues après chacun des traitements (tab 5) ont été significativement plus faibles que celles obtenues directement ($P < 0,01$ sauf pour le traitement pepsique dans les fourrages où $P < 0,05$) : en moyenne de 4,7 p. 100, 16,2 p. 100 et 15,7 p. 100 dans les fourrages, respectivement pour les traitements à la pepsine, à la trypsine et au carbonate et de 4,5 p. 100, 12,3 p. 100 et 12,8 p. 100 dans les fèces.

TABLEAU 5
Teneurs en lignine corrigée (Lignine brute — N × 6,25)

Échantillons	Fourrage				Fèces			
	Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂	Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂
2 Ray-grass anglais	3,40	3,40	2,93	2,89	10,27	9,64	9,12	9,16
3 Dactyle	2,37	1,93	1,72	1,90	8,92	8,99	7,85	7,95
4 Dactyle		4,25	3,08		12,01	11,54	9,53	
5 Trèfle blanc	4,24	3,90	2,66	2,66	14,21	14,00	11,83	11,02
6 Trèfle blanc			2,65	2,57			10,30	10,35
7 Foin de trèfle	6,98	7,11	6,53	6,26	16,49	15,52	13,85	14,92
8 Foin de luzerne ..	7,70	7,73	7,16	7,29	15,93	15,12	14,88	14,73
9 Foin de luzerne ..	8,38	7,98	7,94	7,73	16,82	15,90	15,40	15,04
10 Foin de pré	8,20	7,88	6,86	7,04	15,72	14,49	13,37	12,92

Les valeurs de la lignine brute obtenues après traitement à la trypsine ou au carbonate n'ont pas présenté de différences significatives entre elles, mais ont été significativement plus faibles que celles obtenues après digestion pepsique; il en a été de même pour les valeurs de la lignine corrigée.

Matières azotées.

Aussi bien dans les fourrages que dans les fèces, la teneur en matières azotées de la lignine brute n'a pas été modifiée par la digestion pepsique et n'a été diminuée que de façon très limitée par les deux autres traitements (tab 6) : en moyenne de 9,6 et 10,4 p. 100 dans les fourrages, de 4,2 et de 6,0 p. 100 dans les fèces, respectivement pour les traitements à la trypsine et au carbonate. Les valeurs ainsi obtenues dans les fèces ont cependant été significativement plus faibles ($P < 0,01$) que celles obtenues directement ou après digestion pepsique.

L'action des traitements apparaît beaucoup plus nettement lorsqu'on exprime les matières azotées de la lignine non plus en pourcentage de la lignine brute mais en pourcentage de la matière sèche initiale (= teneur en lignine brute × teneur en matières azotées de cette lignine brute = lignine brute — lignine corrigée). En moyenne, cette quantité de matières azotées résiduelles recouvrées dans la lignine brute a été diminuée de 6,2 p. 100, 24,6 p. 100 et 25,3 p. 100 dans les fourrages et

de 5,7 p. 100, 17,1 p. 100 et 19,3 p. 100 dans les fèces respectivement par les traitements à la pepsine, à la trypsine et au carbonate. Comme précédemment, la trypsine et le carbonate ont donc été plus efficaces que la pepsine.

TABLEAU 6
Teneur en matières azotées (N × 6,25) de la lignine brute

	Échantillons	Fourrage				Fèces			
		Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂	Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂
2	Ray-grass anglais	26,2	25,2	23,7	27,7	21,6	21,4	19,9	20,3
3	Dactyle	42,1	46,1	46,8	42,9	28,7	27,1	26,0	26,7
4	Dactyle		36,3	27,8		26,1	26,1	24,1	
5	Trèfle blanc	20,1	21,0	13,9	14,5	29,4	28,2	27,6	26,9
6	Trèfle blanc			25,3	32,6			30,1	28,6
7	Foin de trèfle	14,7	13,7	11,5	11,7	11,3	11,3	11,6	10,9
8	Foin de luzerne	17,0	16,1	14,9	14,1	12,9	12,9	12,2	12,2
9	Foin de luzerne	14,5	14,1	11,6	11,9	10,4	10,9	10,4	9,6
10	Foin de pré	11,7	10,7	13,6	12,1	10,9	11,1	10,6	10,5

Indépendamment des traitements, la teneur en matières azotées de la lignine brute a présenté des différences importantes entre échantillons. Elle a varié approximativement de 10 à 45 p. 100 dans les fourrages et de 10 à 30 p. 100 dans les fèces et elle a été plus élevée pour les fourrages verts que pour les foins.

Coefficient de digestibilité de la lignine.

Le coefficient de digestibilité de la lignine brute obtenue sans traitement a été toujours supérieur à 0 et présenté une valeur relativement élevée (30 à 40 p. 100) dans les deux échantillons de dactyle et l'un des échantillons de trèfle blanc ; c'est justement parce qu'on avait préalablement constaté ces valeurs qu'on avait retenu ces trois échantillons pour la présente étude.

TABLEAU 7
Digestibilité chez le mouton de la lignine brute et de la lignine corrigée

	Échantillons	Lignine brute				Lignine corrigée			
		Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂	Pas de traitement	Pepsine	Trypsine	CO ₃ Na ₂
1	Ray-grass anglais	19,0		— 2,9	+ 2,9				
2	Ray-grass anglais	21,3	25,2	18,0	19,7	16,4	21,6	13,9	12,2
3	Dactyle	39,4	32,2	35,1	35,9	25,5	7,8	9,7	17,2
4	Dactyle	30,7	27,3	8,0	28,0		15,5	3,6	
5	Trèfle blanc	1,2	— 5,5	— 41,5	— 29,5	10,6	4,2	— 18,8	— 10,5
6	Trèfle blanc	28,9		— 2,1	6,3			4,3	0,9
7	Foin de trèfle	9,2	15,2	15,2	5,6	5,6	12,8	15,2	4,8
8	Foin de luzerne	14,1	18,0	12,4	13,6	9,8	14,6	9,3	11,9
9	Foin de luzerne	19,9	19,9	20,4	20,8	16,6	17,0	19,1	18,9
10	Foin de pré	11,3	13,6	12,2	15,9	10,3	14,0	8,8	14,1

Les traitements n'ont pas eu d'influence nette, commune à tous les échantillons. Ils n'ont pas diminué le coefficient de digestibilité de la lignine brute ou corrigée des quatre foins étudiés ; au contraire, le traitement pepsique l'a augmenté de façon limitée mais systématique. Par contre, dans les fourrages verts, le traitement trypsique a permis d'isoler une lignine brute ou corrigée, ayant une digestibilité plus faible que celle obtenue directement, et même fortement négative dans le cas d'un des échantillons de trèfle blanc. Les traitements à la pepsine et au carbonate ont eu une action dans le même sens mais moins accentuée.

En revanche pour chacune des méthodes, la lignine corrigée a eu en moyenne un coefficient de digestibilité plus faible que la lignine brute ; les différences ont été significatives ($P < 0,01$) dans le cas des traitements au carbonate, et à la pepsine et ont approché le seuil de signification dans le cas des deux autres méthodes. Cette diminution tient au fait que dans la grande majorité des cas les matières azotées de la lignine brute ont été plus digestibles que la lignine corrigée. Cependant celles de la lignine du trèfle blanc n° 5 ont eu un coefficient de digestibilité fortement négatif puisqu'elles présentaient une concentration plus élevée dans la lignine des fèces que dans celle du fourrage ; c'est pourquoi le coefficient de digestibilité a présenté des valeurs anormalement négatives pour la lignine brute après traitement à la trypsine ou au carbonate et des valeurs plus proches de zéro pour la lignine corrigée.

II. ÉTUDE DES TRAITEMENTS AU CO_3Na_2

Il est apparu dans l'étude précédente que le traitement par une solution de CO_3Na_2 à 0,25 p. 100 pendant 18 heures à 38° était, dans la plupart des cas, aussi efficace que la digestion par la même solution additionnée de trypsine. FORBES et HAMILTON (1952) avaient d'ailleurs déjà noté qu'il était intéressant d'effectuer un tel traitement (une nuit) après la digestion pepsique dans la méthode d'ELLIS et *al.* (1946), et THACKER (1954) l'avait inclus dans la méthode de dosage qu'il a proposée (tab 1).

Nous avons donc cherché à préciser l'influence de certaines modalités (concentration — température — durée) du traitement au carbonate sur les teneurs en lignine brute et en lignine corrigée. Nous avons comparé sur cinq échantillons de fourrages et un de fèces, les quatre modalités suivantes :

CO_3Na_2 , 0,10 p. 100, pendant 18 h au bain-marie à 38°.

CO_3Na_2 , 0,25 p. 100, pendant 18 h au bain-marie à 38°.

CO_3Na_2 , 0,10 p. 100, pendant 1 h à l'ébullition sous reflux.

CO_3Na_2 , 0,25 p. 100, pendant 1 h à l'ébullition sous reflux.

Trois prises de 400 mg de lignocellulose ont été soumises à chacun des traitements ; les résidus recueillis sur le filtre d'un Buchner ont été traités comme précédemment (cf. méthodes). Cependant, l'azote de la lignine a été estimé par différence, en soustrayant de l'azote de la lignocellulose, l'azote de l'extrait au CO_3Na_2 et de l'hydrolysate sulfurique. Les résultats sont résumés dans la figure 1.

La proportion de la lignocellulose qui a été extraite a dépendu beaucoup plus de la température que de la concentration ; dans le cas des 5 échantillons de fourrages elle a été en moyenne de 14,6 p. 100, 16,0 p. 100, 23,4 p. 100 et 26,3 p. 100 respectivement pour les traitements 0,10 p. 100 et 0,25 p. 100 à 38°, 0,10 p. 100 et 0,25 p. 100 à l'ébullition.

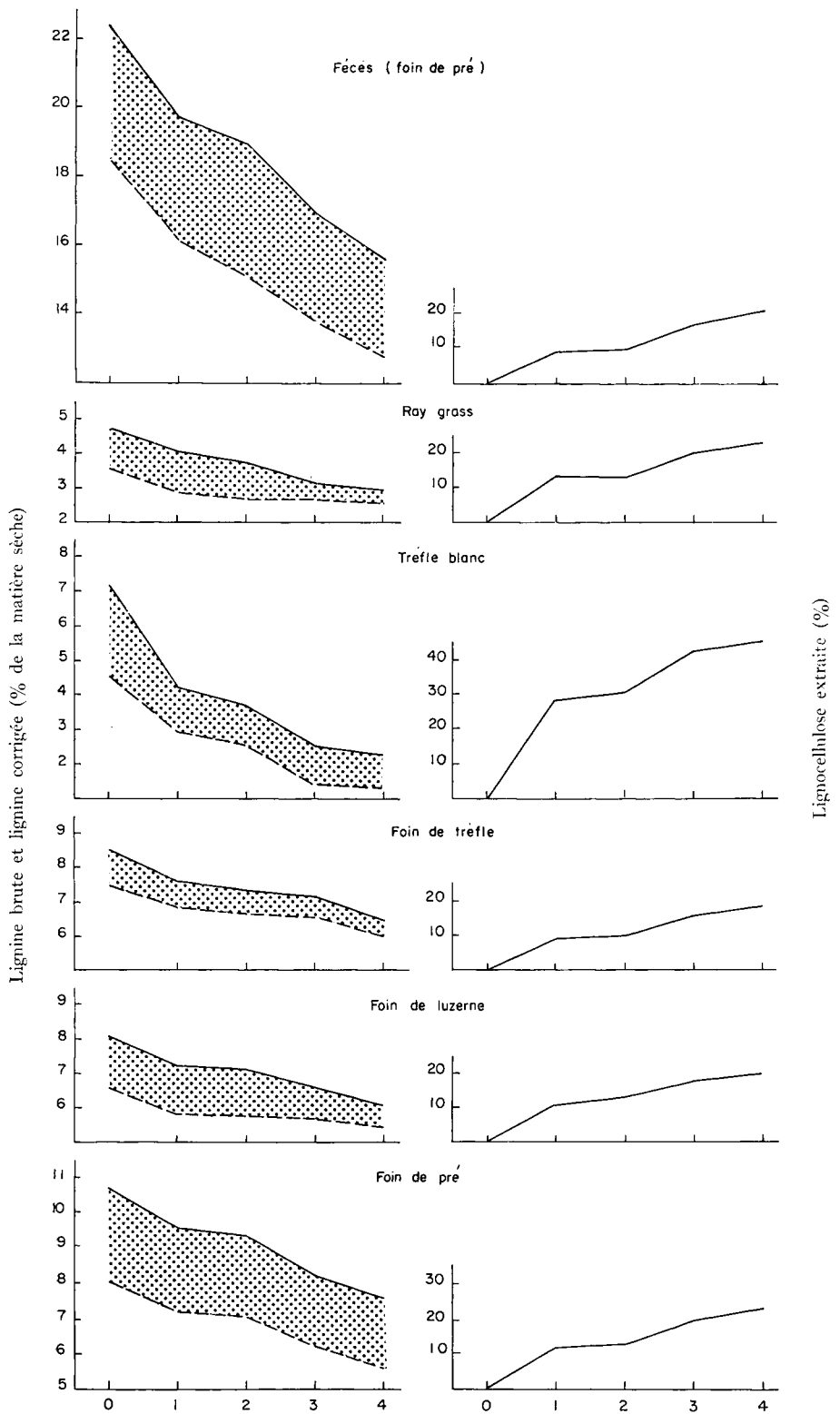


FIG. 1. — Influence des traitements au $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ sur la lignine brute et la lignine corrigée et sur la lignocellulose (pourcentage extrait par le traitement.)

o pas de traitement	3 $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ 0,10 p. 100 à 100°
1 $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ 0,10 p. 100 à 38°	4 $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ 0,15 p. 100 à 100°
2 $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ 0,25 p. 100 à 38°	

lignine brute
 lignine corrigée

Il en a été de même pour les teneurs en lignine brute et en lignine corrigée : par rapport aux valeurs obtenues directement, elles ont été diminuées en moyenne, (toujours pour les 5 échantillons de fourrages,) respectivement par les 4 traitements de 16,4 p. 100, 21,8 p. 100, 31,4 p. 100 et 32,2 p. 100 pour la lignine brute et de 16,8 p. 100, 21,2 p. 100, 28,7 p. 100 et 33,7 p. 100 pour la lignine corrigée.

La teneur en matières azotées de la lignine brute n'a pratiquement pas été modifiée par les différents traitements dans le cas du foin de pré et des fèces correspondantes ; elle a été diminuée dans les autres échantillons, de façon limitée à 38° mais plus importante à l'ébullition (de l'ordre d'un tiers). Comme dans l'étude précédente, la quantité de matières azotées de la lignine, exprimée en pourcentage de matière sèche initiale, a été réduite dans des proportions plus importantes mais également variables avec les échantillons : par exemple de 26 à 65 p. 100 par la solution 0,25 p. 100 à l'ébullition.

Les traitements par des solutions très diluées de CO_3Na_2 ont donc permis surtout à l'ébullition, de solubiliser une fraction appréciable de la lignocellulose et de réduire la lignine brute, la lignine corrigée et la quantité de matières azotées passant dans la lignine dans tous les échantillons étudiés, mais de façon plus importante dans celui de trèfle blanc (fig. 1). Pour savoir si ces traitements présentent de l'intérêt et lequel est le plus intéressant, il faudrait les comparer sur un plus grand nombre d'échantillons en fonction du but dans lequel on dose la lignine (cf. discussion). Il faut noter qu'ils n'ont pas réduit le coefficient de digestibilité de la lignine du foin de pré qui a présenté les valeurs suivantes :

	<i>lignine brute</i>	<i>lignine corrigée</i>
pas de traitement	7,7	— 1,8
0,10 p. 100 — 38°	9,0	— 0,2
0,25 p. 100 — 38°	10,6	5,0
0,10 p. 100 — ébullition	9,1	1,3
0,25 p. 100 — ébullition	9,0	— 1,4

III. VARIATIONS DES MATIÈRES AZOTÉES DE LA LIGNINE BRUTE

Dans les études précédentes la teneur en matières azotées de la lignine brute a présenté, indépendamment du traitement, des variations très importantes d'un échantillon à l'autre et semblé dépendre de la teneur en matières azotées de l'échantillon. Il était donc intéressant de voir si on pouvait établir des relations quantitatives satisfaisantes entre les matières azotées de la lignine brute et la teneur en matières azotées de l'échantillon ; cela devait permettre en outre de comparer sur un plus grand nombre d'échantillons le coefficient de digestibilité de la lignine corrigée à celui de la lignine brute.

La teneur en azote de la lignine brute préparée par la méthode directe a été déterminée pour 19 nouveaux échantillons de fourrages et pour les 19 échantillons moyens de fèces correspondants : 6 ray-grass anglais S24 et 6 dactyles S37 en provenance du Grassland Research Institute et 7 foins de prairies situées en altitude. Elle a été également déterminée pour 4 échantillons de feuilles et 4 échantillons de tiges de luzerne flamande prélevés à différents stades de développement. Compte tenu des résultats obtenus par la méthode directe dans la première étude, on a disposé

d'un ensemble de 34 échantillons de fourrages et de 26 échantillons de fèces dont la teneur en matières azotées variait respectivement de 7,1 à 36,2 p. 100 et de 8,6 à 23,3 p. 100.

Relations entre l'azote de la lignine et la teneur en azote de l'échantillon.

Les matières azotées ($6,25 \times N$) de la lignine brute peuvent être exprimées en pourcentage, soit de la lignine brute (y_1), soit de l'échantillon initial ($y_2 =$ teneur en lignine brute \times teneur en matières azotées de la lignine brute = teneur en lignine brute — teneur en lignine corrigée) soit des matières azotées de l'échantillon initial (y_3). En fonction de la teneur en matières azotées (x) de l'échantillon initial, nous avons reporté y_1 et y_3 dans la figure 2 et calculé les coefficients de corrélation et de régression (tab. 8) séparément pour les 7 ray-grass, les 7 dactyles, les 11 foins et l'ensemble des 25 échantillons.

TABLEAU 8

Relations entre les matières azotées de la lignine brute (exprimées de différentes façons) et la teneur en matières azotées x du fourrage ou des fèces

	Nombre	Fourrage		Fèces
Matières azotées % de la lignine brute				
Ray-grass anglais	7	$r = 0,97$ (1)	$y_1 = 1,91 x - 0,77$	$r = 0,82$ (1) $y_1 = 1,64 x - 8,39$
Dactyle	7	$r = 0,94$ (1)	$y_1 = 1,39 x + 3,15$	$r = 0,52$
Foins	11	$r = 0,43$		$r = 0,75$ (1) $y_1 = 1,21 x + 0,25$
Ensemble	25	$r = 0,89$ (1)	$y_1 = 1,67 x - 1,70$	$r = 0,30$
Matières azotées % de la matière sèche initiale				
Ray-grass anglais	7	$r = 0,91$ (1)	$y_2 = 0,054 x + 0,53$	$r = 0,80$ (1) $y_2 = 0,268 x - 1,59$
Dactyle	7	$r = 0,61$ (1)	$y_2 = 0,053 x + 0,83$	$r = 0,87$ (1) $y_2 = 0,326 x - 1,87$
Foins	11	$r = 0,36$		$r = 0,81$ (1) $y_3 = 0,244 x - 0,27$
Ensemble	25	$r = 0,77$ (1)	$y_2 = 0,057 x + 0,65$	$r = 0,80$ (1) $y_3 = 0,197 x + 0,12$
Matières azotées % des matières azotées initiales				
Ray-grass anglais	7	$r = 0,83$ (1)	$y_3 = 0,347 x + 14,70$	$r = 0,59$
Dactyle	7	$r = 0,63$ (1)	$y_3 = 0,265 x + 15,09$	$r = 0,60$
Foins	11	$r = 0,81$ (1)	$y_3 = 0,83 x + 21,40$	$r = 0,11$
Ensemble	25	$r = 0,68$ (1)	$y_3 = 0,318 x + 15,27$	$r = 0,08$

(1) Valeurs significatives.

Quand la teneur en matières azotées du fourrage a augmenté, on a constaté pour chacune de ces catégories que :

— la teneur en matières azotées de la lignine brute (y_1) a augmenté rapidement ;

— la différence lignine brute — lignine corrigée (y_2) a augmenté également, mais de façon beaucoup plus lente ;

— la proportion des matières azotées du fourrage qui est passée dans la lignine (y_3) a diminué suivant une loi qui serait d'ailleurs plutôt curvilinéaire que linéaire.

La liaison a été hautement significative pour les trois variables y_1 , y_2 et y_3 dans le cas des ray-grass et des dactyles ; dans le cas des foins, par contre, elle n'a été significative que pour la proportion des matières azotées passant dans la lignine (y_3).

A richesse en azote égale du fourrage, la teneur en azote de la lignine brute a varié avec la nature du fourrage. Elle a d'abord été plus élevée pour les graminées que pour les légumineuses (feuilles et tiges de luzerne, trèfle blanc) parce qu'une proportion sensiblement plus élevée de l'azote du fourrage était recouverte dans la lignine. Elle a été également plus élevée pour le ray-grass que pour le dactyle mais pour une raison différente, parce que la teneur en lignine corrigée du ray-grass était plus faible que celle du dactyle.

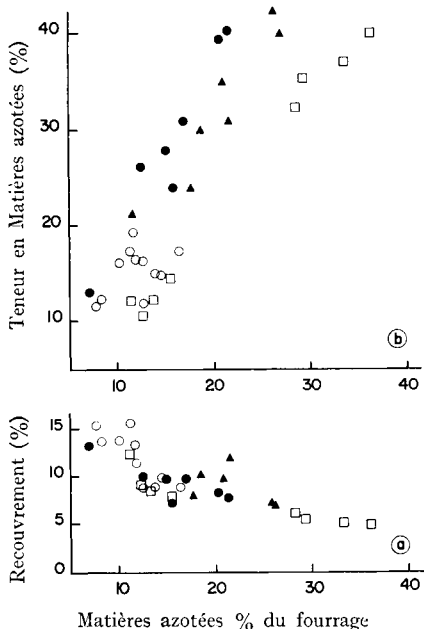


FIG. 2. — Influence de la teneur en matières azotées du fourrage sur la proportion de celles-ci qui est recouverte dans la lignine brute (a) et sur la teneur en matières azotées de la lignine brute (b).

● Ray-grass □ Feuilles et tiges de luzerne
▲ Dactyle ○ Foins

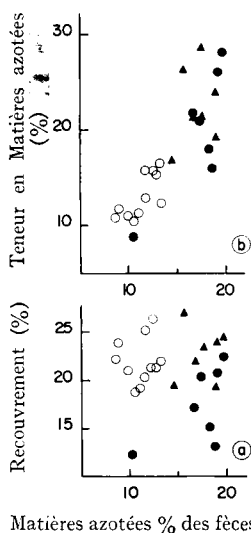


FIG. 3. — Influence de la teneur en matières azotées des fèces sur la proportion de celles-ci qui est recouverte dans la lignine brute (a) et sur la teneur en matières azotées de la lignine brute (b).

● Ray grass ▲ Dactyle
○ Foins

Quand la teneur en azote des fèces a augmenté (tab 8) :

— la teneur en matières azotées de la lignine brute (γ_1) a augmenté (fig. 3b) mais de façon moins obligatoire que pour les fourrages (fig. 2b) ;

— la différence lignine brute — lignine corrigée (γ_2) a augmenté de façon significative dans les différentes catégories d'échantillons et 4 à 6 fois plus rapide que dans les fourrages correspondants ;

— la proportion des matières azotées des fèces qui est passée dans la lignine brute a eu plutôt tendance à augmenter (corrélation non significative) (fig. 3a) contrairement à ce qui se produisait dans les fourrages correspondants (fig. 2a) ; elle a été également, en gros, deux fois plus élevée que dans les fourrages.

Estimation de la lignine corrigée du fourrage.

En soustrayant de la lignine brute, les matières azotées calculées à partir de la teneur en matières azotées du fourrage par les relations précédentes (tab 8), on obtient une estimation de la lignine corrigée. Nous avons comparé les valeurs ainsi obtenues aux valeurs effectivement déterminées. Les différences ont été exprimées en pourcentage de la lignine corrigée ; en voici la moyenne :

<i>Relation utilisée</i>	<i>Ray-grass</i>	<i>Dactyle</i>	<i>Foins</i>	<i>Ensemble</i>
Matières azotées % de la lignine (y1).....	2,26	3,23		4,83
Matières azotées % des matières azotées initiales (y3).....	3,70	7,38	1,47	4,72

La relation donnant la teneur en matières azotées de la lignine (y1) permet donc d'estimer la lignine corrigée du ray-grass et du dactyle avec une erreur relativement faible. La relation exprimant la proportion des matières azotées du fourrage passant dans la lignine brute (y3) entraîne une erreur plus élevée dans le cas du ray-grass et du dactyle mais très faible dans celui des foins.

Connaissant la teneur en azote du fourrage, il apparaît donc possible d'estimer de façon satisfaisante la lignine corrigée à partir de la lignine brute, à l'aide de relations établies pour chaque type de fourrages.

Digestibilité comparée de la lignine brute et de la lignine corrigée.

Dans 24 des 25 fourrages étudiés, les matières azotées de la lignine brute ont été plus digestibles que la lignine corrigée ; par suite celle-ci a été moins digestible que la lignine brute (tab 9), la différence s'accroissant en même temps que la proportion et la digestibilité des matières azotées de la lignine brute (fig. 4).

TABLEAU 9

Coefficient de digestibilité apparent de la lignine brute, de la lignine corrigée et des matières azotées de la lignine

	Nombre	Lignine brute		Lignine corrigée		Matières azotées de la lignine	
		Limites	Moyenne	Limites	Moyenne	Limites	Moyenne
Ray-grass anglais.....	7	9,9 à 32,0	17,6	— 10,0 à 19,5	6,5	35,0 à 60,1	42,8
Dactyle	7	1,4 à 39,4	15,9	— 20,0 à 25,5	4,7	28,5 à 54,5	35,6
Foins	11	5,5 à 19,9	10,9	4,0 à 16,7	8,9	5,8 à 42,5	21,5

Cette différence a été faible dans les foins (2 points en moyenne) parce que leur lignine brute ne contenait qu'un faible pourcentage de matières azotées, elles-mêmes à peine plus digestibles que la lignine corrigée. Au contraire, dans les fourrages riches en matières azotées, la lignine brute a été nettement plus digestible que la lignine corrigée parce qu'elle avait une teneur élevée en matières azotées, ayant elles-mêmes une digestibilité plus élevée (de 28 à 60 p. 100) : de près de 15 points en moyenne pour les 8 échantillons de ray-grass et de dactyle présentant une teneur en matière azotées supérieures à 16 p. 100 dans leur matière sèche et à 30 p. 100 dans leur lignine (fig. 4). La lignine corrigée a eu par suite un coefficient de digestibilité négatif dans cinq d'entre eux.

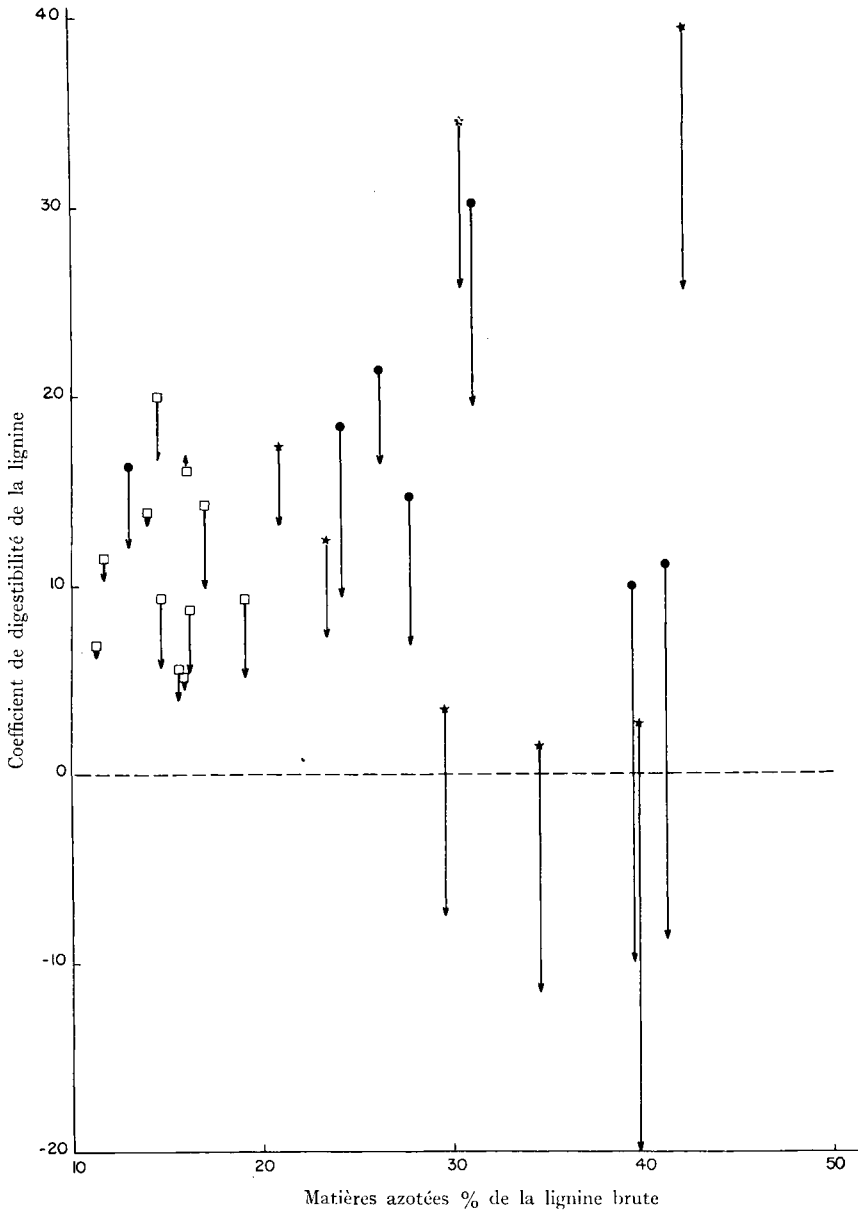


FIG. 4. — Influence de la teneur en matières azotées de la lignine brute sur le coefficient de digestibilité de la lignine brute et de la lignine corrigée

● Ray grass * Dactyle □ Foins

DISCUSSION

Toute méthode de dosage de la lignine mise au point en vue d'étudier la composition et la valeur alimentaire des plantes fourragères devrait être examinée suivant trois catégories de critères :

a) des critères biochimiques : elle devrait isoler la lignine vraie du fourrage, sans que celle-ci ait subi de pertes au cours des traitements, et réciproquement, sans qu'elle soit « contaminée » par des substances interférentes ;

b) des critères nutritionnels : selon le but poursuivi, elle devrait isoler une lignine permettant d'estimer au mieux la digestibilité du fourrage ou ayant la digestibilité la plus faible et la plus constante possible dans les différents fourrages ;

c) des critères analytiques : elle devrait être la plus simple et la plus standardisée possible et donner des résultats reproductibles d'un laboratoire à l'autre, et d'un jour à l'autre dans le même laboratoire.

De plus, cet examen devrait porter sur un nombre d'échantillons suffisamment important et représentatif, pour que ses conclusions puissent être généralisées sans risques. Tous ces critères peuvent d'ailleurs ne pas être entièrement compatibles, dans certains fourrages tout au moins ; ils doivent alors être classés de façon différente suivant les objectifs poursuivis : ainsi les critères biochimiques sont prépondérants dans les études sur la composition alors que les critères nutritionnels le deviennent dans les études sur l'utilisation digestive des fourrages.

Les principales méthodes proposées (NORMAN et JENKINS, 1934 — ELLIS, MATRONE et MAYNARD, 1946 — ARMITAGE, ASHWORTH et FERGUSON, 1948...) ne semblent pas avoir été envisagées simultanément sous ces différents angles et ont été mises au point sur un nombre très insuffisant d'échantillons. C'est ce qui explique que de nombreux utilisateurs aient été amenés à modifier les méthodes initiales, en fonction des buts recherchés ou des échantillons étudiés.

Nous allons discuter nos résultats selon ces différents aspects biochimiques, nutritionnels et analytiques, dans le but d'en tirer quelques conclusions générales sur le dosage de la lignine.

Critères biochimiques.

1° Les lignines brutes obtenues par notre méthode directe ont contenu une proportion de matières azotées extrêmement variable : de 11 à 42 p. 100 dans les fourrages. Cela ne semble pas être exclusivement le fait de notre méthode puisque avec la méthode d'ELLIS *et al.*, d'autres auteurs ont observé des variations importantes et des valeurs élevées, supérieures à 25-30 p. 100, dans certains fourrages jeunes, tels que le dactyle (ELY *et al.*, 1953) et le trèfle violet (KIVIMAE, 1959). Certains avaient déjà noté que cette teneur en matières azotées de la lignine diminuait au cours de la croissance de la plante (THOMAS et ARMSTRONG, 1949 — ELY *et al.*, 1953 — SALO, 1957 a-1957 b) et KIVIMAE (1959) avait montré qu'elle présentait une liaison étroite avec la teneur en matières azotées du fourrage dans le cas du trèfle violet :

$$\begin{array}{ll} \text{pour les 1}^{\text{res}} \text{ coupes : } y = - 19,7 + 2,74 x & r = 0,930 \\ \text{pour les 2}^{\text{es}} \text{ coupes : } y = - 13,1 + 2,12 x & r = 0,701. \end{array}$$

Du fait que nous obtenons des liaisons aussi étroites pour le ray-grass et le dactyle, il est justifié de conclure que la lignine brute a une teneur en azote variable avec celle du fourrage et obligatoirement élevée dans les fourrages jeunes.

2° Comme la confrontation des résultats précédents le suggérait déjà, nous avons effectivement constaté que la digestion pepsique ne permettait pas de réduire, sensiblement la teneur en azote de la lignine brute par rapport à notre méthode directe. Certains auteurs ont observé cependant que les lignines brutes obtenues par la méthode d'ELLIS et *al.*, avaient une teneur en azote nettement plus faible que celles obtenues par la méthode de NORMAN et JENKINS (25 à 35 p. 100 de moins dans les comparaisons effectuées par THOMAS et ARMSTRONG, 1949 et BALCH et *al.* 1954) ou par d'autres schémas sans traitement enzymatique (SALO, 1957) : elles contenaient ainsi moins de 20 p. 100 de matières azotées, même dans des fourrages jeunes. Ces divergences peuvent être dues, en majeure partie au fait, que la lignine brute obtenue par notre méthode doit contenir moins d'azote que celle isolée par la méthode de NORMAN et JENKINS parce que nous avons allongé la durée de l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 (JARRIGE, 1961).

La digestion trypsique a été légèrement plus efficace que la digestion pepsique pour réduire la teneur en azote de la lignine : la différence a été significative pour les fèces et l'aurait probablement été pour les fourrages si on avait étudié un plus grand nombre d'échantillons. Cela est en accord avec les observations d'ARMITAGE et *al.* (1948) sur un échantillon de trèfle et de BALCH et *al.* (1954) sur deux foins de ray-grass d'Italie, mais non avec celles de DE MAN et DE HEUS (1950) sur 4 échantillons de ray-grass anglais. Cette efficacité plus grande de la digestion trypsique est due en partie au fait que la trypsine est capable d'hydrolyser les polypeptides mais plus encore, au milieu alcalin puisque le simple traitement au carbonate a été aussi actif que la digestion trypsique.

Les traitements enzymatiques ou faiblement alcalins étudiés ont effectivement solubilisé une partie appréciable des matières azotées de la lignocellulose et réduit la quantité de matières azotées passant dans la lignine, mais ils ont, en même temps, diminué la lignine corrigée elle-même dans des proportions presque égales. C'est pourquoi ils ont relativement peu diminué la teneur en matières azotées de la lignine brute dans la plupart des échantillons, à l'exception cependant des traitements à la trypsine ou au carbonate dans certains échantillons de légumineuses (trèfle blanc).

3° Cette réduction de la lignine corrigée sous l'action des traitements ne semble pas avoir beaucoup retenu l'attention jusqu'ici ; pourtant, dans notre étude, elle a été quantitativement plus importante que la diminution des matières azotées résiduelles et elle a rendu compte en moyenne de 70 p. 100 de la diminution de la lignine brute sous l'action des traitements.

Elle a été plus élevée sous l'action du traitement trypsique, ce qui diffère des résultats de DE MAN et DE HEUS (1950), mais est en accord avec ceux de BALCH et *al.* (1954) et de WALKER et HEPBURN (1955-1956) : ces derniers auteurs ont constaté que les lignines brutes fournies par la méthode à la pepsine (ELLIS et *al.*) étaient beaucoup plus élevées que les lignines corrigées fournies par la méthode à la trypsine (ARMITAGE et *al.*), en moyenne de 47 p. 100 et de 74 p. 100 respectivement pour 25 foins et 26 ensilages (ces différences ne devant être que partiellement dues à la correction pour la teneur en matières azotées). C'est probablement le milieu

CO_3Na_2 qui est responsable de la diminution de la lignine corrigée au cours de la digestion trypsique puisque, à 38° , il a été aussi actif seul qu'additionné de trypsine dans les échantillons de fourrages et de fèces que nous avons étudiées ; il a été encore plus actif à l'ébullition.

Il s'agit de savoir maintenant comment les traitements, par le carbonate notamment, diminuent la lignine corrigée ; on peut envisager schématiquement qu'ils dissolvent, ou rendent extractibles par l'hydrolyse acide ultérieure :

— soit des substances interférentes qui échappent à l'hydrolyse par SO_4H_2 72 p. 100 et contaminent la lignine corrigée obtenue par la méthode directe ;

— soit une fraction de la lignine vraie elle-même.

Il est impossible de faire la part de ces deux modalités, d'abord parce que nous n'avons pas étudié les caractéristiques des lignines obtenues (teneur en méthoxyl ...) ni la composition des hydrolysats, ensuite parce que nous ne pouvons pas comparer les valeurs obtenues à celles fournies par une méthode de référence qui isolerait la lignine vraie en totalité et sans contamination.

Il est probable que certains constituants peuvent ne pas être complètement extraits par les traitements préliminaires et les hydrolyses acides de la méthode directe et viennent s'ajouter à la lignine vraie. Ce pourrait être le cas de certaines substances de nature lipidique, surtout si elles imprègnent les membranes (cutine par exemple) : on sait en effet qu'elles sont difficilement extractibles par le dégraissage en l'absence d'une hydrolyse préliminaire. Le traitement au carbonate pourrait ainsi les saponifier après l'hydrolyse par SO_4H_2 5. p. 100 ; un tel mode d'action est susceptible d'expliquer en partie l'action très importante du carbonate sur les trèfles, lesquels sont en effet riches en lipides complexes.

Il est possible également que le carbonate, surtout à l'ébullition, puisse dégrader une fraction de la lignine tout au moins dans certains échantillons. La lignine vraie est en effet très sensible aux traitements alcalins, mais à des degrés variables avec la famille et l'âge du végétal : c'est ainsi que le traitement par NaOH 1,25 p. 100 du dosage de la cellulose brute extrait 75 à 85 p. 100 de la lignine totale des graminées, et 30 à 65 p. 100 de celle des légumineuses (NORMAN, 1935 — ARMSTRONG, COOK et THOMAS, 1950). La proportion de la lignine solubilisée augmente naturellement avec la concentration de la solution : elle a été de 14,8 p. 100, 48,1 p. 100, 54,3 p. 100 et 64,2 p. 100 respectivement par ébullition dans des solutions de soude 0,01 *n*, 0,1 *n*, 0,25 *n* et 2 *n* pour l'échantillon de foin de fléole étudié par SALO (1957 *b*). Nous n'avons pas connaissance d'études sur l'action de solutions aussi faiblement alcalines que les solutions de CO_3Na_2 à 0,10 p. 100 ou à 0,25 p. 100, tout au moins sur la lignine des plantes fourragères. On peut penser cependant qu'elles ne peuvent dissoudre de quantités importantes de lignine vraie que dans certaines plantes jeunes comme celles que nous avons étudiées.

4° Toutes ces incertitudes font qu'il est impossible d'apprécier correctement l'intérêt des traitements étudiés, de choisir le traitement approprié et de définir la méthode de dosage la plus satisfaisante. Il risque d'en être ainsi aussi longtemps qu'on ne connaîtra pas mieux la structure et les caractéristiques des lignines des plantes fourragères et qu'on ne saura pas réellement ce qu'on cherche à doser.

On peut conclure par contre que les lignines brutes isolées par les méthodes le plus généralement utilisées sont toujours impures et contiennent obligatoirement de l'azote en proportion très variable. Il est nécessaire de déterminer cette dernière

pour estimer la lignine corrigée si on veut comparer les fourrages d'espèces et de teneurs en matières azotées très différentes et étudier correctement la composition des membranes et les processus de la lignification. C'est d'ailleurs ce qu'ont déjà proposé plusieurs auteurs à la suite de PALOHEIMO (1925) (WAKSMAN et STEVENS, 1930 — ARMITAGE et *al.*, 1948 — THOMAS et ARMSTRONG, 1949 — SALO, 1957 *a*). Les méthodes limitées à la détermination de la lignine brute telles que celle d'ELLIS et *al.* qui semble être actuellement la plus employée, conduisent à surestimer la teneur en lignine des fourrages jeunes et à réduire l'amplitude des variations de la lignine au cours de la croissance de la plante.

La détermination de l'azote de la lignine vient allonger encore le dosage de la lignine déjà suffisamment complexe et délicat. Fort heureusement, on doit pouvoir l'estimer de façon satisfaisante à partir de l'azote initial qu'on est toujours amené à doser dans les études sur la valeur nutritive des fourrages.

Critères nutritionnels.

Digestibilité de la lignine et utilisation possible comme indicateur

La lignine demeure pour l'instant le constituant le plus indigestible des fourrages, le seul qu'on puisse utiliser comme « marqueur » pour mesurer l'importance de la digestion dans les différents compartiments du tractus digestif (HALE, DUNCAN, et HUFFMAN, 1947 ...) ainsi que la digestibilité de la ration (FORBES et GARRIGUS, 1948 ...) et la quantité consommée. Pour être satisfaisante à ce point de vue, toute méthode de dosage devrait isoler une lignine pratiquement indigestible, et cela, dans les différents types de fourrages et de rations.

Notre méthode directe ne répond pas à cette condition puisqu'elle a isolé des lignines brutes ayant un coefficient de digestibilité systématiquement positif, en moyenne de l'ordre de 11 p. 100 pour les foin et de 16 p. 100 pour les fourrages verts (tab 9). Elle n'est pas la seule dans ce cas : avec des méthodes différentes, tous les auteurs qui ont étudié un nombre minimum d'échantillons ont constaté que la lignine avait une digestibilité variable, le plus souvent comprise entre 0 et 20 p. 100 mais très rarement égale à 0 (cf. tabl. 10 et revues de TSCHERNIAK, 1950, JARRIGE, 1953 et FISHER, 1961 *a*). Plusieurs ont enregistré des valeurs fortement négatives, notamment pour des fourrages verts (FORBES et GARRIGUS, 1950) et de jeunes trèfles violets déshydratés (KIVIMAE, 1959) ; à l'opposé, NEHRING et LAUBE (1955) ont observé sur de jeunes seigles verts, hautement digestibles (81 à 83 p. 100), des valeurs de l'ordre de 30 p. 100, très comparables à celles que nous avons enregistrées sur certains jeunes fourrages verts.

La lignine corrigée de nos échantillons a présenté une digestibilité aussi variable que celle de la lignine brute mais systématiquement plus faible (tab 9), ce qui est en accord avec les observations de SALO (1958) et de KIVIMAE (1959) (— 2,2 p. 100 au lieu de 3,4 p. 100 pour la moyenne de 40 échantillons de trèfle violet) mais en opposition avec celles plus limitées d'autres auteurs (ELY et *al.*, 1953 — BALCH et *al.*, 1954) ; cette diminution a été intéressante pour la plupart des échantillons mais non pour certains fourrages verts où elle a fait apparaître une digestibilité négative.

Les traitements eux-mêmes n'ont permis d'isoler une lignine moins digestible que dans certains échantillons de fourrages verts, la digestion trypsique étant la plus active à cet égard. Cela confirme les observations de BALCH et *al.*,

(1954) mais non celles de SULLIVAN (1955) qui a constaté que l'adjonction d'un traitement au CO_3Na_2 augmentait la digestibilité de la lignine brute par rapport au seul traitement pepsique.

TABLEAU 10

Coefficient de digestibilité de la lignine des fourrages

Auteurs	Méthode de dosage	Animaux	Fourrages		Coefficient de digestibilité	
			Nature	Nombre	Limites	Moyenne
LOUW (1944)	NORMAN et JENKINS	mouton	foins	2	— 16,4 à 12,4	— 6,5
RUTLEDGE et COMMON (1947)	COMMON	mouton	foins de graminées à graines	8	— 5,3 à 17,6	9,8
RUTLEDGE et COMMON (1948)	COMMON	mouton	foin de pré irlandais (faible digestibilité)	10	— 17,4 à 15,0	3,2
FORBES et GARRIGUS (1950)	ELLIS, MATRONE et MAYNARD	mouton	fourrages verts	9	— 27,0 à 11,0	— 10,0
			boeuf	10	— 18,0 à 6,0	— 5,4
CHARLET-LERY et al (1953)	MAHOOD et CABLE	mouton	fourrages verts (pâturin)	10	11,0 à 35,0	21,6
ELY et al. (1953)	ELLIS, MATRONE et MAYNARD	vache	foins de dactyle	4	7,0 à 11,0	9,7
SULLIVAN (1955)	ELLIS, MATRONE et MAYNARD	mouton	fourrages déshydratés	10	— 3,2 à 16,8	8,0
NEHRING et LAUBE (1955)	NEHRING et LAUBE	mouton	luzerne verte	9	0,8 à 99,2	4,8
			trèfle-graminées, vert	4	4,5 à 13,4	7,9
			seigle vert seul ou avec de la vesce	5	13,0 à 31,6	25,4
			pailles de céréales graminées et légumineuses du Nouveau Mexique	7	7,9 à 20,7	13,1
WATKINS et KEARNS (1956)	ELLIS, MATRONE et MAYNARD	mouton	graminées et légumineuses du Nouveau Mexique	8	10,4 à 18,3	1,0
			foins fauchés tôt	5	13,7 à 2,22	17,6
SALO (1958)	SALO	mouton	foins fauchés à la date courante	5	— 1,5 à 3,4	1,8
KIVIMAE (1959)	ELLIS, MATRONE et MAYNARD	mouton	trèfle violet déshydraté	40	— 20,0 à 20,0 (environ)	3,4

Même après les traitements étudiés, la lignine corrigée présente encore un coefficient de digestibilité appréciable et très variable d'un fourrage à l'autre. Il ne faut pas s'en étonner car la structure et la composition de la molécule de lignine doit varier avec plusieurs facteurs (âge, espèce, mode de récolte et de conservation ...) et subir des modifications dans le tractus digestif de l'animal (cf. JARRIGE, 1953 — ELY et al., 1953). Ses groupements méthoxyl disparaissent en proportions variables, de 10 à 50 p. 100 (FRANÇOIS et al., 1951 — ELY et al., 1953 — SALO, 1958). Les noyaux benzéniques urinaires proviendraient en majeure partie d'une dégradation de la lignine ; la quantité qui en est éliminée par unité de lignine ingérée étant beaucoup plus élevée pour les plantes jeunes que pour les plantes âgées (PAZUR et DE LONG, 1948 — ELY et al., 1953), on peut penser que la lignine des plantes jeunes

subit une dégradation plus importante que celle des plantes âgées. C'est pourquoi le coefficient de digestibilité de la lignine d'une plante ou d'un mélange pourrait diminuer au cours du développement, en même temps que la digestibilité des autres constituants. Une telle évolution semble se dégager de nos résultats, plus spécialement de ceux obtenus sur les foins de prairie permanente, ainsi que des observations de SALO (1958) ; par contre, NEHRING et LAUBE (1955) ne l'ont pas trouvée pour la luzerne et le trèfle violet et KIVIMAE (1959) a même observé une relation inverse pour le trèfle violet.

En plus des transformations correspondant à cette digestion effective, il est possible que la lignine subisse dans le tube digestif des modifications telles que la lignine dosée dans les fèces ou dans les différents contenus digestifs n'est pas identique à celle dosée dans la plante. Ces lignines pourraient être, par exemple, « contaminées » à des degrés différents au cours du dosage. De telles modifications faussent l'estimation du coefficient de digestibilité de la lignine et doivent expliquer en majeure partie les valeurs négatives observées par certains auteurs (tab 10) et par nous-mêmes dans le cas du trèfle blanc n° 5 : les traitements au carbonate et à la trypsine ont diminué beaucoup plus la lignine du fourrage que celle des fèces.

Il semble donc très difficile, voire impossible, d'établir une méthode permettant de doser une lignine pratiquement indigestible dans les différents types de fourrage. Il faut se contenter, avec les méthodes actuelles, d'isoler une lignine faiblement digestible dans la plupart des plantes âgées et des foins mais non dans la plupart des fourrages verts, jeunes et feuillus. Lorsqu'on veut utiliser la lignine comme indicateur de digestibilité, il apparaît nécessaire de déterminer au préalable, dans chaque cas, la méthode ou le traitement permettant d'isoler la lignine la moins digestible et de faire une correction pour tenir compte de la digestibilité résiduelle.

Relations entre la teneur en lignine et la digestibilité du fourrage.

La teneur en lignine est en général le critère chimique le plus satisfaisant de la digestibilité des fourrages (cf. notamment LANCASTER, 1943 — HOMB, 1953 — WALKER et HEPBURN, 1955-1956 — KIVIMAE, 1959). La meilleure méthode de dosage est alors celle qui isole les lignines permettant d'estimer la digestibilité des fourrages avec une erreur minimum.

Pour nos 25 échantillons de fourrages (fig. 5), les teneurs en lignine brute (x_1) et en lignine corrigée (x_2) ont présenté des relations très étroites avec la digestibilité de la matière organique :

$$\begin{aligned} y &= 95,10 - 4,029 x_1 & r &= 0,92 \\ y &= 88,34 - 3,908 x_2 & r &= 0,94. \end{aligned}$$

Elles ont permis de l'estimer avec une erreur moyenne (différences entre la valeur exacte et la valeur estimée) de 2,24 unités (soit 3,57 p. 100) pour la lignine brute et de 2,15 unités (soit 3,22 p. 100) pour la lignine corrigée. La lignine corrigée n'a donc apporté qu'une amélioration négligeable par rapport à la lignine brute, ce qui est en accord avec les observations de KIVIMAE (1959) sur les échantillons de trèfle violet.

Nous n'avons pas étudié un nombre d'échantillons suffisant pour comparer à cet égard les différents traitements. En revanche, WALKER et HEPBURN ont constaté sur 25 foins (1955) et sur 26 ensilages (1956) que les lignines déterminées suivant la méthode à la pepsine d'ELLIS et *al.*, étaient un meilleur critère de l'énergie brute digestible que les lignines corrigées déterminées suivant la méthode à la trypsine d'ARMITAGE et *al.*

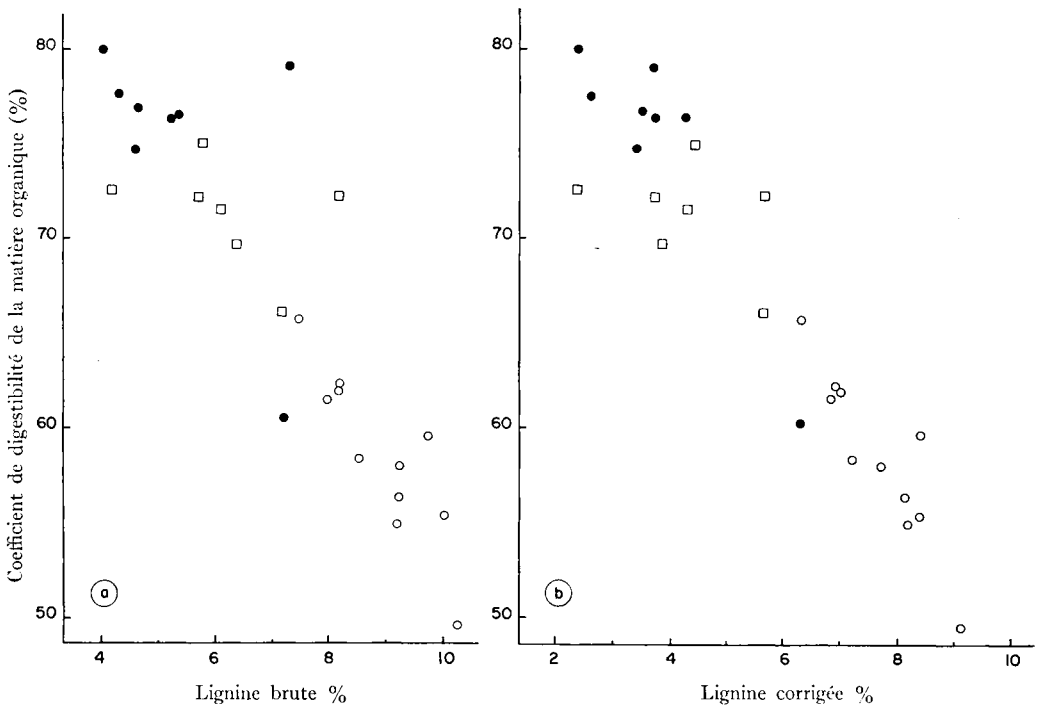


FIG. 5. — Relations entre le coefficient de digestibilité de la matière organique et les teneurs en lignine brute et en lignine corrigée

● Ray grass □ Dactyle ○ Foins

Ces résultats montrent qu'il faut comparer les méthodes ou les traitements du dosage de la lignine en fonction des recherches dans lesquelles on les utilisera. Les méthodes les plus satisfaisantes du point de vue biochimique peuvent fort bien ne pas être supérieures aux autres pour estimer la digestibilité du fourrage.

Critères analytiques.

La lignine étant le résidu obtenu quand on a solubilisé tous les autres constituants du fourrage, son dosage est obligatoirement long, délicat et coûteux. Il ne peut pas être envisagé dans les laboratoires d'analyse en série où on cherche à estimer de façon rapide et économique la valeur nutritive des fourrages pour établir des plans de rations pour les animaux ; il ne peut être effectué de façon systématique que dans les recherches sur la composition, la valeur alimentaire et l'utilisation digestive des aliments. Lorsqu'on dispose de plusieurs méthodes donnant également satisfaction du point de vue biochimique ou nutritionnel, suivant la

recherche poursuivie, on a intérêt à choisir celle qui est la plus simple, la plus rapide, la mieux standardisée et qui fournit les résultats les plus reproductibles.

La méthode de dosage directe sans traitement entre l'hydrolyse par SO_4H_2 5 p. 100 et l'hydrolyse par SO_4H_2 72 p. 100 est évidemment la plus simple et la plus rapide. L'introduction d'un traitement allonge le dosage et introduit des risques d'erreurs supplémentaires, surtout à cause de la filtration. Il a été relativement long de filtrer sur papier les hydrolysats enzymatiques et même impossible de filtrer les hydrolysats tryptiques des trèfles blancs qui ont dû être centrifugés. En conséquence, l'accord entre les répétitions a été moins bon pour les lignines brutes après traitement enzymatique que pour les lignines brutes déterminées directement. Les traitements ont en outre présenté l'inconvénient de modifier le pouvoir réducteur de l'hydrolysate par SO_4H_2 72 p. 100 : ils l'ont systématiquement diminué dans les fourrages (de 5, 7 et 14 p. 100 respectivement par les traitements à la pepsine, au carbonate et à la trypsine), mais l'ont parfois légèrement augmenté dans les fèces (notamment le traitement pepsique dans le cas des foin) ; ces modifications difficiles à interpréter perturbent l'estimation de la cellulose à partir du pouvoir réducteur de l'hydrolysate.

En contrepartie de ces inconvénients d'ordre analytique, les traitements étudiés n'apportent pas d'amélioration systématique sur les plans biochimiques et nutritionnels et, surtout, ne dispensent pas de doser l'azote de la lignine brute. Dans ces conditions, il ne nous semble pas intéressant de les introduire dans la méthode de dosage employée jusqu'à maintenant, à condition de doser ou d'estimer l'azote de la lignine obtenue tout au moins dans certaines études. On peut cependant les garder en réserve pour essayer de purifier la lignine brute de certains échantillons (légumineuses très feuillues) où elle semble être « contaminée » par une forte proportion de substances non azotées en plus des matières azotées résiduelles. Le traitement au carbonate devrait rendre des services à cet égard.

Comme nous n'avons pas comparé les méthodes de dosage complètes de la lignine, il est possible que certaines d'entre elles soient plus satisfaisantes que la nôtre ; cependant, l'amélioration qu'elles peuvent apporter devrait être très variable et généralement limitée, si on en juge d'après la digestibilité et la teneur en azote des lignines observées par les auteurs qui les ont employées.

Reçu pour publication en juillet 1962

SUMMARY

ANALYSIS OF CARBOHYDRATES IN FODDER. III — THE DETERMINATION OF LIGNIN

Three trials have been made to improve the determination and to define the composition and digestibility of lignin isolated according to the scheme of JARRIGE (1961) which includes the following treatments : water ; ethanol-benzene ; 5 per cent H_2SO_4 for 3 hours ; 72 per cent H_2SO_4 ; 3 per cent H_2SO_4 .

¹⁰ The first trial studied the possibility of obtaining a purer and relatively indigestible lignin by the introduction of an additional treatment between the first two stages of acid hydrolysis. Three treatments were compared with the direct method : (a) pepsin digestion (ELLIS *et al.*, 1946), (b) trypsin digestion (ARMITAGE *et al.*, 1948) and (c) treatment with Na_2CO_3 (0.25 per cent ; 38° ; 18 hours). The study was made on lignocelluloses isolated from 10 samples of green fodder and

hay (table 2) and the corresponding 10 faecal samples (sheep). Three of the samples of green fodder were selected as their crude lignins were known to have particularly high digestibility.

Compared with the values obtained with the direct method, all three treatments decreased the crude lignin (table 4), the quantity of nitrogen recovered in the lignin, and the corrected lignin (crude lignin $- N \times 6.25$) (table 5), but in very different proportions. The decrease was slight for the pepsin treatment but much greater for the trypsin treatment and with Na_2CO_3 , particularly with the samples of green fodder.

Some 70 per cent of the decrease in crude lignin content could be attributed to a decrease in the corrected lignin content. Only about 30 per cent was due to a decrease in the amount of nitrogen recovered and none of the treatments decreased significantly the nitrogen content of crude lignin in the fodder (table 6).

The lignin obtained from hay after these treatments had practically the same coefficient of digestibility as the lignin obtained directly (table 7); that from certain green fodders had a distinctly lower digestibility, particularly after tryptic digestion.

2° The previous trial had shown that the solution of 0.25 per cent Na_2CO_3 was generally as effective alone as when trypsin was added. In a second trial a comparison was made of four treatments with Na_2CO_3 introduced between the first two acid hydrolyses: (a) 0.10 per cent Na_2CO_3 at 38° for 18 hours, (b) 0.25 per cent Na_2CO_3 at 38° for 18 hours, (c) 0.10 per cent Na_2CO_3 at boiling point for one hour and (d) 0.25 per cent Na_2CO_3 at boiling point for one hour. This study was carried out on 5 samples of fodder and one sample of faeces.

When compared with the direct method, all four treatments decreased the crude lignin, the corrected lignin and the quantity of nitrogen recovered in the lignin (fig. 1) but had little effect on the digestibility of the lignin of the one meadow grass studied.

The two treatments at boiling point were much more effective than those at 38°; those at 0.25 per cent were slightly more effective than those at 0.10 per cent.

3° In the third trial quantitative relationships between the crude protein content ($N \times 6.25$) of crude lignins and the crude protein content of the samples were studied. The crude lignin was determined by the direct method on 34 samples of fodder containing from 7.1 to 36.2 per cent crude protein and on 26 samples of faeces containing from 8.6 to 23.3 per cent crude protein. The results are shown in table 8 and figures 2 and 3.

The crude protein in lignin, when expressed either as a percentage of the initial crude lignin (y_1) or as a percentage of the initial sample weight (y_2) showed a positive correlation (usually significant) with the crude protein contents of the fodder samples (fig. 2b) and of faecal samples (fig. 3b). The percentage (y_3) of the crude protein of the samples recovered in the crude lignin showed a significant negative correlation with the original crude protein content of the samples (fig. 2a) but a positive correlation (non significant) with the crude protein content of the faeces (fig. 3a).

From the above relationships it was possible to predict the crude protein content of crude lignin and then to estimate the corrected lignin with only a small average error.

In 24 out of 25 fodders, the corrected lignin had a lower digestibility coefficient than the crude lignin (fig. 4, table 9). The difference was slight for the hay but was about 15 units for these young fodders whose crude lignin contained over 30 per cent crude protein.

4° In a discussion of these results in terms of biochemical, nutritional and analytical aspects, the following point were emphasized.

a) Comparison of methods for the determination of lignin is difficult as there is no standard reference method and the exact composition and structure of the lignins of fodder is not known. Methods of lignin determination should be chosen according to the purpose for which the determination is being made.

b) The nitrogen content of the crude lignin should be determined if the composition of fodders of very different nitrogen content is being compared or when lignin is being used as a faecal indicator.

c) None of the methods could isolate a completely indigestible lignin fraction from any of the fodders, more particularly in highly digestible young grass.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARMITAGE E. R., ASHWORTH R. de B., FERGUSON W. S., 1948. The determination of lignin in plant material of high protein content. *J. Soc. Chem. Ind., Lond.*, **67**, 241-243.
- BALCH D. A., BALCH C. C., ROWLAND S. J., 1954. The influence of the method of determination of lignin on the lignin-ratio technique for digestibility in the cow. *J. Sci. Food Agric.*, **5**, 584-588.
- BONDI A., MEYER H., 1948. Lignin in young plants. *Biochem. J.*, **43**, 248-256.
- BRAUNS F. E., 1952. The chemistry of lignin. *Academic Press Inc., Pub.*

- BRAUNS D. A., BRAUNS F. E., 1960. The chemistry of lignin. Supplement volume. *Academic Press Inc., Pub.*
- BRUNE H., SIECK K. H., 1956. Beitrag zur ligninbestimmung. *Tierernährung*, **11**, 253-257.
- CHARLET-LERY G., FRANÇOIS A., LEROY A. M., 1952. L'analyse des aliments destinés aux animaux et l'interprétation des résultats qu'elle fournit. *Ann. Zootec.*, **1** (3), 45-61.
- COMMON R. H., 1945. The Composition and digestibility of Northern Irish Ryegrass feed and Ryegrass feed cleanings. *J. Agric. Sci.*, **35**, 56.
- CRAMPTON E. W., MAYNARD L. A., 1938. The relation of cellulose and lignin content to the nutritive value of animal feeds. *J. Nutr.*, **15**, 383-395.
- DAVIS R. E., MILLER C. O., 1939. Partition of the less easily digested carbohydrate complex of forages. *Industr. Engng Chem. (Anal. Ed.)*, **11**, 651-652.
- DE MAN T. J., DE HEUS J. G., 1950. Lignin in grass (with special reference to the nitrogen present in the lignin preparations). *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas.*, **69**, 271-276.
- ELLIS G. H., MATRONE G., MAYNARD L. A., 1946. A 72 p. 100 H₂SO₄ method for the determination of lignin and its use in animal nutrition studies. *J. Anim. Sci.*, **5**, 285-297.
- ELY R. E., KANE E. A., JACOBSON W. C., MOORE L. A., 1953. Studies on the composition of lignin isolated from orchard grass at four stages of maturity and from the corresponding feces. *J. Dairy Sci.*, **38**, 346-355.
- FISCHER H., 1961 a. Lignin and feedstuff evaluation. A literature review. *Kunigl. Lantbrukshögsk. Ann.*, **27**, 493-509.
- FISCHER H., 1961 b. Quantitative determination of lignin in hay. *Acta Agric. Scand.*, **10**, Sup.
- FORBES R. M., CARRIGUS W. P., 1948. Application of a lignin ratio technique to the determination of the nutrient intake of grazing animals. *J. Anim. Sci.*, **7**, 373-382.
- FORBES R. M., GARRIGUS W. P., 1950. Some effects of forage composition on its nutritive value when cut and fed green to steers and wethers, as determined conventionally and by the lignin ratio. *J. Anim. Sci.*, **9**, 531-539.
- FORBES R. M., HAMILTON T. S., 1952. The utilization of certain cellulosic materials by swine. *J. Anim. Sci.*, **11**, 480-490.
- FRANÇOIS A., LEROY A. M., LERY A., 1951. Le sort des radicaux méthoxy au cours de la digestion des protéines et des lignines par les bovins. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, 1323-1325.
- GRAY F. V., PILGRIM A. F., WELLER R. A., 1958. The digestion of foodstuffs in the stomach of the sheep and the passage of digesta through its compartments. I — Cellulose, pentosans and solids. *Brit. J. Nutr.*, **12**, 404-413.
- HALE E. B., DUNCAN C. W., HUFFMAN C. F., 1947. Rumen digestion studies. I — A method of investigating chemical changes in the rumen. *J. Nutr.*, **34**, 733-745.
- HOMB T., 1953. Chemical composition and digestibility of grassland crops. *Acta Agric. Scand.*, **3**, 1-32.
- JARRIGE R., 1953. L'utilisation des glucides alimentaires par les ruminants (2^e partie). *Ann. Nutr., Paris*, **7**, 339-406.
- JARRIGE R., 1961. Analyse des constituants glucidiques des plantes fourragères. I — Fractionnement des membranes par les hydrolyses acides. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Bioph.*, **1**, 163-212.
- KIVIMÄE A., 1959. Chemical composition and digestibility of some grassland crops. *Acta Agric. Scand.*, **9**, Sup. 142 pp.
- LANCASTER R. J., 1943. Metabolism trials with New Zealand feeding stuffs. IV — The relative significance of lignin, cellulose, and crude fibre in the evaluation of food. *N. Z. J. Sci. Tech. A.*, **25**, 137-151.
- LOUW J. G., 1941. The relative digestibility of constituents of the carbohydrate complex of grasses at successive stages of growth with reference to their partition into crude fibre and nitrogen free extract according to the standard method for feeding stuff analysis. *Onderstepoort J. Vet. Sci.*, **17**, 165-179.
- MAC DOUGALL D., DE LONG W. A., 1948. A method for the determination of the lignin content of fresh plant tissue without preliminary drying. *Canad. J. Res. B.*, **26**, 468-471.
- MEYER H., BONDI A., 1952. Lignin in young plants. *Biochem. J.*, **52**, 95-99.
- MINSON D. J., RAYMOND W. F., HARRIS C. E., 1950. Studies in the digestibility of herbage. VIII — The digestibility of S37 cocksfoot, S23 ryegrass and S24 ryegrass. *J. Brit. Grassl. Soc.*, **15**, 174-180.
- MOON F. E., ABOU RAYA A. K., 1952. The lignin fraction of animal feedingstuffs. I — Preliminary examination of lignin determination procedures. *J. Sci. Fd Agric.*, **3**, 399-406.
- MOON F. E., ABOU RAYA A. K., 1952. The lignin fraction of animal feeding stuffs. II — Investigation of lignin determination procedures and development of a method for « acid insoluble lignin ». *J. Sci. Fd Agric.*, **3**, 407-418.
- NORMAN A. G., JENKINS S. H., 1934. The determination of lignin. II — Errors induced by the presence of proteins. *Biochem. J.*, **28**, 2160-2168.
- PAZUR J. H., DE LONG W. A., 1948. Pasture studies. XXVIII — Effect of lignin content and of stage of maturity of dry clover forage on the urinary excretion of aromatic acids by sheep. *Sci. Agric.*, **28**, 39-46.
- RUTLEDGE W. A., COMMON R. H., 1947. The composition and digestibility of Northern Irish hays. I — Unthresed and thresed rye grass and cristed dogstail hays as saved for seed. *J. Agric. Sci.*, **37**, 60-63.
- RUTLEDGE W. A., COMMON R. H., 1948. The composition and digestibility of Northern Irish hays. II — Meadow hays. *J. Agric. Sci.*, **38**, 28-32.

- SALO M. L., 1957 a. Lignin studies. I — Investigations concerning lignin determination. *Maataloust. Aikakausk.*, **29**, 185-193.
- SALO M. L., 1957 b. Lignin studies. II — The lignin content and properties of lignin in different materials. *Maataloust. Aikakausk.*, **29**, 202-209.
- SALO M. L., 1958. Lignin studies. III — Lignin as tracer in digestibility investigations. *Maataloust. Aikakausk.*, **30**, 97-104.
- SULLIVAN J. T., 1955. Cellulose and lignin in forage grasses and their digestion coefficients. *J. Anim. Sci.*, **14**, 710-717.
- SULLIVAN J. T., 1959. A rapid method for the determination of acid insoluble lignin in forages and its relation to digestibility. *J. Anim. Sci.*, **18**, 1292-1298.
- THACKER E. J., 1954. A modified lignin procedure. *J. Anim. Sci.*, **13**, 501-503.
- THOMAS B., ARMSTRONG D. G., 1949. A study of some methods at present used for the determination of lignin. *J. Agric. Sci.*, **39**, 335-346.
- TSCHERNIAK A., 1950. Über die Verdaulichkeit des Lignins beim Haushuhn. *Mitt. Lebensm. Hyg. Bern.*, **41**, 181-188.
- WAKSMAN S. A., STEVENS K. R., 1930. System of proximate chemical analysis of plant materials. *Industr. Engng. Chem. (Anal. Ed.)*, **2**, 167-173.
- WALKER D. M., HEPBURN W. R., 1955. The nutritive value of roughages for sheep. I — The relationship between the grass digestible energy and the chemical composition of hays. *J. Agric. Sci.*, **45**, 298-310.
- WALKER D. M., HEPBURN W. R., 1956. The nutritive value of roughages for sheep. II — The relationship between the grass digestible energy and the chemical composition of silages. *J. Agric. Sci.*, **47**, 172-186.
- WATKINS W. E., KEARNS J. V., 1956. The nutritive value of various grasses and grass legume mixtures. *J. Anim. Sci.*, **15**, 153-162.
-