

DOSAGE DES LIPIDES DES FÈCES

EXTRACTION SÉPARÉE, IMPORTANCE ET COMPOSITION EN ACIDES GRAS
DES LIPIDES NON SAPONIFIÉS ET DE CEUX DES COMPLEXES INSOLUBLES

R. TOULLEC, (1) J. FLANZY et J. RIGAUD (1)

*Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants,
Station centrale de Recherches de Nutrition,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique*

SOMMAIRE

Le but de ce travail a été la mise au point d'une méthode de dosage des lipides des fèces qui permette d'extraire séparément à froid les lipides libres ou liés aux protéines d'une part, et ceux des complexes insolubles constitués essentiellement de savons, d'autre part.

La première fraction est extraite par le chloroforme-méthanol selon le principe de la méthode de FOLCH et *al.* (1957). Les acides gras de la seconde fraction sont libérés par l'acide chlorhydrique puis extraits par le chloroforme ou l'éther de pétrole.

Nous avons mis en évidence l'absence de savons solubles dans les fèces étudiées. La méthode proposée permet d'extraire des quantités totales de matières grasses voisines de celles obtenues par hydrolyse acide à chaud.

La méthode a été appliquée à des études de digestibilité de matières grasses sur veaux et sur porcs. La fraction insoluble avait une importance très variable (de 14 à 80 p. 100 des acides gras des fèces) et était la plus riche en acides gras longs et saturés.

INTRODUCTION

L'extraction des lipides des fèces pose des problèmes particuliers. En effet, les lipides s'y trouvent non seulement à l'état libre ou liés aux protéines, mais encore sous forme de complexes insolubles essentiellement constitués de savons. Cette fraction insoluble n'est pas extraite par les solvants utilisés dans les méthodes classiques. Plusieurs méthodes permettent de doser cette fraction en même temps que les autres lipides soit après saponification (LIEBERMANN, 1898), soit par acidification (SAXON, 1914). Par ailleurs, certaines méthodes (CLEMENT et CLEMENT, 1958 ; CARROL, 1958 ;

(1) Adresse actuelle : *Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants, Centre de Recherches zootechniques et Vétérinaires sur les Ruminants, 63-Theix, près Clermont-Ferrand.*

AYLWARD et WOOD, 1962 ; LOUGH, NAVIA et HARRIS, 1966) permettent d'obtenir séparément les lipides non saponifiés et la fraction insoluble, mais présentent l'inconvénient d'être réalisées à chaud.

Commentant une série d'essais réalisés sur la digestibilité de différentes matières grasses chez l'homme, DEUEL (1955) estimait que la quantité de savons excrétée était faible, du même ordre que celle de savons fécaux endogènes (10 p. 100 de la matière sèche des fèces) et qu'en conséquence il n'était pas nécessaire d'en tenir compte dans les calculs de digestibilité. Cependant, dans certains cas, il importe de doser les savons car ceux-ci peuvent constituer une proportion importante des lipides fécaux. Ainsi, chez le Rat, CROCKETT et DEUEL (1947) ont observé que les savons constituaient 89 p. 100 des lipides des fèces à la suite de l'ingestion de saindoux hydrogéné ; le CUD apparent qui aurait été de 91 p. 100 en négligeant les savons était en réalité de 21 p. 100. Chez le veau, CUNNINGHAM et LOOSLI (1954), ADAMS *et al.* (1959) et THOMKE (1963) ont obtenu des résultats analogues.

Nous nous sommes donc proposés de mettre au point une méthode d'extraction séparée à froid des lipides libres ou liés aux protéines d'une part, et de ceux des complexes insolubles d'autre part, afin d'en déterminer l'importance et la composition en acides gras. Cette méthode a été utilisée en particulier dans nos études de digestibilité de matières grasses sur veaux et sur porcs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Nos essais ont été effectués sur fèces de veau et de porc séchées à 80°C dans une étuve à circulation d'air chaud.

Le principe de la méthode, résumé dans la figure 1, est le suivant :

1. les lipides libres ou liés aux protéines sont extraits à froid par le chloroforme-méthanol et purifiés selon le principe de la méthode de FOLCH, LEES et SLOANNE STANLEY (1957) ou par saponification. Le produit obtenu est appelé fraction soluble dans le chloroforme-méthanol (FS) ;
2. les acides gras des complexes insolubles sont libérés à froid par acidification du résidu par l'acide chlorhydrique. Ils sont ensuite extraits à froid par le chloroforme ou l'éther de pétrole et purifiés par saponification. Le produit ainsi obtenu constitue la fraction que nous avons appelée fraction insoluble dans le chloroforme-méthanol (FI).

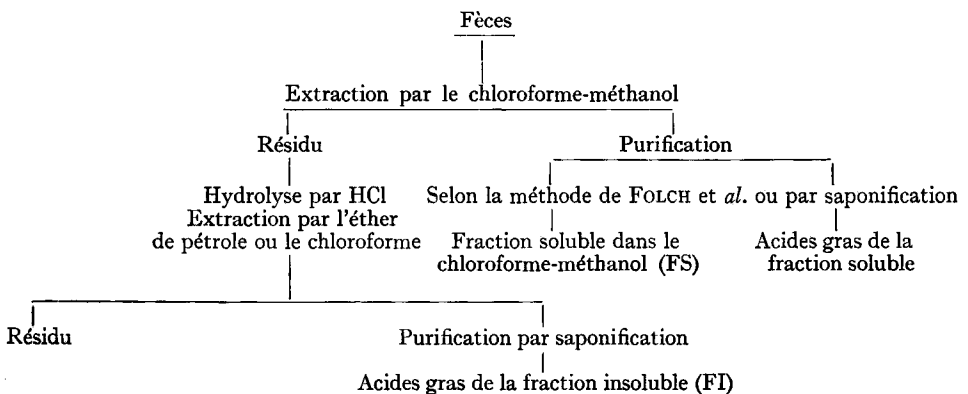


FIG. 1. — Diagramme de l'extraction des différentes fractions de lipides des fèces

Les réactifs utilisés ont été les suivants :

Chloroforme rectifié,
Méthanol 95 p. 100,
Éthanol 95 p. 100,
Acide chlorhydrique 6 N,
Éther de pétrole de point d'ébullition compris entre 35 et 70°C,
Potasse éthanolique 2 N,
Sulfate de sodium R. P. séché sous vide à 60°C,
Hyflosupercel.

Mode opératoire

1. Extraction des lipides solubles.

L'échantillon ayant été broyé finement, en peser exactement environ 5 g dans un bécher Vortex de 100 ml. Ajouter environ 50 ml de mélange chloroforme-méthanol 2/1 (v/v). Agiter à l'aide d'un homogénéiseur de type M. S. E. tournant à 15 000 t/mn pendant 3 fois une minute. Filtrer sous vide sur verre fritté n° 1 muni d'une légère couche d'hyflosupercel. Repasser le résidu dans le bécher Vortex, ajouter environ 40 ml de chloroforme-méthanol et procéder comme ci-dessus. Extraire une troisième fois. Réunir les extraits et les purifier selon la méthode de FOLCH *et al.* par un lavage à l'eau salée (à 0,73 p. 100 de chlorure de sodium) suivi d'un second lavage à la phase supérieure aqueuse du mélange chloroforme-méthanol-eau à 0,58 p. 100 de chlorure de sodium (8/4/3/v/v). Sécher la phase inférieure chloroformique par du sulfate de sodium anhydre et filtrer sur filtre sans graisse dans un ballon à col rodé taré. Évaporer le chloroforme sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Enlever les dernières traces de solvant sous vide en s'aidant d'un léger courant d'azote et peser le ballon. Le produit ainsi obtenu correspond à la fraction soluble.

2. Extraction des acides gras de la fraction insoluble.

Prendre le résidu de l'extraction précédente dans un erlenmeyer de 300 ml. Ajouter 25 ml d'alcool à 50 p. 100 et 25 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Bien mélanger et ajouter 50 ml de chloroforme. Agiter fortement pendant une minute et filtrer sous vide sur verre fritté garni d'une légère couche d'hyflosupercel. Transférer le filtrat dans une ampoule à décanter de 250 ml. Remettre le résidu dans l'erlenmeyer ainsi que la phase supérieure du filtrat (eau + alcool + acide chlorhydrique) et 40 ml de chloroforme puis procéder comme ci-dessus. Extraire une troisième fois. Réunir les extraits chloroformiques, les laver à l'eau distillée jusqu'à neutralité, les passer dans un ballon à col rodé et évaporer sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif.

3. Saponification des extraits.

Saponifier l'extrait correspondant à la fraction insoluble par 25 ml de potasse alcoolique à 10 p. 100. Ajouter 25 ml d'eau et extraire l'insaponifiable par l'éther de pétrole en 3 fois (50, 40 et 40 ml). Libérer les acides gras par addition d'acide chlorhydrique et les extraire par l'éther de pétrole comme l'insaponifiable. Neutraliser les extraits éthers par lavages à l'eau distillée, les sécher par du sulfate de sodium anhydre et les filtrer sur filtre sans graisse dans des ballons à col rodé tarés. Évaporer l'éther de pétrole sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif. Enlever les dernières traces de solvant sous vide à l'aide d'un léger courant d'azote et peser les ballons.

Par ailleurs, en ce qui concerne la fraction soluble, si le but est seulement de déterminer la quantité d'acides gras présente dans les fèces sous forme non saponifiée, il n'est pas utile de laver l'extrait obtenu par le chloroforme-méthanol. Il suffit alors d'évaporer le chloroforme-méthanol sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, de saponifier l'extrait et de procéder ensuite comme ci-dessus.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Justification des conditions opératoires

Problème des savons solubles.

Lors de l'extraction des lipides libres ou liés aux protéines, le chloroforme-méthanol pourrait dissoudre d'éventuels savons solubles présents dans les fèces. Ces savons solubles se retrouveraient alors en partie dans les eaux de lavage de la phase

TABLEAU I

Influence de la composition en acides gras des matières grasses alimentaires sur la proportion d'acides gras excrétée sous forme insoluble (FI) chez le veau et le porc

Nombre d'animaux	Nature	Matières grasses alimentaires										PI p. 100 des acides gras totaux excrétés	CUD apparent des matières grasses	
		Composition en acides gras (p. 100 des esters méthyliques)											en tenant compte des FI	en négligeant les FI
		< C ₁₂	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₈ = 1	C ₁₈ = 2	> C ₁₈					
2	Mat. gras. du lait	10,0	4,2	12,3	31,3	10,2	24,0	4,9				19,2	97,5	98,0
2	Suif			3,4	26,0	27,4	32,2	2,0				70,0	88,0	96,4
2	Huile d'arachide				10,3	3,8	61,1	17,7	6,7			14,0	93,4	94,3
2	Huile de coprah	13,7	44,9	16,6	11,5	2,9	8,6	1,6				35,3	95,6	97,1
2	Huile de palme		0,9	4,3	42,0	5,6	41,1	9,1				12,2	95,1	97,2
2	Saindoux			1,5	28,3	17,2	44,3	6,0				42,6	96,4	97,8
2	Porcs X ₁ *		8,4	3,6	19,7	21,6	36,4	10,3				79,1	69,0	93,5
2	X ₂ *		12,1	9,6	19,2	22,4	27,4	13,3				79,0	70,0	93,7
2	X ₃ *		15,3	6,3	18,6	19,9	25,1	10,7				81,8	72,3	95,0
2	Saindoux				28,8	15,1	50,3	7,8				78,1	84,4	95,8

* X₁, X₂, X₃ sont des mélanges en proportions variables d'huiles de coprah, de tournesol, de coton et de beurre de cacao.

chloroformique. Par acidification de ces eaux de lavage et extraction par l'éther de pétrole, il serait donc possible d'isoler les acides gras correspondants aux savons solubles. En fait, la présence de savons solubles nous paraît impossible pour les raisons suivantes :

— l'éther de pétrole n'extrait que des traces d'acides gras après acidification des eaux de lavage et ces acides gras ne correspondent sans doute qu'à un entraînement d'une partie de la fraction soluble ;

— l'extraction des fèces par un mélange d'eau et d'alcool (50/50 v/v) devrait également nous permettre d'obtenir les savons solubles et d'isoler les acides gras correspondants, en procédant comme pour les phases de lavage de la fraction soluble. Or, ce procédé ne nous a permis d'extraire que des quantités infimes d'acides gras ;

— l'addition de cet extrait hydroalcoolique de fèces à une solution de savons de sodium a amené la formation d'un précipité de savons insolubles ;

— en ajoutant une quantité importante de savons de sodium dans des échantillons de fèces (1 g de savons pour 5 g de fèces), nous n'avons pu en extraire qu'une faible partie (de l'ordre de 25 p. 100) par le chloroforme-méthanol ou par le mélange d'eau et d'alcool, le reste se retrouvant dans la fraction insoluble. Il y avait donc encore eu insolubilisation d'une forte proportion de ces savons.

De même, SAMMONS et WIGGS (1960) en augmentant le pH par addition de soude, ont observé une augmentation de la quantité de savons de calcium dans des fèces humaines.

Il ne semble donc pas qu'il puisse exister des savons solubles dans les fèces que nous avons étudiées. En conséquence, nous avons réuni la fraction entraînée par les eaux de lavage et la fraction soluble.

Comparaison de la méthode proposée à la méthode par hydrolyse acide.

Nous avons analysé par notre méthode 12 échantillons de fèces de veau contenant entre 4 et 57 p. 100 de matières grasses. Lors de ces essais, nous avons utilisé l'éther de pétrole pour extraire la fraction soluble. Nous avons comparé les résultats à ceux obtenus en hydrolysant les fèces à chaud par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 1 h 30 avant extraction par l'éther de pétrole, méthode qui doit permettre d'extraire la totalité des acides gras. L'écart a été en moyenne de 1,5 p. 100 \pm 1,5 en faveur de l'hydrolyse acide (différence non significative au seuil 0,05).

Il semble que l'extraction soit encore meilleure quand le solvant utilisé pour extraire la fraction insoluble est le chloroforme et non l'éther de pétrole, ce qui est normal car le chloroforme est plus polaire. En effet, en reprenant les résidus de 6 échantillons après les deux phases d'extraction et en les soumettant à une hydrolyse à chaud par l'acide chlorhydrique, la proportion d'acides gras extraite a été de 1 p. 100 de l'extrait total dans le cas d'une extraction des acides gras de la fraction insoluble par le chloroforme, contre 2 à 3 p. 100 dans le cas d'une extraction par l'éther de pétrole.

2. Application au dosage des lipides dans les fèces de veau et de porc

Nous avons utilisé notre méthode dans des études de digestibilité de matières grasses sur veaux et sur porcs. Les veaux avaient reçu, entre les âges de 8 et 100 jours,

TABLEAU 2
 Comparaison de la composition en acides gras de la fraction soluble (FS)
 et de la fraction insoluble (FI)

Animal	Matières grasses alimentaires	Composition en acides des gras (p. 100 du total des esters méthyliques)												
		C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₈ = 1	C ₁₈ = 2	C ₂₀	C ₂₀ = 1	C ₂₂	C ₂₄			
Veau	Matières grasses du lait	FS	1,5	8,7	41,0	23,6	10,4							
		FI	1,3	8,6	43,1	25,7	7,5							
	Suif	FS		2,8	33,2	36,6	16,5							
		FI		1,4	34,2	52,2	6,2							
Veau	Huile d'arachide	FS		19,5	11,5	52,5	3,6	1,9	3,3	6,4	2,0			
		FI		18,9	20,3	12,8	0,9	0,9	8,9	23,7	15,7			
	Huile de coprah	FS	33,8	22,0	24,4	8,0	8,2	0,8						
		FI	30,4	25,3	30,3	10,6	2,3							
	Huile de palme	FS		1,5	61,4	9,8	23,9	2,3						
		FI		1,4	78,5	14,3	4,1	0,3						
	Saindoux	FS		1,9	33,0	34,5	28,2	0,7						
		FI		0,9	37,9	53,8	5,2	0,2						
Porc	X ₁	FS	5,5	4,8	30,5	30,8	24,3	3,9						
		FI	2,7	3,7	35,6	48,5	8,3	1,0						
	X ₂	FS	8,8	7,9	30,1	29,4	18,4	5,9						
		FI	4,0	5,4	38,3	47,4	5,6	1,2						
X ₃	FS	8,8	8,7	29,0	26,2	21,2	6,0							
	FI	4,5	6,9	37,7	45,2	4,9	0,9							
	Saindoux	FS			18,0	24,4	53,8	3,8						
		FI			25,8	53,0	20,5	0,7						

des quantités importantes de lait à 25 p. 1 000 de matières grasses ou de laits reconstitués à 25 p. 1 000 de matières grasses à partir d'aliments d'allaitement contenant respectivement 20 p. 100 (par rapport à la matière sèche) de suif, de saindoux, d'huiles d'arachide, de coprah ou de palme. Les porcs avaient reçu successivement, pendant des périodes expérimentales de trois semaines, quatre aliments contenant 13 p. 100 de matières grasses par rapport à la matière sèche. Dans l'un de ces aliments, les matières grasses étaient constituées par du saindoux, dans les trois autres elles étaient constituées par des mélanges en proportions variables de beurre de cacao, d'huiles de coprah, de coton et de tournesol, de manière à obtenir les compositions en acides gras rapportées dans le tableau 1.

Importance de la fraction insoluble.

Chez les veaux, la proportion des acides gras qui a été excrétée sous forme insoluble a varié de 14 à 70 p. 100 selon les matières grasses ingérées : elle s'est accrue avec la teneur en acides gras longs et saturés (tabl. 1). En revanche, chez les porcs la fraction insoluble a représenté dans tous les cas la majeure partie des lipides fécaux (80 p. 100 environ). Il est donc indispensable de doser la fraction insoluble pour déterminer avec précision le CUD apparent des matières grasses, ce qui est en accord avec les conclusions de nombreux auteurs, notamment CROCKETT et DEUEL (1947), et THOMKE (1963).

Composition en acides gras des deux fractions.

Dans tous les cas, les acides gras de la fraction insoluble ont été plus longs et plus saturés que ceux de la fraction soluble (tabl. 2) : ainsi, chez les porcs qui ont reçu l'aliment contenant du saindoux, les acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique constituaient respectivement 26, 53, 21 et 1 p. 100 de la première fraction et 18, 24, 54 et 4 p. 100 de la seconde. Chez les veaux, cette différence de composition a surtout été accentuée à la suite de l'ingestion de matières grasses dépourvues

TABLEAU 3

Composition en acides gras de la fraction acides gras libres et de la fraction saponifiée lors de la formation partielle de savons de calcium

	Acides gras (p. 100 des esters méthyliques)			
	C ₁₆	C ₁₈	C ₁₈ = 1	C ₁₈ = 2
Acides gras libres	26,7	27,9	32,9	12,5
Acides gras des savons	38,8	58,7	2,5	0,0

d'acides gras courts (suif, saindoux, huiles d'arachide et de palme). En revanche, chez les porcs, ce facteur ne semble pas avoir eu d'influence. *In vitro*, nous avons pu observer un phénomène analogue en ajoutant à une solution alcoolique d'acides palmitique, stéarique, oléique et linoléique une quantité d'eau de chaux telle que la totalité des acides gras ne puisse être saponifiée. Les acides gras qui ont été saponifiés et précipités sont plus longs et plus saturés que ceux qui sont restés libres (tabl. 3).

Incidence sur la digestibilité des acides gras.

On peut supposer que la plus faible digestibilité des acides gras longs et saturés est la conséquence de la formation de complexes insolubles qui ne passent pas à travers la paroi intestinale. Ces complexes seraient essentiellement des savons de Ca^{++} comme l'ont indiqué CARROLL et RICHARDS (1958) et se formeraient à une vitesse suffisante *in vivo* à partir des acides gras libres (GIVENS, 1917). Ainsi, l'acide palmitique du saindoux, situé préférentiellement en position interne dans la molécule de triglycéride (SAVARY, FLANZY et DESNUELLE, 1957) reste en majeure partie sous forme de monoglycéride lors de l'hydrolyse pancréatique dans la lumière intestinale ; il ne peut alors former de grandes quantités de savons insolubles et a une meilleure digestibilité que lorsqu'il est en position externe (par exemple chez les porcs, la digestibilité de l'acide palmitique du saindoux a été de 86 p. 100 au lieu de 50 p. 100 dans les autres matières grasses). SCRIBANTE et FAVARGER (1954) ont montré que l'acide stéarique a une digestibilité plus élevée sous forme de monostéarine que sous forme de triglycéride ou d'acide gras libre. Les résultats détaillés concernant la digestibilité des différents acides gras seront exposés dans des publications ultérieures.

En conclusion, la méthode mise au point permet de séparer et de doser directement à froid les lipides non saponifiés et les acides gras des complexes insolubles ainsi que d'analyser chacune de ces deux fractions. Cette méthode est donc intéressante pour l'étude de l'utilisation digestive des matières grasses, en particulier pour expliquer les différences observées en fonction de leur composition en acides gras.

Reçu pour publication en février 1968.

SUMMARY

ESTIMATION OF LIPIDS IN FÆCES. SEPARATE EXTRACTION, AMOUNT
AND FATTY ACID COMPOSITION OF UNSAPONIFIED LIPIDS
AND THOSE OF INSOLUBLE COMPLEXES

Lipids are present in fæces not only in the free state or bound to proteins, but also in the form of insoluble complexes, essentially made of soaps. The object of the study was to demonstrate a method for the separate extraction in the cold of unsaponified lipids and of the insoluble complexes in order to estimate the respective amounts and their fatty acid compositions.

The first fraction was extracted with chloroform-methanol according to the principle of the method of FOLCH *et al.* (1957). The fatty acids of the second fraction were liberated by hydrochloric acid and then extracted with chloroform or petroleum ether.

We have shown the absence of soluble soaps in the fæces studied. The method proposed allows the extraction of total fat material close to the value obtained by acid hydrolysis with heat.

The method was applied to studies of digestibility of fats by calves and pigs. The proportion of the insoluble fraction varied widely, from 14 to 80 per cent of the fatty acids of the fæces, and was richer in long-chain and saturated acids.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS R. S., GANDER J. E., GULLICKSON T. W., SAUTER J. H., 1959. Somme effects of feeding various filled milks to dairy calves. II. Fecal characteristics and digestibility data. *J. Dairy Sci.*, **42**, 1552-1558.
AYLWARD F., WOOD P. D. S., 1962. Lipid excretion. 2. Fractionation of human fecal lipids. *Brit. J. Nutr.*, **16**, 345-360.

- CARROLL K. K., 1958. Digestibility of individual fatty acids in the rats. *J. Nutr.*, **64**, 399-410.
- CARROLL K. K., RICHARDS J. F., 1958. Factors affecting digestibility of fatty acids in the rat. *J. Nutr.*, **64**, 411-424.
- CLEMENT J., CLEMENT G., 1958. Présence de savons relativement saturés à différentes étapes de la digestion, de la résorption et du transport des lipides. *Oléagineux*, **13**, 103-105.
- CROCKETT M. E., DEUEL Jr H. J., 1947. A comparison of the coefficient of digestibility and the rate of absorption of several natural and artificial fats as influenced by melting point. *J. Nutr.*, **33**, 187-194.
- CUNNINGHAM M., LOOSLI J. K., 1954. The effect of fat-free diets on young dairy calves with observations on metabolic fecal fat and digestion coefficients for lard and hydrogenated coconut oil. *J. Dairy Sci.*, **37**, 453-461.
- DEUEL Jr H. J., 1955. *The lipids, their chemistry and biochemistry*. Vol. II. Biochemistry. Interscience Publishers, p. 195.
- FOLCH J., LEES M., SLOANE STANLEY G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.
- GIVENS M. H., 1917. Studies in calcium and magnesium metabolism. 2. The effect of fat and fatty acid derivatives. *J. Biol. Chem.*, **31**, 441-444.
- LIEBERMANN J., 1898. *Arch. Ges. Physiol.*, **72**, 360, cité par VANDER KAMMER J. H., HUININK H., TEN B., WEYERS H. A., 1949. Rapid method for determining fat in feces. *J. Biol. Chem.*, **177**, 349-354.
- LOUGH K., NAVIA J. M., HARRIS R. S., 1966. Improved procedure for extracting food fatty acids. *J. A. O. C. S.*, **43**, 627-631.
- SAMMONS H. G., WIGGS S. M., 1960. The separation, estimation and analysis of calcium soaps in human feces. *Clin. Chem. Acta*, **5**, 141-146.
- SAVARY P., FLANZY J., DESNUELLE P., 1957. Emploi de la lipase pancréatique pour l'étude de la structure des corps gras naturels. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 414-423.
- SAXON G. J., 1914. A method for the determination of the total fats of undried feces and other moist masses. *J. Biol. Chem.*, **17**, 99. Cité par HAWK P. B., OSER B. L., SUMMERSON W. H., 1947. *Practical physiological chemistry* 12^e éd. The Blakiston company Toronto Canada, p. 409.
- SCRIBANTE P., FAVARGER P., 1954. Étude de la digestibilité de l'acide stéarique et de ses esters glycériques chez le rat. *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **12**, 74-89.
- THOMKE S., 1963. Die Verdaulichkeit von Vollmilch und Milchaustauschfuttermitteln mit Zusatz eines rindertalg-schmalz-gemisches bz von Knochenfett. *Züchtungskunde*, **35**, 214-231.
-