

PROTECTION DES PROTÉINES ALIMENTAIRES CONTRE LA DÉSAMINATION BACTÉRIENNE DANS LE RUMEN (1)

I. — ÉTUDES *IN VITRO* : COMPORTEMENT EN MILIEU DE RUMEN
DE QUELQUES PROTÉINES TANNÉES AVEC DU TANIN DE CHÂTAIGNIER
OU CERTAINS ALDÉHYDES (FORMALDÉHYDE, GLUTARALDÉHYDE, GLYOXAL)

S.-Z. ZELTER, Françoise LEROY et J.-P. TISSIER
avec la collaboration technique de Marguerite NAVILLE

Laboratoire de Recherches sur la Conservation et l'Efficacité des Aliments,
16 rue Claude-Bernard, 75 - Paris (5^e)
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas
Institut national de la Recherche agronomique

RÉSUMÉ

La possibilité de protéger les protéines alimentaires contre la désamination bactérienne dans le rumen par un traitement avec certaines substances tannantes végétales (extrait de bois de châtaignier) ou synthétiques (formaldéhyde, glutaraldéhyde, glyoxal) est étudiée en milieu de rumen *in vitro*.

Plusieurs aliments protidiques (tourteaux d'arachide, soja, lin, colza, tournesol, poudre de lait écrémé, caséine, farine de luzerne déshydratée) figurant dans le régime habituel du ruminant sont « complexés » par des quantités croissantes de produits tannants afin de déterminer : a) la dose minimum de chacune de ces substances qui supprime totalement la dégradation de la protéine considérée ; b) le degré de réversibilité enzymatique *in vitro* de la protéine ainsi « complexée » au contact de la pepsine ; c) l'effet de la protéine « complexée » sur le pouvoir cellulolytique de l'inoculum de rumen.

Il est mis en évidence que :

— La dose minimum de chaque substance tannante qui assure à « la protéine » une protection intégrale est essentiellement fonction des propriétés physico-chimiques originelles et du traitement thermique auquel est soumise la protéine (fig. 1 et 2, tabl. 2).

— Les valeurs originelles de solubilité enzymatique ne sont pas modifiées par ces doses avec le formol et le glyoxal ; elles sont abaissées d'environ 5 p. 100 avec l'extrait de châtaignier et le glutaraldéhyde (tabl. 3).

— Les doses minimales de chacun des aldéhydes expérimentés qui assurent à la protéine une protection à 100 p. 100 dépriment sensiblement (— 9 à — 17 p. 100) l'action cellulolytique de

(1) Les procédés de protection et les produits traités ont fait l'objet de brevets d'application déposés en France les 3 et 8 février 1965 et dans plusieurs autres pays, dont U. S. A. et U. R. S. S. en février 1966. La plupart de ces brevets ont déjà été délivrés.

l'inoculum de panse sur un substrat de paille de blé, alors que celles de tannin de châtaignier n'exercent pas d'effet négatif. Les doses d'aldéhydes qui assurent seulement une protection à 90 p. 100 n'affectent pratiquement pas (— 3,0 p. 100) le pouvoir cellulolytique (fig. 3).

Si les mesures *in vivo* confirment ce fait noté *in vitro* l'alternative serait le choix entre ces deux solutions.

INTRODUCTION

Les protéines alimentaires sont exposées dans le rumen à l'attaque des protéases et (ou) désaminases bactériennes. Le potentiel de protéosynthèse *in situ* des microorganismes de la panse, à partir du N-NH₃ formé, étant limité, ce processus catabolique occasionne à l'organisme des pertes azotées métaboliques. Ces pertes qui affectent l'efficacité nutritionnelle de « la protéine », sont d'autant plus élevées que cette dernière est plus soluble.

Le problème posé est celui des moyens capables d'éluder l'attaque de la microflore ruminale et, par voie de conséquence, d'augmenter la fraction de protéine ingérée atteignant, à l'état intact et disponible, les compartiments digestifs ultérieurs.

Le « durcissement » de la protéine à très haute température pouvait, certes, paraître une solution logique (CHALMERS *et al.*, 1954-1961-1964). Le résultat est plutôt décevant : dénaturation excessive se soldant par une nette diminution de la digestibilité azotée globale associée à une indisponibilité, sinon à une destruction plus ou moins partielle d'acides aminés essentiels, plus spécialement de la lysine, par exemple (CHALMERS *et al.*, 1961).

L'idée nous est venue (LEROY *et al.*, 1964 ; ZELTER et LEROY, 1965 ; LEROY *et al.*, 1966) que l'insolubilisation des protéines par certaines substances tannantes permettrait peut-être de surmonter les sérieux inconvénients d'un traitement thermique sévère.

A priori, cette idée pouvait paraître paradoxale. Effectivement, tanins natifs et protéines de nombreux fruits et certaines graines, forment des complexes irréversibles quasiment insolubles et inassimilables tant par le ruminant que par le monogastrique ; ils agissent comme dépresseurs de la digestibilité azotée et de la croissance (CHARLET-LÉRY *et al.*, 1955 ; OSLAGE et BECKER, 1958 ; HENIS *et al.*, 1964 ; CHANG et FULLER, 1964). Selon certains (WARCOLLIER, 1928 ; ULRICH, 1952 ; CHANG et FULLER, 1964 ; FULLER *et al.*, 1967), les tanins en question seraient de type condensé appartenant à un groupe catéchique non hydrolysable ni par les acides, ni par les enzymes.

Or, notre hypothèse fait appel à un type de tanins végétaux de structure pyrogallique, qui sont hydrolysables (HASLAM, 1966) et à certains mono- et dialdéhydes de synthèse, théoriquement susceptibles de former avec les protéines des liaisons plus ou moins réversibles.

Bien évidemment, cette idée n'est concevable que si les protéines « complexées » par cette catégorie de produits tanants : 1° sont stables en milieu de rumen entièrement libérables par les enzymes digestifs protéolytiques agissant au niveau de la caillette (pepsine) ou du duodénum (trypsine, chymotrypsine, carboxy-peptidases) ; 2° ne réduisent pas les activités métaboliques indispensables (autres que celles des protéases et des désaminases) de la micropopulation ruminale ; 3° sont d'une innocuité totale pour l'animal.

Nos observations expérimentales antérieures sur des protéines de tourteau d'arachide et de soja (LEROY *et al.*, 1964; ZELTER et LEROY, 1966) traitées par un extrait tannant de châtaignier ont apporté un premier argument montrant le bien-fondé de notre hypothèse. Elles nous ont incités à étudier les effets :

— de ce même traitement sur d'autres aliments azotés utilisés couramment dans l'alimentation du ruminant jeune ou adulte ;

— de la substitution de l'extrait tannant végétal de châtaignier par certaines substances tannantes de synthèse, notamment le formol, le glutaraldéhyde et le glyoxal.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les produits azotés traités et les substances tannantes expérimentées sont de provenance industrielle. Ils sont énumérés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU I

Nature des produits azotés traités et des substances tannantes expérimentées

Nature des aliments traités	Extrait tannant de bois de châtaignier	Formaldéhyde solution à 30 %	Glyoxal solution à 30%	Glutaraldéhyde solution à 25 %
Tourteau	Arachide	+	+	+
	Soja	+	—	—
	Lin	+	—	—
	Colza	+	—	—
	Tournesol	+	—	—
Poudre de lait écrémé « Spray »	+	+	—	—
Caséine selon HAMMARSTEN A	+	—	—	—
Caséine selon HAMMARSTEN B	—	+	—	—
Caséine lactique	—	—	—	—
Farine de luzerne déshydratée	+	—	—	—

La caséine et la farine de luzerne y ont été incluses à dessein, car la solubilité de leurs protéines en milieu de rumen se situe aux extrêmes de la gamme étudiée : la première est quasi entièrement soluble (\neq 80 p. 100) alors que la seconde est quasiment insoluble (\neq 15 p. 100) (cf. fig. 1.)

L'extrait tannant de bois de châtaignier (*Castanea sativa* ou *vesca*) est une poudre fabriquée industriellement qui renferme 69-70 p. 100 de tanin pur. Ce dernier possède une structure pyrogallique et appartient plus exactement au groupe des ellagitannins. Il se compose essentiellement d'aglycones ellagiques, galliques et chebuliques et d'une très faible part de tanin catéchique.

Le formaldéhyde, le glutaraldéhyde et le glyoxal sont des solutions techniques d'origine commerciale.

La technologie du tannage est réalisée comme suit : l'aliment finement pulvérisé et homogénéisé est additionné progressivement, selon sa nature, de 2 à 5 fois son poids d'une solution renfermant des doses variables de substances tannantes, en brassant continuellement la masse jusqu'à l'obtention d'une pâte homogène et souple. Celle-ci est laissée au repos 16-20 heures à la température ambiante afin de favoriser la fixation de la substance tannante sur la protéine et le gonflement maximal de cette dernière. L'absorption de la phase liquide par la masse doit être totale. La pâte est ensuite séchée à une température ne dépassant pas 80°C.

La méthodologie expérimentale de digestion *in vitro* et les techniques analytiques ont été indiquées dans nos précédentes publications (LEROY *et al.*, 1964; ZELTER et LEROY 1966). Nous

précisons seulement que N soluble total est dosé en milieu ATC (acide trichloracétique concentration finale 10 p. 100) après digestion *in vitro* en présence de jus de rumen.

Nous avons déterminé pour chacune des substances tannantes étudiées, la dose minimale qui insolubilise complètement chacune des protéines traitées et qui donne le seuil 0 désamination. A cet effet, nous avons observé *in vitro* la sensibilité des complexes aux attaques d'un inoculum de rumen de mouton provenant de mêmes donneurs maintenus à un régime alimentaire constant (foin de luzerne). Les échantillons de tourteaux d'arachide traités aux trois aldéhydes ont, en outre, été soumis 1°) au test *in vitro* de la cellulolyse afin d'observer leur effet en milieu de rumen sur l'action cellulolytique exercée par l'inoculum à l'égard d'un substrat de paille de blé et 2°) au test *in vitro* de la digestion pepsique pour mesurer la labilité de la protéine à se libérer de son complexe. Les produits traités au tanin de châtaignier n'ont pas subi la première de ces épreuves. Les résultats de nos précédents essais avec des tourteaux d'arachide et de soja étant suffisamment probants (LEROY *et al.*, 1964; ZELTER et LEROY, 1966).

RÉSULTATS

L'objectif à atteindre étant l'inhibition complète de la dégradation bactérienne de la protéine au niveau du rumen, les résultats enregistrés *in vitro* après 15 heures d'incubation en présence d'inoculum de panse font ressortir les points que voici :

1. Tannage à l'extrait de châtaignier (fig. 1)

Les protéines d'arachide ou de tournesol non traité sont désaminées à environ 60 p. 100. Leur protection totale exige une dose minimum de 14-15 p. 100 d'extrait tannant, celles de colza en demandent au plus 13 p. 100.

La fraction azotée de tourteau de soja et de lin, sujette à la dégradation étant sensiblement plus faible, son insolubilisation et le blocage radical de sa désamination peuvent être obtenus avec une dose maximale de 6 p. 100 d'extrait tannant.

La protection efficace des protéines de lait sec nécessite un fort pourcentage de poudre tannante (16 p. 100). A l'opposé, la farine de luzerne ne semble pas devoir être protégée soit parce que son azote est pratiquement insolubilisé lors du séchage à très haute température (750-800 °C), soit parce qu'elle possède, comme on le sait, une dose non négligeable de substances tannantes naturelles. La désamination substantielle d'une caséine à très forte solubilité est difficilement évitable, même après un tannage à 30, voire 50 p. 100. Même cette dernière dose, pourtant très élevée, laisse encore près de la moitié de l'azote de caséine à l'état soluble et exposé à la désamination.

En somme, la dose minimale d'extrait de châtaignier qui assure une inhibition radicale de la désamination microbienne « d'une protéine » dans le rumen, paraît déterminée par la nature de cette dernière : propriétés physico-chimiques originelles, intensité du traitement thermique de fabrication. La présence dans certains aliments de substances protectrices natives de la protéine pourrait éventuellement abaisser la dose de produit tannant empêchant sa désamination. Pour l'extrait de châtaignier étudié, cette dose (tabl. 2) se situe, selon le type de protéine, entre 6 et 15 p. 100 du substrat brut, 15 à 41 p. 100 des matières azotées totales, 32 à 85 p. 100 de la matière azotée solubilisée en milieu acide trichloracétique à 10 p. 100 (concentration finale).

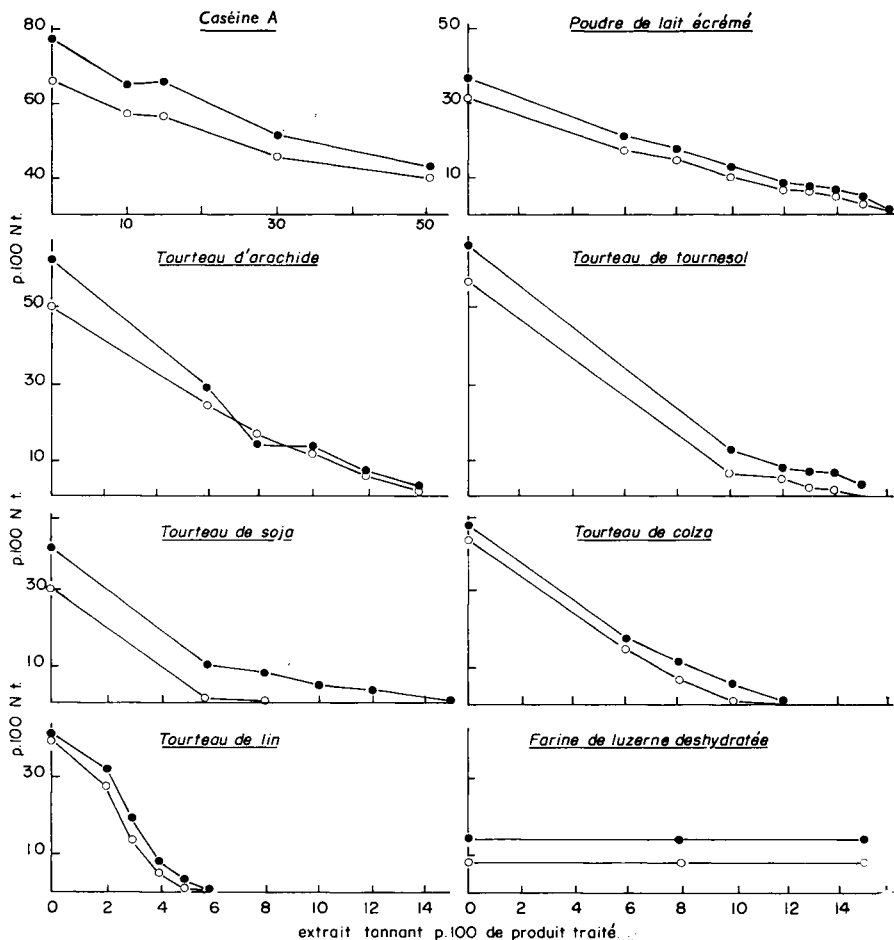


FIG. 1. — Effet du taux de tannage sur la dégradation microbienne de la protéine dans le rumen
 ● N soluble p. 100 N ○ N - NH₃ p. 100 N

TABLEAU 2

Doses minimales d'extrait tannant exigées par différentes protéines pour le blocage de leur désamination bactérienne dans le rumen

	Tanin % de produit	M.A.T. % de M.S.	Tanin % de M.A.T.	M.A. solubles % (1) de M.A.T.	Tanin % de M.A. solubles
Poudre de lait « Spray »	16	38,0	42	49,5	85,1
Tourteau de colza	12	41,7	29	49,1	58,6
Tourteau de tournesol	15	47,4	32	64,0	49,4
Tourteau de lin	6	40,4	15	46,5	31,9
Tourteau d'arachide	15	56,3	27	66,5	40,1
Tourteau de soja	8	52,6	15	43,7	34,8

(1) M.A. solubles = matières azotées solubles en milieu ATC (concentration finale 10 p. 100) après incubation *in vitro* en milieu de rumen.

2. Tannage aux aldéhydes (fig. 2 et 3)

L'inhibition totale de la désamination des protéines d'arachide est obtenue avec une dose de 0,6 p. 100 de formol ou avec 1,5-1,8 p. 100 de glyoxal ou de glutaraldéhyde. Le soja et la poudre de lait nettement moins vulnérables aux désaminases bactériennes demandent moitié moins de formol (0,3 p. 100), alors que la caséine, quelle qu'en soit la technique de préparation, exige une dose double (1,2 p. 100) de celle de l'arachide et quadruple de celle du lait sec, bien qu'elle contienne seulement 2,5 fois plus d'azote que ce dernier.

L'action protectrice du formol exercée à l'égard de la caséine a été également confirmée *in vitro* et *in vivo* chez le Mouton par les travaux récents de FERGUSON *et al.* (1967).

La différence d'affinité d'une protéine de même origine (caséine et lait écrémé Spray) pour le formol pourrait fort bien n'être qu'apparente. En effet, le lactose de la poudre de lait ayant pu servir à l'inoculum de rumen de source d'énergie immédiatement disponible, il est vraisemblable qu'une partie de l'ammoniaque engendrée par la dégradation des protéines de cet aliment ait été intégrée dans la protéosynthèse bactérienne. Ce phénomène pouvait, par conséquent, masquer par défaut l'amplitude effective de la désamination de la poudre de lait.

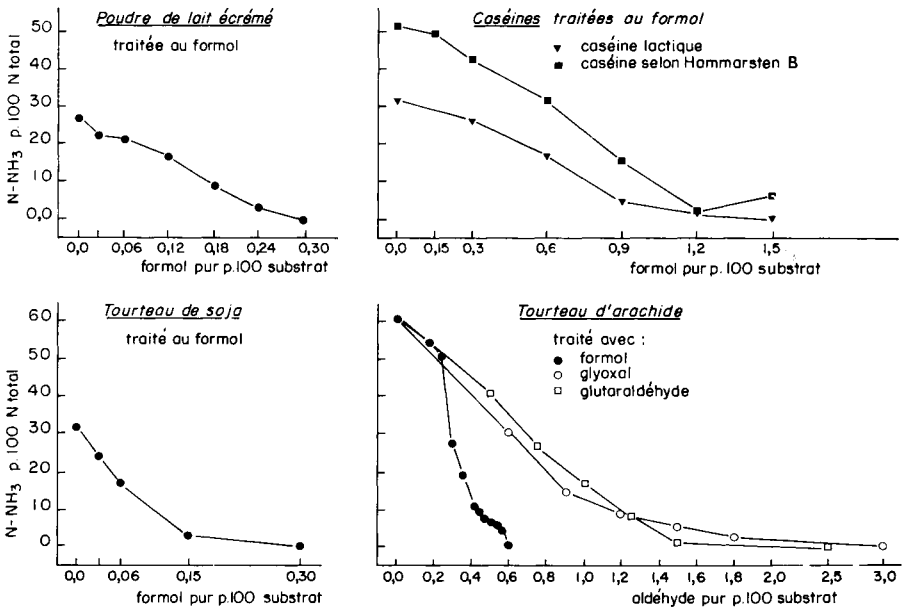


FIG. 2 — Effet de la dose d'aldéhyde sur la désamination de la protéine en milieu de rumen *in vitro*

Les doses minimales d'aldéhydes correspondant au seuil 0 désamination du tourteau d'arachide (fig. 3) dépriment cependant assez fortement l'activité cellulolytique de l'inoculum de panse (— 9 à — 17 p. 100). En revanche, l'accessibilité du complexe à la pepsine n'est guère affectée après traitement au formaldéhyde et au glyoxal; seul le glutaraldéhyde la diminue légèrement (— 5 p. 100), comme le montre le ta-

bleau 3. Un effet dépressif semblable est constaté après tannage de l'arachide et du soja avec une dose de 15 p. 100 d'extrait de châtaignier, qui supprime leur désamination (tabl. 3 a).

TABLEAU 3

Effet de la dose de produit tannant sur le taux de digestion pepsique in vitro de la protéine

a) Extrait tannant de châtaignier				
Dose % de produit traité.	0	0	15	30
	avant séchage	après séchage	après séchage	après séchage
Tourteau arachide	93,9 ± 0,5	93,5 ± 0,9	89,2 ± 0,7	86,3 ± 0,9
Tourteau de soja	89,3 ± 2,6	90,0 ± 2,8	84,6 ± 1,4	83,1 ± 2,2
b) Formaldéhyde				
Dose % de produit traité .	0	0,60	3,0	12,0
Tourteau arachide	94,0	93,0	91,2	89,7
Dose % de produit traité	0	0,15	2,4	
Tourteau de soja (pepsine + trypsine)	98,9	100	91,3	
c) Glyoxal				
Dose % de produit traité.	0	0,60	3,0	12,0
Tourteau arachide	94,0	93,0	92,6	91,6
d) Glutaraldéhyde				
Dose % de produit traité .	0	0,50	2,50	10,0
Tourteau arachide	94,0	92,5	88,9	87,2

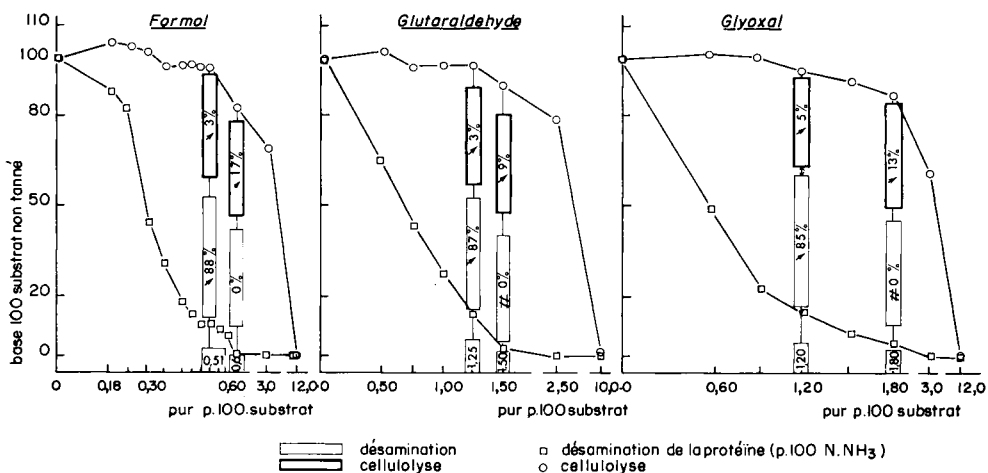


Fig. 3 — Effet de la dose d'aldéhyde sur la désamination de la protéine (□) et sur l'activité cellulolytique de l'inoculum de panse (○)
Valeurs exprimées en p. 100 du témoin non traité

Il est intéressant de signaler que l'hydrolyse acide (HCl 6 N × 24 heures) du digesta enzymatique (pepsine + trypsine) d'un échantillon de tourteau de soja traité avec une dose de 0,15 p. 100 de formol (qui ramène de 32 p. 100 à 2,9 p. 100 le taux de désamination de cette protéine soit donc une protection à 90 p. 100), libère 5,93 g de

lysine/16 g N, alors que celle de l'échantillon témoin non traité en libère dans les mêmes conditions 6,00 g (soit donc une différence négligeable de 1,2 p. 100) ; une dose de 2,4 p. 100 de formol réduit, par contre, de 24,5 p. 100 la quantité de lysine totale solubilisée par l'attaque pepsique-trypsique (DELORT-LAVAL et VIROBEN, 1969). Il semblerait donc, qu'*in vitro* du moins, la liaison formol-lysine de soja soit réversible pour un taux de tannage de 0,15 p. 100 qui abaisse de 90 p. 100 la désamination de cette protéine.

DISCUSSION

Au plan biochimique pur, la réactivité de « chaque protéine » à différentes substances tannantes et la stabilité des liaisons créées au sein des complexes tanins-protéines dans divers milieux sont encore très insuffisamment connues. Elles sont sans doute déterminées par l'affinité du groupement fonctionnel de la protéine mis en jeu et par la structure de la substance tannante employée.

Au plan nutritionnel, l'aspect crucial qui retient le plus l'attention est l'effet de la dose minimum de substance tannante donnant le point 0 désamination sur : 1^o le degré de réversibilité des dites liaisons en milieu de rumen et au contact des enzymes protéolytiques des portions ultérieures du canal alimentaire qui conditionnent l'utilisation digestive de la protéine ; 2^o l'activité cellulolytique des microorganismes de la panse sans laquelle le ruminant ne saurait assimiler les constituants membranaires des fourrages grossiers.

1. Effet sur la réversibilité enzymatique des complexes tannés

Nos résultats marquent une différence nette entre formol et glyoxal d'une part, glutaraldéhyde et poudre tannante de châtaignier d'autre part.

Les deux premiers produits n'exercent aucun effet négatif sur la digestion pepsique du complexe lorsque le tanage est effectué à la dose minimum de blocage de la désamination : les valeurs originelles s'abaissent d'environ 1 p. 100, alors qu'aux doses plus élevées, la diminution de la disponibilité enzymatique s'accroît progressivement. La dose de glutaraldéhyde ou de tanin de châtaignier correspondant au seuil 0 désamination, abaisse par contre légèrement mais nettement (\neq — 5 p. 100) la digestibilité pepsique. L'interprétation de cette constatation est fort malaisée dans l'état actuel de nos études.

Néanmoins, les études fondamentales récentes des spécialistes du tannage, en particulier celle de BOWEN *et al.* (1965) intéressant les liaisons collagène-formaldéhyde ou glutaraldéhyde, apportent quelques lumières sur ce problème, les teneurs de cette protéine en arginine et lysine, dont les groupements fonctionnels semblent présenter une affinité particulière à ces deux aldéhydes, étant fort comparables à celles de la protéine d'arachide.

Selon ces auteurs, les liaisons interchaînes formées entre le formol à la dose de 0,7-1,0 p. 100 (rapportée au poids sec de la protéine) et le collagène seraient instables. Cette instabilité, apparemment associée à des liaisons aldéhyde-amide ou guanidyl, le seraient également dans le cas des liaisons créées avec les groupements aminés, puisque la lysine et l'hydroxylysine sont entièrement récupérables par l'hydrolyse acide. Ceci s'observe également pour la lysine du tourteau de soja tanné avec

0,15 p. 100 de formol (DELORT-LAVAL et VIROBEN, 1969). Dans le cas du glutaraldéhyde employé à la dose de 1,3 à 6 p. 100, la récupération de la lysine et de l'hydroxylysine du collagène serait, par contre partielle, que le tannage ait lieu au pH acide de 4,0 ou basique de 8,0 (BOWES *et al.*, 1965).

Par ailleurs, l'attaque de la gliadine du blé avec 5 p. 100 de glutaraldéhyde en vue de l'identification de ses chaînes amino-acides réactives a permis à EWART (1968) de noter que l'hydrolyse acide permet de récupérer seulement 46 p. 100 de la lysine et 53 p. 100 de la tyrosine originelle, alors que les autres acides aminés ne sont pratiquement pas affectés.

Ces observations pourraient peut-être expliquer, du moins partiellement, la diminution de la digestibilité pepsique observée par nous sur le tourteau d'arachide tanné avec une dose de 1,5 p. 100 de glutaraldéhyde, dose sensiblement identique à celle (1,3 p. 100) appliquée par BOWES au collagène.

2. Effet sur l'activité cellulolytique de l'inoculum de panse

D'après nos études antérieures (LEROY *et al.*, 1964; ZELTER et LEROY, 1966), la présence d'un tourteau d'arachide ou de soja tanné avec une dose de 15 p. 100 de poudre tannante de châtaignier n'altère absolument pas le potentiel cellulolytique de l'inoculum de rumen *in vitro*, le coefficient d'utilisation digestive *in vivo* de la cellulose Weende d'un régime normal ainsi que la production d'acides gras volatils chez le Mouton. Par contre, dans la présente expérience, le tannage de l'arachide avec des doses de formol, de glyoxal ou de glutaraldéhyde, qui bloquent totalement sa désamination microbienne *in vitro*, dépriment sensiblement (— 9 à — 17 p. 100) la cellulolyse de la paille. Cet effet dépressif, qui s'accroît avec la progression du taux de tannage, est en revanche négligeable (\neq 3 p. 100) pour des doses très légèrement en deçà de celles donnant le seuil 0 désamination. En ce cas, la protection de la protéine, au lieu d'être totale, n'est plus assurée qu'à 85-90 p. 100 environ. Ce qui est certes encore fort satisfaisant.

Si l'action négative de ces aldéhydes, sur la cellulolyse notée *in vitro*, se trouvait confirmée *in vivo*, l'alternative serait entre soit la sauvegarde du pouvoir cellulolytique de la micro-population ruminale qui exposerait la protéine tannée aux aldéhydes à une très légère désamination (\neq 10 p. 100) soit la protection intégrale de la protéine qui entraînerait un affaiblissement non négligeable de l'activité des cellulases du rumen.

Reste à expliquer le comportement différent des microorganismes cellulolytiques du rumen, observé à l'égard d'une même protéine tannée à la poudre de châtaignier et aux aldéhydes. Deux hypothèses pourraient être envisagées :

1. On pourrait supposer que la réactivité de la microflore du rumen varierait avec la nature de l'agent tannant. En faveur de cette hypothèse, on peut invoquer le fait que certains microorganismes cellulolytiques saprophytes du rumen paraissent plus sensibles à l'acide gallotannique et à l'extrait de caroube qu'à l'acide gallique (HENIS *et al.* 1964).

Il faut cependant faire remarquer que cette constatation a été faite *in vitro* avec des solutions tannantes introduites sous forme libre dans le milieu de rumen. En opérant dans des conditions assez semblables, nous avons également observé que l'introduction telle quelle d'une quantité de poudre de châtaignier qui bloque totalement la désamination du tourteau d'arachide, fait passer de 35 à 7,4 p. 100 le taux de cel-

lulolyse de la paille, soit donc une chute de près de 80 p. 100. Par contre, l'introduction de cette même dose d'extrait tannant préalablement complexé par le tourteau d'arachide, ne modifie guère le pouvoir cellulolytique de l'inoculum de panse. Ce fait suggère une deuxième hypothèse apparemment plus plausible.

2. Les cellulases de la microflore ruminale manifesteraient une plus grande sensibilité à l'état de la substance tannante qu'à sa structure ; chez bien des microorganismes, les cellulases seraient liées à leurs surfaces extracellulaires (BAKER, 1939 ; GILLIGAN *et al.*, 1954 ; MILLER et BLUM, 1956). Mais une fraction importante de ces enzymes s'élaboreraient directement dans le rumen par un système typiquement indépendant et libre ; ce qui expliquerait l'existence, dans le liquide de panse, de cellulases solubles (GILL et KING, 1957). Les substances tannantes libres pourraient fort bien complexer les bactéries cellulolytiques saprophytes du rumen, soit par absorption en surface, soit en pénétrant à l'intérieur du corps bactérien et, réagissant sur certains des constituants protoplasmiques, réduire la viabilité, la croissance, la morphologie et l'activité enzymatique de cette microflore (HENIS *et al.*, 1964).

Si l'on se réfère aux études faites sur le collagène, déjà citées, une fraction importante de formol fixée sur certains groupements fonctionnels d'une telle protéine, donnerait des liaisons relativement instables (BOWEN *et al.*, 1965).

Les informations concernant les liaisons créées par le glutaraldéhyde ou le glyoxal sont plus rares et bien plus imprécises : la fraction de ces dialdéhydes fixée irréversiblement sur des groupements fonctionnels du collagène serait beaucoup plus forte que dans le cas du formol ; une faible fraction seulement créerait des liaisons relativement instables.

Or, dans notre procédé de tannage, qui est rapide (16 à 20 heures, au lieu de plusieurs semaines dans le cas du tannage du cuir), l'obtention du seuil 0 désamination pourrait exiger un léger excès d'aldéhyde par rapport aux groupements réactifs. Il est donc possible que cette fraction excédentaire demeure à l'état libre, même après le séchage de la protéine tannée. Il pourrait s'y ajouter une autre, libérée à la suite de la rupture par la micropopulation ruminale de certaines liaisons instables formées entre l'aldéhyde et (ou) son polymère avec la protéine traitée. L'éventualité d'une réaction entre la quantité d'aldéhyde libre et les cellulases du milieu de rumen ne devrait donc pas être exclue. Un tel mécanisme expliquerait éventuellement la baisse du pouvoir cellulolytique notée dans nos conditions expérimentales en présence d'arachide tannée aux doses d'aldéhyde donnant le seuil 0 désamination.

Ces résultats *in vitro*, suffisamment encourageants, nous ont conduits à expérimenter *in vivo* certaines des protéines étudiées (lait en poudre, colza, soja, arachide, lin) sur des animaux en différents états physiologiques (entretien, croissance, lactation), pour observer les effets de régimes comportant des protéines tannées sur :

— l'évolution postprandiale de la formation d'ammoniaque et d'acides gras volatils dans le rumen ;

— l'utilisation digestive globale de l'azote et des autres constituants majeurs de la ration ;

— le bilan azoté afin d'estimer le degré d'amélioration de l'utilisation métabolique.

Les résultats de ces études *in vivo*, déjà achevées, seront rapportées dans nos prochaines publications.

Reçu pour publication en juillet 1969.

REMERCIEMENTS

Les auteurs expriment leur gratitude à :

MM. J. DELORT-LAVAL et G. VIROBEN pour avoir bien voulu procéder aux tests de solubilité pepsique sur les échantillons traités aux aldéhydes; la Société des Produits Chimiques et Celluloses Rey et la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique, dont les concours financiers ont contribué à la réalisation de cette étude.

SUMMARY

PROTECTION OF PROTEINS IN THE FEED AGAINST
BACTERIAL DEAMINATION IN THE RUMEN. I. STUDIES
in vitro : BEHAVIOUR IN THE RUMEN
OF SOME PROTEINS TANNED WITH TANNIN FROM THE
CHESTNUT WOOD OR CERTAIN ALDEHYDES (FORMALDEHYDE,
GLUTARALDEHYDE, GLYOXAL)

The hypothesis that it might be possible to protect proteins in feed against deamination by bacteria in the rumen by treatment with certain tanning substances from plants (extract of chestnut wood) or synthetic (formaldehyde, glutaraldehyde, glyoxal) was verified experimentally in artificial rumen.

Several protein feeds (groundnut, soya, linseed, rapeseed and sunflower seed oilmeals, skimmed milk powder, casein and dried lucerne meal) common ingredients in diets for ruminants were complexed with increasing amounts of tanning agents to establish : *a*) The smallest amount of each of these substances which would completely suppress the degradation of the protein considered ; *b*) the degree to which the protein so complexed could be enzymically reversed on contact with pepsin ; *c*) the effect of the complexed protein on cellulolytic potency of the rumen inoculum.

It was shown that :

— The minimum dose of each tanning agent which would ensure complete protection to « a protein » depend essentially on the original physico-chemical properties and the heat treatment applied to the protein (figures 1 and 2, table 2).

— The original values for enzymatic solubility were not altered by these doses in the case of formal and glyoxal ; they were reduced by about 5 per cent by the chestnut extract and glyoxal (table 3).

— The minimum dose of each aldehyde tested which would ensure complete protection of the protein markedly depressed, by 13 to 20 per cent, the cellulolytic activity of an inoculum of rumen contents on a substrate of wheat straw. Chestnut extracts did not have this negative effect. Doses of aldehyde which ensured 90 per cent protection reduced cellulolytic activity by only 3 per cent (figure 3).

If measurements *in vivo* confirm the results *in vitro* the alternative would be the choice between these two solutions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAKRE F., 1939. Role of fungi and actinomycetes in the decomposition of cellulose. *Nature*, **143**, 522-523.
BOWES J. H., CATER C. W., ELLIS M. J., 1965. Determination of formaldehyde and glutaraldehyde bound to collagen by carbon 14 assay. *JL Amer. Leath. Chem. Assoc.*, **60**, 275-285.
CHALMERS M. I., CUTHBERTSON D. P., SYNGE R. L. M., 1954. Duodenal administration and heat processing as factors influencing fate of casein supplements. *J. Agric. Sci.*, **44**, 254-262.
CHALMERS M. I., 1961. Protein synthesis in the rumen in digestive physiology and nutrition of the ruminant in LEWIS, D. *Digestive physiology and nutrition of the ruminant*. Butterworth, London 205-226.

- CHALMERS M. I., JAYASINGHE J. B., MARSHALL S. B. M., 1964. The effect of heat treatment on the processing of groundnut meal on the value of the protein for the ruminants with some additional experiments on copra. *J. Agric. Sci.*, **63**, 283-287.
- CHANG S. I., FULLER H. L., 1964. Effect of tannin content of grain sorghums on their feeding value for growing chicks. *Poultry Sci.*, **43**, 30-35.
- CHARLET-LÉRY G., LEROY AM. M., ZELTER S. Z., 1955. Recherches sur l'efficacité alimentaire des marcs de pommes fermiers. V. Étude chez le Mouton et le Porc de la digestibilité apparente des constituants de marcs de pommes frais, ensilés ou déshydratés. *Ann. Zootech.*, **4**, 321-332.
- DELORT-LAVAL J., VIROBEN G., 1969. Taux de disponibilité de la lysine et de de la tyrosine dans les protéines protégées par certaines substances tannantes (formaldéhyde, extrait tannant de châtaignier) contre la désamination en milieu de rumen. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **269** Ser. D.
- EWART J. A. D., 1968. Action of glutaraldehyde, nitrous acid or chlorine on wheat proteins. *Jl. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 370-375.
- FERGUSON K. A., HEMSLEY J. A., REIS P. J., 1967. The effect of protecting dietary protein from microbial degradation in the rumen. *Aust. Jl. Sci.*, **30**, 215-217.
- FULLER H. L., CHANG S. I., POTTER D. K., 1967. Detoxication of dietary tannic acid by chicks. *Jl. Nutr.*, **91**, 477-481.
- GILLIGAN W., REESE E. T., 1954. Evidence for multiple components in microbial cellulases. *Canad. Jl. Microb.*, **1**, 90-107.
- GILL J. W., KING K. W., 1957. Characteristics of free rumen cellulases. *Jl. Agric. Food Chemist.*, **5**, 363-367.
- HASLAM E., 1966. *Chemistry of Vegetable tanins*. Acad. Press. N. Y., 1-179.
- HENIS Y., TAGARI A., VOLCANI R., 1964. Effect of water extracts of carob pods, tannic acid and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms. *Appl. Microb.*, **12**, 204-209.
- LEROY F., ZELTER S.-Z., FRANÇOIS A.-C., 1964. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne au niveau du rumen. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **259**, 1592-1595.
- MILLER G. L., BLUM R., 1956. Resolution of fungal cellulase by zone electrophoresis. *Jl. Biol. Chem.*, **218**, 131-137.
- LEROY F., ZELTER S.-Z., 1966. Tannage des protéines de tourteaux d'arachide et de soja et phénomènes de désamination dans le rumen de moutons adultes. 9th Int. Congr. Anim. Prod. Edinburgh (august) *Scientific Programme and Summaries*, p. 137.
- OSLAGE H. J., BECKER M., 1958. Versuche über den Nährwert von Johannisbrot beim Wiederkauer insbesondere über die Beeinträchtigung der Eiweissverdaulichkeit durch Gerbsaure des Futtermittels. *Arch. Tierernähr.*, **8**, 271-277.
- ULRICH R., 1952. *La vie des fruits*. Masson, Paris, 128-132.
- WARCOLLIER G., 1928. *Cidrerie*, **1**, 484 (Baillièrre, Paris).
- ZELTER S.-Z., LEROY F., 1966. Schutz der Nahrungsproteine gegen microbielle Desaminierung in Pansen. Gesellschaft für Ernährungsphysiologie der Haustiere — 18 Tagung in Giessen am 26 — 28 April 1965. *Zeitsch. Tierphysiol. Tierernähr. Futtermittelk.*, **22**, 39-46.