



HAL
open science

Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds.

P. Valdebouze, E. Bergeron, Therese Gaborit, J. Delort-Laval

► **To cite this version:**

P. Valdebouze, E. Bergeron, Therese Gaborit, J. Delort-Laval. Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds.. Canadian Journal of Plant Science, 1980, 60, pp.695-701. hal-02731168

HAL Id: hal-02731168

<https://hal.inrae.fr/hal-02731168>

Submitted on 2 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Tannage par le formol des aliments protéiques du ruminant

II. — Effet du taux de formol et du mode de traitement sur quelques caractéristiques de la fraction azotée

D. BERTRAND, D. TOME[†] et J. DELORT-LAVAL,

avec la collaboration technique de Françoise KOZLOWSKI

*I.N.R.A., Laboratoire de technologie des aliments des animaux,
Centre de Recherches de Nantes, chemin de la Géraudière
44072 Nantes Cedex*

Résumé

Les teneurs en formol extractible (Fe) ou libérable par hydrolyse (Fh) ainsi que la solubilité azotée et la désamination en « rumen artificiel » ont été mesurées sur 7 produits tannés dans des conditions standardisées à l'aide de doses croissantes de formol. Dans les limites du présent essai, il existe une relation linéaire entre taux de formol mis en jeu et teneurs en Fe ou Fh; cette relation dépend de la nature des produits mais ne semble pas liée de manière évidente à leur composition biochimique. Entre la solubilité azotée et la désamination en « rumen artificiel », il existe une relation étroite. Cette dernière est améliorée par prise en compte de la digestibilité de la matière organique. On en déduit qu'environ 20 p. 100 de l'azote insoluble des protéines protégées par tannage sont dégradables dans le rumen. Le traitement à la vapeur, accompagnant la granulation, provoque une libération partielle du formol fixé et une augmentation de la solubilité azotée. La présence, dans un mélange d'aliments, d'un composant formolé ayant subi une durée de maturation suffisante ne semble pas avoir d'influence marquée sur les caractéristiques de la fraction non traitée.

Mots clés : ruminants, protéines, solubilité, tannage, formaldéhyde.

I. — Introduction

Le tannage par le formaldéhyde des protéines alimentaires du ruminant réduit leur désamination sous l'action des microorganismes du rumen; s'il est bien conduit, il n'altère pas notablement leur digestion dans la suite du tractus digestif (ZELTER, LEROY et TISSIER, 1970). Ce traitement a trouvé en France une application industrielle depuis 1976 sur les tourteaux de soja et de colza.

Sur le plan expérimental, de très nombreuses études ont été réalisées, tant *in vitro* (PETER *et al.*, 1971; CAJA *et al.*, 1977) qu'*in vivo* sur des aliments protéiques très divers : caséine (FAICHNEY et WESTON, 1971; MILLS *et al.*, 1972; SHARMA, INGALLS et PARKER, 1974; WACHIRA *et al.*, 1974; WILLIAMS et SMITH, 1975; STOBBS, MINSON et MCLÉOD, 1977); lait écrémé (DELORT-LAVAL, LEROY et ZELTER, 1972) protéines de lactosérum (RODRIGUEZ, MULLER et SCHINGOETHE, 1974), tourteaux de tournesol (AMOS, BURDICK et HUBER, 1974; CAJA *et al.*, 1977), d'arachide (MILLER, 1972; FAICHNEY, 1972), de colza (SHARMA, INGALLS et PARKER, 1974); et de soja (PETER *et al.*, 1971; NIMRICK, PETER et HATFIELD, 1972; WACHIRA *et al.*, 1974; AMOS, BURDICK et HUBER, 1974; NISHIMUTA, ELY et BOLING, 1974; CAJA *et al.*, 1977; THOMAS, TRENKLE et BURROUGHS, 1979), fèverole et pois (PELLETIER et BOUCHARD, 1978). Plusieurs essais ont également été menés sur des mélanges d'aliments traités par le formol (WACHIRA *et al.*, 1974; FERGUSON, HEMSLEY et REIS, 1977; VÉRITÉ *et al.*, 1977).

Ces résultats bibliographiques sont très hétérogènes; nombre d'auteurs ne précisent pas suffisamment les conditions de traitement de leurs aliments expérimentaux. Or, le procédé de traitement, le taux de formol appliqué sont des facteurs importants de la qualité des produits. De plus, la marge est étroite, qui sépare un aliment insuffisamment tanné et donc protégé partiellement contre l'action des microorganismes du rumen et les protéines devenues, du fait d'un traitement excessif, inaccessibles à l'action des enzymes digestives. C'est donc pour préciser, sur une série plus étendue d'aliments protéiques, les conditions optimum de tannage par le formol que, dans le présent travail, les mesures de solubilité azotée en milieu tampon et de désamination des aliments *in vitro* en présence de microorganismes du rumen ont été complétées par le dosage du formol sous ses différentes formes. Il est rappelé, à cet égard, (TOME *et al.*, 1979) que le formol, dans un aliment traité, peut être caractérisé sous deux états : le formol extractible (Fe), libre ou faiblement fixé, et le formol libéré par hydrolyse (Fh), qui inclut la somme du formol n'ayant pas réagi et de celui impliqué dans des liaisons réversibles; la différence (Fr — Fe) représente la quantité de formol réversiblement liée au substrat (Fr) et fournit une estimation de l'intensité du traitement. C'est par ces méthodes qu'ont été évalués, sur 7 aliments protéiques, l'influence des paramètres du tannage (taux de formol mis en jeu, concentration de la solution d'agent tannant) et, sur des aliments formolés au laboratoire ou dans l'industrie, le rôle des traitements ultérieurs tels que la durée du stockage, le mélange à des aliments non traités, l'action de la vapeur ou l'agglomération.

2. — Matériels et techniques

2.1. — Substrats

Les sources protéiques soumises aux essais de laboratoire, leurs teneurs en matière sèche et en protéines brutes, exprimées en pour cent du produit tel quel, sont respectivement les suivantes :

- Tourteau d'arachide d'extraction (94,1; 50,2);
- Tourteau de tournesol décortiqué d'extraction (91,1; 38,4);
- Tourteau de coton d'extraction (89,4; 40,5);

- Pois d'hiver, variété « FRIMAS » (87,1; 23,2);
- Fèverole d'hiver, variété « SORAVI » (87,1; 25,6);
- Lupin blanc (93,6; 29,3);
- Protéines de lactosérum doux, purifiées par ultrafiltration (92,6; 69,0).

2.2. — Traitements

2.2.1. — Méthode de tannage

Dans la méthode de référence (ZELTER, LEROY et TISSIER, 1970), les substrats sont broyés au broyeur à marteaux (grille à trous de 1 mm) et homogénéisés. Cinquante grammes d'échantillon sont mélangés avec des solutions de formaldéhyde apportant 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 1; 1,2 de formaldéhyde pur p. 100 de substrat à traiter (p/p). Les solutions sont suffisamment diluées pour former une pâte homogène avec le substrat : un essai préliminaire a permis de déterminer les quantités de liquide à ajouter à cet effet soit, pour 50 g d'échantillon : tourteau d'arachide et de tournesol, 150 ml; tourteau de coton, pois et fèverole, 70 ml; lupin, 100 ml; protéines de lactosérum, 50 ml. Les aliments mélangés à la solution de formol sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante, puis lyophilisés. Pour tester l'effet du temps de réaction sur des échantillons de pois, ceux-ci sont traités par 0,8 p. 100 (p/p) de formol pur et laissés en contact avec la solution pendant des durées variables (entre 24 h et 8 j) avant lyophilisation.

Un autre traitement qui diffère sensiblement de la méthode de référence et qui est plus proche de la réalité industrielle (DELORT-LAVAL, 1980) a également été mis en œuvre. Il consiste à ajouter par pulvérisation une solution concentrée de formol à de petites quantités d'aliment placées dans un ballon tournant. La quantité de formol pulvérisée en une dizaine de minutes est déterminée par pesée du flacon d'agent tannant avant et après le traitement. Dans la présente étude, l'essai a porté sur 50 g de pois, traités par une solution commerciale de formol à 32,4 p. 100 (p/v).

2.2.2. — Traitements après tannage

Des essais de mélange et d'agglomération ont porté sur des tourteaux de soja et de colza tannés respectivement à 0,3 et 0,4 p. 100 de formol dans une installation industrielle dont le principe a été sommairement décrit ailleurs (DELORT-LAVAL, 1980).

Pour tester l'influence de la présence d'un produit formolé sur la fraction non tannée d'un aliment composé, un mélange de deux composants, farine de blé et tourteau de soja ou de colza tannés industriellement a été réalisé en faisant varier leurs proportions (farine de blé/tourteau : 0/100; 25/75; 50/50; 100/0). Une partie de ces mélanges a été agglomérée, sans addition d'eau, dans une presse expérimentale à piston (MELCON et DELORT-LAVAL, 1977) dont la température de filière était réglée à 80 °C. Enfin, pour simuler l'action de la vapeur dans une presse industrielle, une fraction des mêmes mélanges a été autoclavée pendant 1 mn à 115 °C, avant agglomération dans la même presse.

2.3. — Analyses

2.31. — Formol

Le titre des solutions concentrées de formol est vérifié par la méthode au sulfite de sodium (WALKER, 1964). Fe et Fh sont dosés suivant la méthode proposée dans une publication précédente (TOME *et al.*, 1979).

2.32. — Solubilité de l'azote

La mesure de la solubilité est celle appliquée par VÉRITÉ, JOURNET et JARRIGE (1979) aux aliments du ruminant et non encore publiée. Deux grammes d'échantillon broyés et homogénéisés sont mis en suspension dans 50 ml de tampon de MAC DOUGALL (1948) ajusté à pH 6,9 par barbotage de gaz carbonique. Cette suspension est agitée pendant une heure à température ambiante puis centrifugée pendant 15 mn à 3 000 g. Le surnageant est recueilli dans une fiole de 100 ml. Le culot est repris dans 40 ml de la solution tampon, agité une heure et centrifugé comme précédemment. Le second surnageant est ajouté au précédent; la fiole est ajustée à 100 ml. L'azote est déterminé sur l'échantillon initial et sur le surnageant selon la méthode KJELDAHL. La solubilité azotée est exprimée en p. 100 de l'azote introduit.

2.33. — Désamination en « rumen artificiel »

Le matériel et les conditions des essais sont ceux décrits par TISSERAND et ZELTER (1965). L'inoculum est constitué par du liquide de panse filtré sur 6 couches de gaze. Les donneurs sont trois moutons mâles adultes castrés, nourris *ad libitum* avec du fourrage; ils sont mis à jeun 16 h avant le prélèvement. Dans chaque tube d'incubation sont introduits :

— une prise d'essai choisie de manière à apporter environ 60 mg d'azote;

— 20 ml d'inoculum;

— 20 ml de salive artificielle (MAC DOUGALL, 1948) enrichie en S et en oligo-éléments (KUMARESAN, 1976). En mg/l : Na_2SO_4 : 400 — NaCl : 470 — KCl : 450 — MgCl_2 anhydre : 47 — CaCl_2 anhydre : 55 — NaHCO_3 : 9 240 — Na_2HPO_4 , $12 \text{ H}_2\text{O}$: 7 125. Un litre de cette solution est supplémenté par 10 ml d'une solution d'oligoéléments ayant la composition suivante, en mg/l : ZnSO_4 : 1 320; CoCl_2 , $6 \text{ H}_2\text{O}$: 12; MnSO_4 , H_2O : 1 890; Fe SO_4 , $7 \text{ H}_2\text{O}$: 3 680; Na_2SeO_3 , $5 \text{ H}_2\text{O}$: 2; CuSO_4 , $5 \text{ H}_2\text{O}$: 216; $(\text{NH}_4)_6 \text{ Mo}_7 \text{ O}_{24}$, $4 \text{ H}_2\text{O}$: 8,7; Na I : 1,65.

Les essais sont répétés trois fois. Un tube témoin, contenant la même quantité de matière sèche sous forme de paille broyée est incubé dans les mêmes conditions en vue de la correction de l'essai (ZELTER et LEROY, 1966). Après 24 h d'incubation, 10 ml de solution d'acide trichloracétique à 10 p. 100 (p/v) sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont centrifugés à 3 000 g pendant 5 mn, le culot est lavé à l'eau distillée et centrifugé à nouveau. Les surnageants provenant des deux centrifugations sont réunis et ajustés à 100 ml dans une fiole jaugée avec de l'eau distillée. L'ammoniac apparu est dosé sur un appareil automatique (CROOKE et SIMPSON, 1971). Le taux de désamination est exprimé par le rapport :

$$\frac{(\text{N} \cdot \text{NH}_3 \text{ essai} - \text{N} \cdot \text{NH}_3 \text{ témoin})}{\text{N prise d'essai}} \times 100$$

3. — Résultats

3.1. — Influence du formol mis en jeu sur les caractéristiques des produits tannés suivant la méthode de référence

Pour les différents aliments expérimentaux, lorsque la proportion de formol mise en jeu s'accroît, Fe et Fh augmentent également (fig. 1). La quantité de Fh dosée est toujours inférieure à la quantité de formol mise en jeu : au cours de la lyophilisation, une fraction de formol est perdue par évaporation et une autre se fixe de manière irréversible (TOME *et al.*, 1979). Les relations entre le formol mis en jeu et Fe ou Fh sont très sensiblement linéaires, dans les conditions de nos essais, les régressions linéaires étant, dans tous les cas, hautement significatives. La valeur des intersections à l'origine des droites de régression n'est pas significativement différente de 0. Une analyse de covariance entre Fh et Fe et le formol mis en jeu conduit à admettre ($P < 0,01$) que le formol ne se fixe pas avec la même intensité sur les différents substrats (tabl. 1).

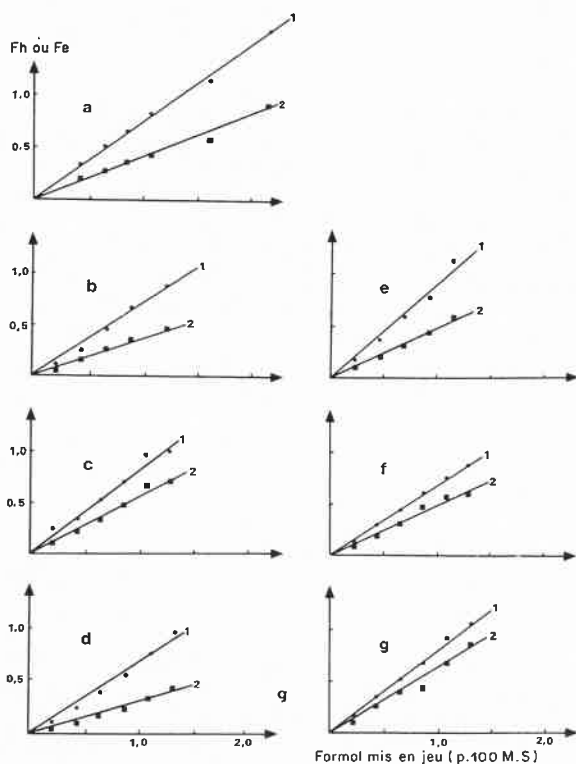


FIG. 1. — Influence du taux de formol ajouté sur les teneurs en formol libérable par hydrolyse (1) et en formol extractible (2) de différents aliments traités par la méthode de référence : protéines de lactoserum (a), fèvevrole (b), tourteau d'arachide (c), tourteau de coton (d), pois (e), lupin (f), tourteau de tournesol (g).

TABLEAU I

Influence de la quantité de formol mise en jeu (F)
sur le formol extractible (Fe), le formol libéré par hydrolyse (Fh) et sur la solubilité azotée

	Fe / F (1)	Fh / F (2)	N soluble p. 100 total avant traitement	Quantité de formol (p. 100 MS) nécessaire pour réduire la solubilité azotée à 20 p. 100 du N total
Tourteau de tournesol .	0,616 ± 0,042	0,796 ± 0,017	30,5	0,13
Tourteau d'arachide . .	0,564 ± 0,034	0,808 ± 0,046	56,6	0,25
Fèverole	0,401 ± 0,025	0,760 ± 0,052	73,5	0,55
Pois	0,484 ± 0,020	0,916 ± 0,045	82,9	0,43
Lupin	0,503 ± 0,030	0,683 ± 0,015	83,3	1,01
Protéines de lactosérum	0,396 ± 0,019	0,729 ± 0,016	90,1	1,05
Tourteau de coton . . .	0,341 ± 0,024	0,741 ± 0,036	12,0	—

(1) Coefficient de régression a de la relation $Fe = a.F + b$.

(2) Coefficient de régression c de la relation $Fh = c.F + d$.

La solubilité de l'azote des produits non traités est très variable, de 12 p. 100 pour le tourteau de coton à 90 p. 100 pour les protéines de lactosérum. Le traitement par le formol provoque sa diminution et une réduction des écarts entre les différents substrats : la solubilité de l'azote pour les fortes concentrations en formol se situe entre 4 et 9 p. 100. Les produits n'atteignent une solubilité azotée donnée, arbitrairement fixée à 20 p. 100 à titre d'exemple, qu'avec des quantités d'autant plus élevées de formol qu'ils sont initialement plus riches en azote soluble (tabl. 1).

Parmi les différents modèles mathématiques essayés pour décrire la relation entre solubilité azotée et formol mis en jeu, le meilleur ajustement a été obtenu pour une équation de la forme :

$$N \text{ insolubilisé (p. 100 N soluble initial)} = a + b\sqrt{F} + cF$$

où a , b , c , sont des coefficients dépendant de la nature des produits testés et F , la dose de formol mise en jeu exprimée en pourcentage (p/p) par rapport à la matière sèche du substrat (tabl. 2).

TABLEAU 2

Valeur des coefficients de la relation entre solubilité azotée et formol mis en jeu

$$\text{Relation : } \frac{\text{No} - \text{Ne}}{\text{No}} \cdot 100 = a + b\sqrt{\text{F}} + c\text{F}$$

avec : No = Solubilité de l'azote du produit traité sans formol (N soluble % N total)

Ne = Solubilité de l'azote du produit traité au formol (N soluble % N total).

F = Formol (en p. 100 de la matière sèche du substrat).

	Tournesol	Tourteau d'arachide	Fèverole	Pois	Lupin	Protéines de lactosérum	Tourteau de coton
a	1,439	1,58	— 3,555	— 5,004	— 2,448	— 3,585	— 0,743
b	175,66	196,755	107,405	47,56	132,898	39,474	85,865
c	— 92,249	— 105,405	— 10,592	28,676	— 46,758	23,274	— 31,073
r	0,991	0,994	0,952	0,944	0,979	0,950	0,994

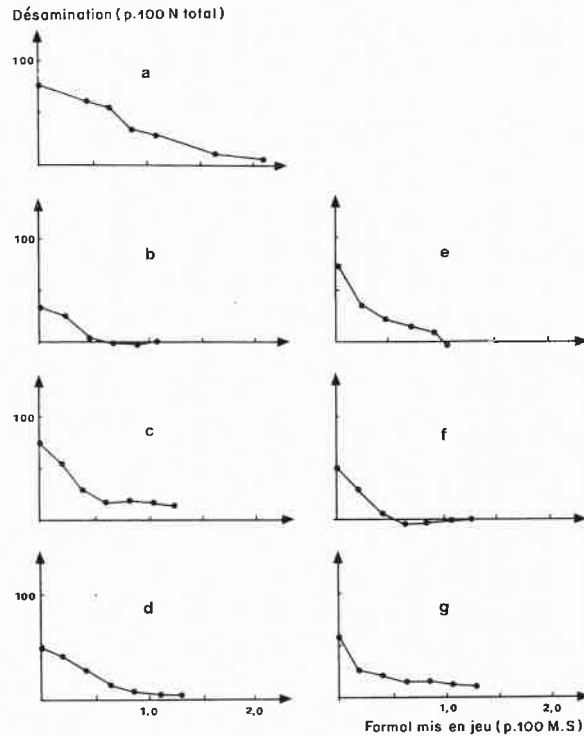


FIG. 2. — Influence du taux de formol ajouté sur l'intensité de la désamination *in vitro* des protéines de différents aliments traités selon la méthode de référence: protéines de lactosérum (a), fèvevole (b), tourteau d'arachide (c), tourteau de coton (d), pois (e), lupin (f), tourteau de tournesol (g).

Dans les conditions du test de désamination *in vitro*, le traitement des aliments par le formol provoque une diminution de l'ammoniac apparu après 24 h (fig. 2). Le taux de désamination prend quelquefois des valeurs négatives, le tube témoin dosant plus d'ammoniac que l'essai à la fin de l'incubation. Ceci est vraisemblablement une conséquence de la différence d'apport énergétique entre l'essai et le témoin, ce qui influe sur la consommation d'ammoniac au cours de la fermentation. Pour tenir compte de l'énergie disponible au cours du test *in vitro*, un autre mode d'expression est proposé dans la partie « DISCUSSION ».

3.2. — Effet du mode de traitement par le formol

Le pois a été traité à la fois par la méthode de référence et par pulvérisation de formol concentré. Pour des quantités comparables de formol mises en jeu, la concentration en formol est entre 40 et 200 fois plus importante dans la solution pulvérisée que dans celle de la méthode de référence (fig. 3 et 4).

A dose de formol mise en jeu comparable, l'augmentation de sa concentration provoque un accroissement léger du formol réversiblement lié (Fr), une diminution de la solubilité de l'azote et de la désamination *in vitro* (fig. 3 et 4) : ainsi, le traitement apparaît globalement plus intense lorsque la quantité d'eau ajoutée est plus faible.

A la température ambiante et dans le cas du pois traité par 0,8 p. 100 (p/p) de formaldéhyde pur suivant la méthode de référence, la plus grande partie des réactions entre le formol et l'aliment semble se produire sur une durée inférieure à 24 h. La solubilité azotée, initialement voisine de 80 p. 100 s'abaisse à 20 p. 100 environ en 24 h, puis reste pratiquement inchangée au-delà. Par contre, Fr augmente régulièrement et faiblement pendant les huit premiers jours et se stabilise ensuite.

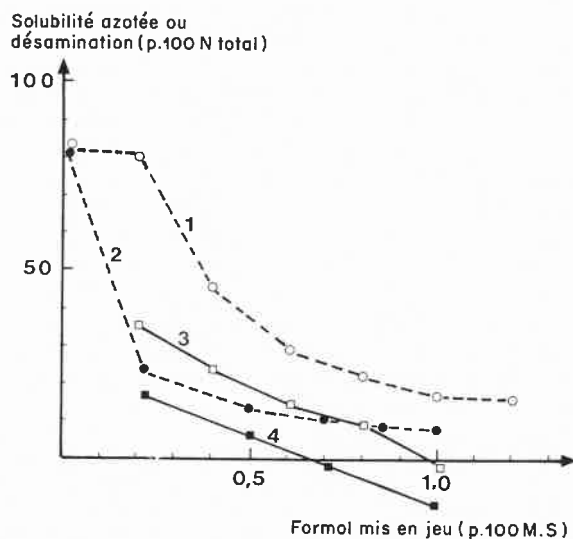


FIG. 3. — Effet de la concentration de la solution de formol sur la solubilité de la fraction azotée et sur la désamination in vitro du pois : solubilité azotée après traitement par des solutions diluées (1) ou concentrées (2) ; désamination après traitement par des solutions diluées (3) ou concentrées (4).

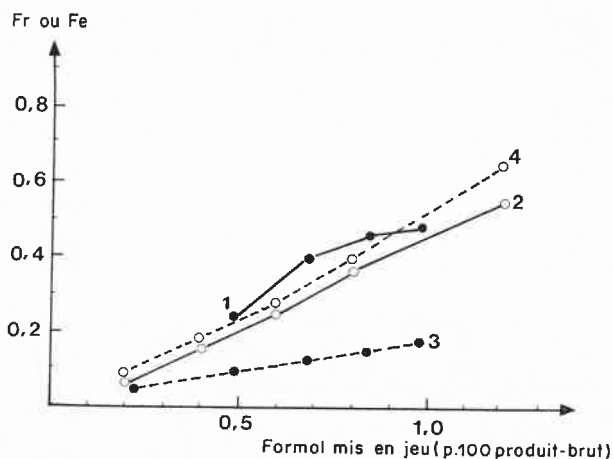


FIG. 4. — Effet de la concentration de la solution de formol sur la teneur en formol extractible (Fe) et en formol réversiblement lié (Fr) du pois : Fr en solution concentrée (1) ou diluée (2) ; Fe en solution concentrée (3) ou diluée (4).

3.3. — *Effet des traitements technologiques après tannage*

Dans les mélanges modèles de farine de blé et de tourteau de colza ou de soja tanné, les quantités de formol retrouvé sous ses différentes formes sont très proches de celles apportées par le substrat formolé (fig. 5). La quantité d'azote soluble du mélange est également assez voisine de la somme de celles apportées par chacun des constituants. Il n'y a donc pas de formation de liaisons nouvelles entre le formol d'un substrat tanné ayant subi une maturation suffisante et la fraction non tannée du mélange auquel il est incorporé (fig. 5).

La granulation sans adjonction de vapeur provoque peu de modifications des mélanges modèles : la solubilité de l'azote, les teneurs en Fe et Fh sont comparables à celles des produits laissés en farine (fig. 5). Le traitement par la vapeur a un effet marqué sur les caractéristiques de l'aggloméré (fig. 5). Les teneurs en Fe et Fh sont considérablement diminuées par ce traitement, après lequel il ne subsiste plus de relation linéaire entre les proportions de tourteaux tannés dans le mélange et les teneurs en formol. La solubilité de l'azote est également fortement modifiée : elle est diminuée dans le cas de la farine de blé, la chaleur ayant une action dénaturante sur les protéines de cette céréale. Elle est au contraire augmentée avec les tourteaux tannés : une fraction de Fr est en effet entraînée sous l'action de la vapeur ; l'effet est plus marqué pour le tourteau de colza que pour celui de soja. Comme pour les mélanges granulés sans addition d'eau, la teneur en azote soluble du mélange est proche de la valeur calculée à partir des analyses séparées des deux composants traités à la vapeur.

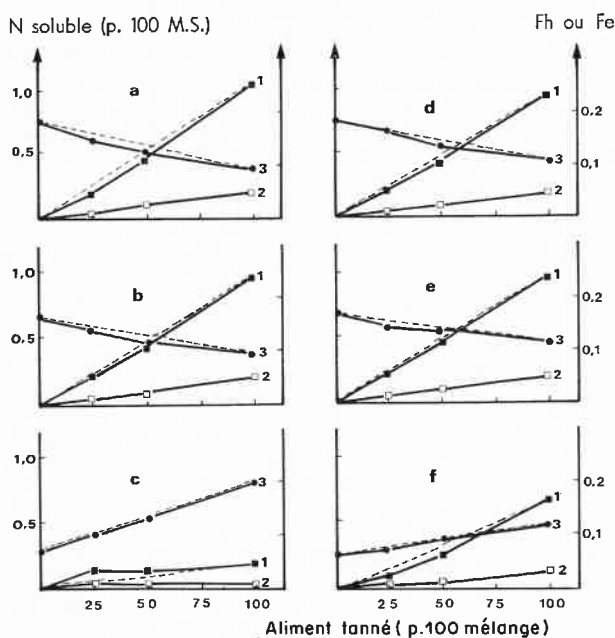


FIG. 5. — Effet de l'incorporation de tourteaux tannés à de la farine de blé sur la teneur en formol libérable par hydrolyse (1) ou extractible (2) et en azote soluble (3). Les valeurs calculées sont indiquées en traits pointillés. Colza ou soja : en farine (a ou d), aggloméré (b ou e), autoclavé et aggloméré (c ou f).

4. — Discussion

4.1. — Relation entre les paramètres des traitements et les propriétés des aliments

Les relations linéaires observées entre le taux de formol mis en jeu et Fe ou Fh montrent que les sites réactifs susceptibles de fixer le formol par des liaisons de faible énergie ou par des liaisons covalentes sont loin d'être complètement saturés, même aux plus fortes concentrations en formol du présent essai. Cependant, les caractéristiques de la fraction azotée ne suffisent pas à expliquer les différences observées de rétention en formol. Dans cette expérience, il n'a pas été possible de mettre en évidence de corrélation significative entre les proportions de Fe ou de Fh par rapport au formol mis en jeu (estimée par les coefficients des droites de régression) et la teneur en azote total ou en azote soluble des produits. De même, les teneurs en acides aminés basiques des différents aliments ne semblent pas être les facteurs déterminants de la fixation du formol. Il est connu que de nombreux composés biologiques sont susceptibles de réagir avec cette substance : les groupes hydroxylés des sucres peuvent former des hémiacétals en présence de l'aldéhyde (WALKER, 1964). De même, la cellulose réagit, dans des conditions douces : une étude de ROFF (1958) montre que l'équilibre réactionnel entre formol et cellulose demande environ un jour pour s'établir ; la réaction est réversible sous l'action d'un lavage à l'eau de la cellulose traitée. Enfin, dans les conditions du traitement de référence, au taux de 1 p. 100 de formol mis en jeu, l'amidon de maïs purifié fixe environ 50 p. 100 de l'aldéhyde sous forme de Fh. Des essais *in vitro* en rumen artificiel montrent cependant que la dégradabilité de l'amidon n'est pas affectée par le formol ajouté à ces doses (BERTRAND, résultats non publiés). La présence d'eau ou de réactifs accepteurs de formol, tels que l'ammoniac, déplace l'équilibre en diminuant la quantité de formol fixé sur l'amidon. Cette réaction pourrait intervenir dans le rumen, en présence de l'ammoniac provenant de la désamination des protéines alimentaires.

La comparaison des résultats obtenus par les deux modes de tannage au laboratoire conduit à penser que l'eau aurait un effet inhibiteur des réactions du formol avec le substrat : Fr diminue légèrement, la solubilité azotée et le taux de désamination augmentent lorsque la quantité d'eau ajoutée au moment du traitement est plus importante. Cependant, la proportion de Fh retrouvée par rapport au formol mis en jeu est plus grande avec le traitement par des solutions diluées. Ceci peut être dû à une perte plus importante de formol lors de la pulvérisation ou, plus vraisemblablement, à l'augmentation de la part du formol irréversiblement lié durant le traitement par des solutions concentrées. Cette dernière hypothèse est en accord avec la diminution de la solubilité qui serait principalement due à la formation de ponts méthyléniques entre les chaînes de protéines : certaines de ces réactions sont, en effet, irréversibles (FRENCH et EDSALL, 1945). La solubilité azotée des produits tannés après action de la vapeur est en relation avec celle mesurée sur les aliments avant la formolation ; le colza, dont la solubilité azotée avant tout traitement est trois fois plus importante que celle du soja est, après tannage, beaucoup plus sensible que ce dernier à l'action d'un traitement hydrothermique. La vapeur provoque en effet un doublement de la solubilité azotée du colza tanné et une augmentation de seulement 7 p. 100 en valeur absolue pour le soja formolé. Ces résultats montrent la réversibilité partielle des modifications engendrées par le tannage. Dans un autre essai portant sur un mélange contenant

des substrats traités par le formol et agglomérés industriellement avec injection de vapeur, il a été observé (TISSIER, communication personnelle) une augmentation de la solubilité azotée de 9 p. 100 et de la désamination de 7 p. 100 en valeur absolue par rapport au témoin non aggloméré. L'effet de l'injection de vapeur lors de l'agglomération industrielle est donc suffisamment sensible pour provoquer une modification de la valeur azotée d'un aliment composé préalablement traité par le formol.

La présente étude de l'influence de l'eau, liquide ou à l'état de vapeur, sur l'efficacité du tannage fait apparaître l'existence de deux types de liaisons responsables de l'insolubilisation des protéines; les unes seraient réversibles, les autres irréversibles et leur importance relative reste à déterminer. Après hydrolyse acide de protéines traitées par le formol, on retrouve, comme ponts de réticulation, des liaisons de type « MANICH » entre lysine et tyrosine, de nature irréversible (FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT, 1948*b*; BLASS, BIZZINI et RAYNAUD, 1967). D'autre part, de nombreuses liaisons peuvent redonner du formol libre dans des conditions relativement douces (TOME *et al.*, 1979). Parmi celles-ci, certaines ne sont vraisemblablement pas liées à l'insolubilisation des protéines; c'est le cas en particulier des dérivés hydroxyméthylés (FRENCH et EDSALL, 1945).

Au contraire, d'autres liaisons de réticulation, faisant intervenir notamment les groupements amine et amide primaires, guanidyle, thiole et peut-être indole et imidazole (FRAENKEL-CONRAT et OLCOTT, 1948, *a* et *b*) qui pourraient être également réversibles participeraient à l'insolubilisation des composés azotés. Le traitement par la vapeur étudié agirait sur ce dernier type de liaison que permet d'évaluer Fr (TOME *et al.*, 1979).

4.2. — Relation entre solubilité azotée et désamination

De nombreuses études ont montré l'existence d'une relation entre solubilité de l'azote et désamination « *in vitro* » (JARRIGE, 1978; CRAWFORD *et al.*, 1978; THOMAS, TRENKLE et BURROUGHS, 1979). Dans nos conditions expérimentales, on observe effectivement la relation linéaire suivante :

$$DES_a = 0,58.SOLN + 11 \quad (n = 38; r = 0,73)$$

avec :

DES_a : taux de désamination apparent après 24 h d'incubation *in vitro* (en pourcentage d'N total).

SOLN : solubilité azotée (N soluble p. 100 N total)).

En appliquant un autre mode d'expression de la désamination dans lequel la teneur en azote ammoniacal de l'essai est corrigée de la valeur initiale au début de l'incubation :

$$DES_b = \frac{N_{NH_3} \text{ essai} - N_{NH_3} \text{ initial}}{N \text{ prise d'essai}} \cdot 100$$

on obtient la régression suivante :

$$DES_b = 0,68.SOLN - 1,7 \quad r = 0,77$$

Les coefficients de ces régressions étant assez faibles, il a paru intéressant de rechercher une nouvelle expression de la désamination tenant compte de la valeur énergétique de l'aliment : en effet, la synthèse d'azote microbien pendant la durée

du test correspond à une disparition d'ammoniac et conduit à une sous-estimation de la désamination, d'autant plus importante que la quantité d'énergie disponible apportée par l'aliment est élevée. Pour établir un mode de correction, il a été admis que :

- l'azote ammoniacal disparu sous l'action des microorganismes est proportionnel à la quantité de matière organique digestible (MOD) apportée dans l'essai; cette quantité est évaluée à partir de tables de valeurs nutritives (JARRIGE, 1978);
- le liquide de rumen n'apporte qu'une quantité négligeable d'énergie fermentescible; l'azote insoluble du liquide de rumen au début de l'essai ne donne pas naissance à de l'azote ammoniacal.

Ces hypothèses sont évidemment critiquables :

- la liaison entre énergie fermentescible et MOD est assez lâche et peut être variable en fonction de la nature des aliments, comme le laissent supposer les résultats publiés par JARRIGE (1978).
- une partie des microorganismes se lysant au cours de l'incubation, le liquide de rumen peut apporter une fraction non négligeable de l'azote soluble présent à la fin de l'essai.

Pour éviter d'exploiter des données de désamination provenant d'essais dans lesquels l'azote fermentescible est le facteur limitant de la fermentation, nous n'avons tenu compte que des résultats provenant d'expériences dans lesquelles la concentration finale en ammoniac dans le tube à essai était supérieure à 200 mg d'azote ammoniacal par litre.

Sur la base de ces hypothèses, la relation prend la forme :

$$DES_c = \frac{NF - NL + 0,16 k \cdot MOD}{NA} \cdot 100$$

avec DES_c = désamination corrigée (N désaminé p. 100 N total);

NA = azote apporté par l'aliment (mg);

NL = azote ammoniacal apporté par le liquide de rumen au début de l'essai (mg);

NF = azote ammoniacal présent à la fin de l'essai (mg);

MOD = matière organique digestible apportée par l'aliment (mg);

k = quantité de matières azotées microbiennes ($N \times 6,25$) synthétisées (g/g MOD).

Les coefficients de corrélations obtenus entre la désamination corrigée et la solubilité azotée étant très voisins pour une large plage de valeurs de k , la relation la plus vraisemblable peut être déterminée en faisant l'hypothèse que la totalité de l'azote soluble est désaminée; c'est-à-dire que, pour un produit ayant une solubilité azotée de 100 p. 100, la désamination corrigée calculée est également de 100 p. 100. Cet ajustement est réalisé pour une valeur de k égale à 0,131 g de protéines brutes par gramme de MOD, valeur proche de celle (0,135) retenue par JARRIGE (1978), à partir d'essais *in vivo*. La relation entre désamination corrigée et solubilité azotée devient alors :

$$DES_c = 0,79 \cdot SOLN + 21 \quad r = 0,88$$

La corrélation entre désamination et solubilité azotée est améliorée lorsqu'on tient compte de l'énergie apportée par l'aliment. De plus, cette équation de régression est en parfait accord avec les essais de VÉRITÉ et JOURNET (1979) sur vaches laitières, à partir d'un mélange de colza et de soja tannés : dans leur étude, la quantité d'azote non dégradé dans le rumen est estimée à 75 p. 100 de l'azote des tourteaux tannés, dont le taux de solubilité azotée est d'environ 5 p. 100.

5. — Conclusion

Les résultats des tests que nous avons appliqués à plusieurs sources de protéines alimentaires du ruminant (solubilité azotée, désamination, dosages du formol) précisent leurs caractéristiques physicochimiques et décrivent la répartition du formol dans les produits traités. Pour l'ensemble des substrats de ces essais, l'addition de doses croissantes de formol a pour effets une augmentation de Fe et Fh, une diminution de la solubilité azotée jusqu'à une valeur limite correspondant à l'azote non protéique, une réduction de la désamination *in vitro*. Seulement 20 p. 100 environ de l'azote insoluble d'un aliment tanné sont dégradés dans le rumen *in vitro*; ce taux est de 35 p. 100 pour un aliment non traité, valeur retenue pour l'estimation des Protéines Digestibles dans l'Intestin des aliments (JARIGE, 1978).

TABLEAU 3
Quantités de formol nécessaires
pour traiter différents aliments protéiques du ruminant

Substrat	Formol ajouté	
	En p. 100 de la matière sèche	En p. 100 des protéines brutes
Tourteau de Tournesol	0,5	1,2
Tourteau d'Arachide	0,7	1,3
Fèverole.	0,45	1,5
Pois.	0,9	3,4
Lupin.	0,5	1,6
Protéines de lactosérum.	1,25	1,7
Tourteau de coton	0,7	1,6

Les taux de formol à appliquer, d'après nos essais, pour un traitement correct des aliments (tabl. 3) sont différents et ne dépendent pas principalement de la teneur en azote des substrats. L'absence de relation significative entre la rétention du formol et le taux protéique ou la solubilité de la fraction azotée, laisse supposer que l'aldéhyde est susceptible de réagir également avec des composés non azotés de la ration. Dans ces conditions, il paraît plus logique de définir un traitement par la quantité de formol mise en jeu en pourcentage du produit, plutôt que par rapport aux protéines brutes ou solubles du substrat. Enfin, après maturation, les aliments traités semblent assez stables. Il est donc possible, en mélangeant un substrat formolé avec un produit non traité, de réaliser pratiquement une gamme d'aliments apportant des proportions différentes d'azote soluble et de s'adapter à diverses complémentations de la ration de base du ruminant.

Reçu pour publication en septembre 1980.

Remerciements

- A J.-P. MELCION et F. de MONREDON pour la réalisation des mélanges et des essais d'agglomération.
- Au Laboratoire de Technologie Laitière (I.N.R.A. - Rennes), pour la préparation des protéines de lactosérum.
- A la D.G.R.S.T. (contrat 78.7.0471), qui a contribué au financement de cette recherche.

Summary

Formaldehyde treatment of dietary proteins for ruminants

II. — *Effect of formaldehyde level and of other treatments on nitrogen solubility and in vitro deamination*

7 protein-rich feeds (pea, fababean and lupine seeds, groundnut meal, sunflower meal, cotton seed meal, whey protein concentrate) were treated with increasing amounts of formaldehyde (F). Extractible formaldehyde (Fe) or formaldehyde released after hydrolysis (Fh), nitrogen solubility and « *in vitro* » deamination were determined. Linear relationships are obtained between the amount of added formaldehyde (F) and Fe or Fh. Regression coefficients are significantly different between feeds ($P < 0.01$). Ratios Fh/F range from 0.68 (lupin) to 0.92 (pea). However, no obvious relationships are found between protein level or solubility and Fe or Fh. Nitrogen solubility is closely related with *in vitro* deamination ($r = 0.88$), when taking into account estimated organic matter digestibility and its effect on ammonia consumption by the microorganisms *in vitro*. Only 20 p. 100 of insoluble nitrogen in the treated product are apparently degraded in the rumen. By steam treatment before pelleting, a release of formaldehyde and an increased nitrogen solubility are observed. In presence of formaldehyde-treated rapeseed or soyabean meal, untreated feeds are not noticeably modified.

Références bibliographiques

- AMOS H. E., BURDICK D., HUBER T. L., 1974. Effect of formaldehyde treatment of sunflower and soybean meals on nitrogen balance in lambs. *J. anim. Sci.*, **38**, 702-707.
- BLASS J., BIZZINI B., RAYNAUD M., 1967. Étude sur le mécanisme de la détoxification des toxines protéiques par le formol. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **10**, 3957-3965.
- CAJA G., GALVEZ J. F., ARGAMENTERIA A., CIRIA J., 1977. Inhibition of ruminal deamination *in vitro* by formaldehyde treatment of sunflower seed, soyabean and fish meal: response curve to protective treatment. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2**, 267-275.
- CRAWFORD R. J., HOOVER W. H., SNIFFEN C. J., CROOKER B. A., 1978. Degradation of feedstuff nitrogen in the rumen vs nitrogen solubility in three solvents. *J. Anim. Sci.*, **46**, 1768-1775.
- CROOKE W. M., SIMPSON W. E., 1971. Determination of ammonium in Kjeldahl digests of crops by an automated procedure. *J. Sci. Fd. Agric.*, **22**, 9-10.
- DELORT-LAVAL J., LEROY F., ZELTER S. Z., 1972. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne au niveau du rumen. III. — Effet du tannage de la protéine de lait sur son devenir dans le rumen et son efficacité métabolique chez le mouton adulte à l'entretien. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **12**, 179-185.
- DELORT-LAVAL J., 1980. Les protéines tannées industrielles dans l'alimentation du ruminant. *Bull. Techn. Infor.*, **340**, 265-281.
- FAICHNEY G. J., WESTON R. H., 1971. Digestion by ruminant lambs of a diet containing formaldehyde-treated casein. *Austr. J. Agric. Res.*, **23**, 859-860.
- FAICHNEY G. J., 1972. Digestion of concentrate diets containing formaldehyde-treated peanut meal. *Austr. J. Agric. Res.*, **23**, 859-869.
- FERGUSON K. A., HEMSLEY J. A., REIS P. J., 1967. The effect of protecting dietary proteins from microbial degradation in the rumen. *Austr. J. Sci.*, **30**, 215-217.
- FRAENKEL-CONRAT H., OLCOTT H. S., 1948a. The reaction of formaldehyde with proteins. V. — Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 2673-2684.

- FRAENKEL-CONRAT H., OLCOTT H. S., 1948b. Reaction of formaldehyde with proteins. VI. — Cross-linking of amino groups with phenol, imidazole or indole groups. *J. Biol. Chem.*, **174**, 827-843.
- FRENCH O., EDSALL J. T., 1945. The reaction of formaldehyde with amino-acids and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, **2**, 277-355.
- JARRIGE R., 1978. *Alimentation des ruminants*. Publications I.N.R.A. Éd. Versailles, 597 p.
- KUMARESAN A., 1976. *Interactions entre le zinc et les microorganismes du rumen chez le mouton recevant de l'urée comme source unique d'azote*. Thèse de Docteur d'Université, Université Paul SABATIER, Toulouse (Sciences), 96 p.
- MAC DOUGALL E. I., 1948. Studies on ruminant saliva. I. — The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.*, **43**, 99-109.
- MELCION J. P., DELORT-LAVAL J., 1977. Effet des liants sur la production, les caractéristiques physiques et la valeur nutritive des aliments agglomérés. *Bull. Anci. Elev. Ecole Meun.*, **279**, 148-164.
- MILLER E. L., 1972. The digestion of formaldehyde treated groundnut meal before and after the abomasum of lambs. *Proc. Nutr. Soc.*, **31**, 27 A.
- MILLS S., SHARRY L. F., COOK L. I., SCOTT T. W., 1972. Metabolism of C₁₄ formaldehyde when fed to ruminants in an aldehyde-casein oil complex. *Austr. J. Biol. Sci.*, **25**, 807-816.
- NIMRICK K., PETER A. P., HATFIELD E. E., 1972. Aldehyde-treated fish and soybean meal as dietary supplements for growing lambs. *J. Anim. Sci.*, **34**, 488-490.
- NISHIMUTA J. F., ELY D. G., BOLING J. A., 1974. Ruminant bypass of dietary soybean protein treated with heat, formalin and tannic acid. *J. Anim. Sci.*, **39**, 952-957.
- PELLETIER G., BOUCHARD R., 1978. Evaluation de la fièvre et du poids traités ou non traités au formaldéhyde comme source de protéines pour la vache laitière. *Can. J. Anim. Sci.*, **58**, 659-669.
- PETER A. P., HATFIELD E., OWENS F. N., GARRIGUS V. S., 1971. Effect of aldehyde treatments of soybean meal on *in vitro* ammonia release, solubility and lamb performance. *J. Nutr.*, **101**, 605-622.
- RODRIGUEZ D., MULLER L. D., SCHINGOETHE D. J., 1974. Formaldehyde treated whey protein concentrate for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, **57**, 634 (abstract).
- ROFF W. J., 1958. In WALKER J. F., 1964. Formaldehyde. *op. cit.*, p. 274.
- SHARMA H. R., INGALLS J. R., PARKER R. J., 1974. Effects of treating rapeseed meal and casein with formaldehyde on the flow of nutrients through the gastrointestinal tract of fistulated holstein steers. *Can. J. Anim. Sci.*, **54**, 305-313.
- STOBBS T. H., MINSON D. J., McLEOD M. N., 1977. The response of dairy cows grazing a nitrogen fertilized grass pasture to a supplement of protected casein. *J. Agric. Sci. Camb.*, **89**, 137-141.
- THOMAS E., TRENKLE A., BURROUGHS W., 1979. Evaluation of protective agents applied to soybean and fed to cattle. I. — Laboratory measurements. *J. Anim. Sci.*, **49**, 1337-1345.
- TISSERAND J. L., ZELTER S. Z., 1965. Essais de normalisation d'une technique de mesure de la digestion des fourrages *in vitro* « Rumen artificiel ». *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 101-111.
- TOME D., BERTRAND D., VIROBEN G., DELORT-LAVAL J., 1979. Tannage par le formol des aliments protéiques du ruminant. I. — Étude préliminaire du mode d'action du formol sur un substrat protéique modèle. *Ann. Technol. agric.*, **28**, 299-318.
- VÉRITÉ R., PONCET C., CHABI S., PION R., 1977. Utilisation des tourteaux traités au formol par les vaches laitières. I. — Aspects digestifs. *Ann. Zootechn.*, **25**, 167-181.
- VÉRITÉ R., JOURNET M., 1979. Les tourteaux tannés dans l'alimentation des vaches laitières. In « *Les protéines tannées : premier bilan d'utilisation* », 21-44, Cycle approfondi d'alimentation animale, INA-Paris Grignon, éd. Paris.
- VÉRITÉ R., JOURNET M., JARRIGE R., 1979. A new system for the protein feeding of ruminants: the P.D.I. system. *Livestock Prod. Sci.*, **6**, 349-367.
- WACHIRA J. D., SATTAR L. D., BROOKE G. P., POPE A. L., 1974. Evaluation of formaldehyde treated protein for growing lambs and lactating cows. *J. Anim. Sci.*, **39**, 796-807.
- WALKER J. F., 1964. *Formaldehyde*. ROBERT E. KRIEGER Pub., HUNTINGTON, New-York, 701 p.
- WILLIAMS A. P., SMITH R. H., 1975. Nitrogen metabolism in calves. Effect of giving different amounts of dietary casein with and without formaldehyde treatments. *Br. J. Nutr.*, **36**, 199-209.
- ZELTER S. L., LEROY F., TISSIER J. P., 1970. Protection des protéines alimentaires contre la désamination bactérienne dans le rumen. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **10**, 111-122.