LA CONSERVATION PAR ENSILAGE D'UNE LUZERNE EN VERT

I. — ACTION PROTECTRICE COMPARÉE DE LA SOLUTION A. I. V., DU MÉTABISULFITE DE SODIUM ET DU MÉLANGE FORMIATE DE CALCIUM-NITRITE DE SODIUM

PAR

S. Z. ZELTER et Michèle SALOMON⁽¹⁾

Laboratoire de recherches de Zootechnie,
Institut national Agronomique, Paris.

PLAN DU MÉMOIRE

Position du problème.

Matériel et méthode expérimentale.

Résultats et interprétation.

A. — Effets sur les pertes de substance nutritive et sur la qualité de l'ensilage.

B. — Effets sur le processus protéolytique.

Résumé et conclusions.

POSITION DU PROBLÈME

On connaît l'intérêt fondamental qu'offre, pour l'alimentation hivernale du bétail, la conservation des fourrages verts par voie fermentaire. Avec ce procédé, la réussite du processus de la fermentation naturelle est incontestablement sous la dépendance d'un démarrage prompt et prédominant de l'acidification lactique spontanée. Mais celle-ci est tributaire des réserves glucidiques solubles présentes dans le fourrage et de leur nature (1). Cela explique l'absence à ce jour d'une solution vraiment satisfaisante, appropriée à l'ensilage de plantes fourragères dont le contenu en sucres fermentescibles en acide lactique est par trop faible et très rapidement épuisé par les *Stréptobactérium* et *Lactobacillus*. Dans

(1) Avec la collaboration technique de : M. NAVILLE, C. DUMAY, J. LABORIE et B. DUPONT.

le cas de la luzerne, notamment, le problème revêt un aspect plus complexe : une tige creuse, peu malléable, qui rend pratiquement irréalisable une anaérobiose correcte dans l'enceinte du silo, et une teneur excessive en ions Ca^{++} , constituent un écueil important pour l'orientation favorable des processus enzymatiques tant végétaux que bactériens dans la masse ; par sa richesse protidique celle-ci se trouve de plus vulnérable aux dégradations protéolytiques et putréfiantes. Ces dernières, dont les conséquences sont préjudiciables au consommateur animal et à ses produits, ne peuvent être entravées efficacement par un simple hachage ou laceration des tissus végétaux (1 ; 2 ; 3 ; 4).

A la suite des premiers travaux de VIRTANEN (5 ; 6) on sait que l'adjonction d'acides forts exerce une action inhibitrice susceptible de réduire notablement les activités bactériennes compromettantes (*Clostridia butyrica*, *Coli aéroènes*).

Mais plus récemment, l'idée d'un recours à des substances bactériostatiques a été formulée ; l'attention de certains chercheurs s'est arrêtée sur deux de celles-ci qui présentent l'avantage incontestable de pouvoir être appliquées en saupoudrage, et être d'un coût modique.

SCHARRER et coll. (14 ; 15) ont obtenu de très bons résultats avec le « Kofa » (20 parties de formiate de Ca + 3 parties de NaNO_2) dont l'emploi a été suggéré par PFEIFER (16) ; d'autres ont néanmoins enregistré des échecs (17) ou considèrent cette drogue moins efficace que le hachage (18) et le préfanage (19). Dans ce produit, les propriétés bactéricides de NO libéré agissent dans une première phase ; par la suite, c'est l'intervention bénéfique de H-COOH naissant à partir du formiate qui contrôlerait le processus fermentaire.

Des chercheurs américains attribuent au métabisulfite de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) un important pouvoir inhibiteur de la protéolyse et de la fermentation butyrique (20 ; 21 ; 22 ; 23) sans gêne pour la fermentation lactique. Il est rapporté (24) pour une herbe riche en matière sèche, des pertes en sucres inférieures en présence de ce produit, qu'en l'absence de tout adjuvant ; dans un fourrage à humidité très élevée, la drogue protégerait mieux que la mélasse contre les déperditions de matières protidiques et d'extractifs glucidiques.

Dans le métabisulfite, ce serait l'ion SO_2^- et non celui de H^+ comme dans la solution A. I. V., qui exercerait l'action de préservation recherchée. Cela expliquerait la bonne qualité des ensilages obtenus avec le premier de ces procédés, et ce, malgré des valeurs de pH nettement supérieures à 4,0.

MURDOCH et coll. (25) constatent cependant le manque d'action favorable du métabisulfite sur la fermentation lactique, et un freinage sensible de la formation d'acides gras de courte chaîne (butyrique notamment) et de bases volatiles dans des ensilages riches en azote. Cette

constatation est à rapprocher de l'opinion de BATEMANN et coll. (26) affirmant qu'au sein d'une herbe ensilée, la substitution d'une population productive d'acide lactique à la microflore protéolytique s'effectuerait plus lentement en présence de métabisulfite qu'en celle de mélasse (incorporée à l'état de pulpes mélassées) ou en l'absence de quelconque substance préservatrice.

Il ressort de cet aperçu que :

— d'une manière générale l'efficacité du « Kofa » et du métabisulfite a été étudiée comparativement à l'absence de tout traitement préalable autre que lacération ou préfanage ; or, de l'avis de la plupart des auteurs, cette façon de conserver un fourrage par voie fermentaire est rarement couronnée de succès dans le cas de la luzerne, dont la carence en précurseurs d'acide lactique est notoire ;

— la valeur effective du « Kofa » en tant qu'agent de conservation pour ensilage est controversée actuellement.

D'où notre idée de soumettre l'emploi de ces deux substances à un essai probatoire, par comparaison à une technique de référence scientifiquement éprouvée.

Sous ce rapport, la solution acidifiante A. I. V. est assurément dans l'état actuel des choses, la seule fondée sur des bases scientifiques valables et la plus efficace (4 ; 5 ; 6 ; 7 ; 9 ; 10 ; 11 ; 12 ; 13). Nous nous sommes donc référés à elle pour apprécier objectivement, au cours de cette étude expérimentale de l'ensilage de luzerne, les propriétés antifermentaires supposées du « Kofa » et du métabisulfite.

MATÉRIEL ET MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

a) Matériel.

Deux expériences successives ont été réalisées :

— *La première, a*, a été effectuée avec une première pousse de luzerne de 3^e année, variété Flamande, récoltée et ensilée dans la journée du 20 juin 1956 ; la plante était à un stade de développement avancé (floraison à environ 50 p. 100 et tige riche en tissus de soutien, manifestement rigide). L'ouverture des silos a eu lieu le 16 octobre suivant, soit après 118 jours de conservation ;

— *La seconde, b*, a été entreprise avec une deuxième coupe de même origine, le 9 juillet 1957 ; le fourrage abondamment pourvu d'inflorescences mais à peine fleuri, présentait une tige encore peu consolidée. Le bilan des fermentations a été établi le 9 janvier 1958 suivant, 184 jours après la mise en conserve.

L'analyse chimique de ces deux coupes (voir tableau I) fait ressortir des teneurs en matière sèche et en sucres solubles faibles et peu compa-

tibles avec un processus fermentaire sain ; cela ne pouvait qu'accroître les aléas de la conservation.

TABLEAU I

Composition chimique de la plante en g. p. 100 de produit sec.

	Substance sèche % de fourrage humide	Mat. miné- rales	Mat. orga- niques	N total	Cell. brute (W)	Cell. vraie (K)	Mat. grasse	Extr. non azoté	Glu- cides hydrol. (en glucose)	Sucres solubles totaux (en glucose)
Luzerne « a » (1956) 3 ^e année 1 ^{re} coupe.....	21,83	8,53	91,47	2,88	34,29	23,61	4,82	34,36	19,95	3,70
Luzerne « b » (1957) 4 ^e année 2 ^e coupe.....	20,76	9,18	90,02	3,55	27,96	19,36	6,47	34,52	17,24	3,50

Des quantités connues de fourrage vert non fragmenté (entre 240 et 300 kg) ont été introduites par couches de 20-30 cm d'épaisseur et fortement piétinées à pied d'homme dans des silos cylindriques étanches (en ciment armé) d'un m³ de capacité ; en fin d'expérience, le contenu de chaque silo a été pesé avec précision. Un dispositif de drainage adéquat (siphon en matière plastique fixé à la base du silo) assurait un écoulement libre et constant de l'exsudat, qui a été recueilli et pesé régulièrement (une clayette en bois placée à même le fond du silo rendait impossible le colmatage du système). Les silos remplis au maximum de leur capacité ont été protégés contre toute pénétration d'air par une bâche en chlorure de polyvinyl chargée d'une légère couche de sable ; un couvercle en bois et des parpaings en ciment maintenaient comprimée en permanence, la masse végétale sous une pression de 450 kg/m². Un toit en isorel (exp. a) ou en tôle (exp. b) mettait l'ensemble du dispositif à l'abri d'infiltrations éventuelles d'eau de pluie.

b) Conservateurs étudiés.

Le traitement de protection adopté comme référence est, comme cela a déjà été signalé précédemment, la solution A. I. V. utilisée à raison de 17 normalités A. I. V. par 100 kg de luzerne verte ; ce qui correspond à une addition de 5 litres de solution renfermant 786 grammes d'un mélange formé pondéralement de 33,2 p. 100 de HCl et de 66,8 p. 100 de SO₄H₂ purs.

A cette méthode de conservation ont été comparés en saupoudrage :

— du métabisulfite technique employé à la dose de 400 g/100 kg de luzerne ; cette dose a été adoptée sur la base des résultats rapportés par

COWAN et coll. (20, 23) montrant que des quantités plus élevées risquent d'être préjudiciables à l'appétence et n'améliorent pas les conditions qui prévalent en cours d'ensilage ;

— du « Kofa » appliqué à raison de 250 g/100 kg de vert.

Dans l'expérience « a » chaque traitement a été appliqué à un seul silo ; dans l'expérience « b » deux silos y ont été soumis afin de se faire une idée de la reproductibilité des résultats.

L'incorporation des substances protectrices dans la masse végétale, a eu lieu par petites fractions proportionnelles au poids des couches de fourrage introduites ; elle précédait le tassement.

c) Critères d'appréciation.

Pour être valable, une estimation objective de l'influence d'un agent de conservation sur le processus fermentaire de l'ensilage doit nécessairement reposer sur des critères à la fois quantitatifs et qualitatifs.

Dans la présente étude, les tests suivants ont été retenus :

- modification au cours de la conservation, de la répartition initiale des constituants usuels de la plante ;
- taux de disparition d'éléments calorigènes essentiels ;
- concentration des ensilages en divers acides organiques caractéristiques (acides gras de bas poids moléculaire, acide lactique) ;
- intensité et aspect du processus protéolytique (pour l'expérience « b » seulement).

d) Technique d'échantillonnage et d'établissement de bilans.

L'un des problèmes les plus délicats à résoudre, est l'échantillonnage correct d'une masse aussi hétérogène qu'une luzerne verte. Pour réduire au maximum l'erreur due à ce facteur, plusieurs échantillons de 5 kg de fourrage frais (3 dans l'expérience « a » et 6 dans l'expérience « b ») aussi représentatifs que possible, ont été confectionnés isolément au fur et à mesure du remplissage des silos ; après découpage aux ciseaux, des prises respectives de 1,6 kg ont été soumises à une analyse chimique détaillée (voir tableau I), après dessiccation appropriée jusqu'à poids constant.

En fin de conservation, il a été opéré des prélèvements séparés dans chaque silo à l'aide d'une sonde cylindrique étanche et tranchante, qui permet de découper une colonne d'ensilage ayant 4 cm de diamètre et une hauteur représentant l'épaisseur totale de la masse en conserve. La proximité des bords du silo étant susceptible d'exercer une influence défavorable à l'état de l'ensilage, il a été procédé, dans chaque silo, à

quatre extractions à la sonde, selon le schéma de la figure 1 afin d'éliminer le mieux possible, cette source d'erreur. 1,8 à 2,0 kg d'ensilage brut ont été ainsi prélevés par silo ; après découpage fin et homogénéisation, l'échantillon a été soumis aux divers tests analytiques retenus.

FIG. 1. — Schéma de la répartition des points de sondage dans le silo.

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

A. — EFFETS SUR LES PERTES DE MATÉRIAUX NUTRITIFS ET SUR LA QUALITÉ DE L'ENSILAGE

Une technique satisfaisante d'ensilage doit procurer un produit peu riche en métabolites finaux de fermentation et entraîner peu de pertes de substance alimentaire.

Pour juger avec la précision souhaitable le degré de protection offert par chacun des traitements à l'étude, nous nous sommes efforcés de dresser des bilans aussi exacts que possible des constituants alimentaires les plus précieux introduits, puis extraits du silo, et des concentrations en produits terminaux présents dans les ensilages.

Les quantités globales mises en conserve ont été évaluées pour chaque élément à partir d'une composition moyenne établie à l'aide des dosages effectués isolément sur les prélèvements séparés ; celles extraites ont été estimées, pour chaque silo, d'après la composition de l'échantillon découpé à la sonde dans sa masse propre.

La teneur en matière sèche a été déterminée sur un kg de fourrage brut déshydraté jusqu'à poids constant, dans un tunnel à rayonnement infra-

rouge. Sur la substance sèche ainsi obtenue, les composants calorigènes ont été dosés selon des techniques usuelles (27; 28; 29). Les bilans des pertes ont été établis d'après les résultats analytiques corrigés pour déperdition d'acides gras et de bases volatils, inévitable au cours de la dessiccation d'un ensilage (30; 31); les corrections correspondantes ont été calculées par dosage des métabolites volatils dans l'ensilage avant et après la dessiccation.

Dans le produit humide extrait du silo, ont été dosés immédiatement : les acides gras volatils d'après la technique de chromatographie de partage gaz-liquide de JAMES et MARTIN, quelque peu modifiée par nos soins (29), et l'acide lactique, par colorimétrie selon BARNETT (32).

Les exsudats recueillis journallement durant la phase de plasmolyse active, puis périodiquement, ont été mesurés et analysés.

1° Influence comparée des traitements sur les concentrations en principes calorigènes.

La confrontation de la teneur finale en matière sèche et en ses constituants dans les ensilages (tableau II) avec les concentrations initiales correspondantes dans la luzerne à l'état frais (voir tableau I), montre l'absence d'influence caractéristique du traitement sur le taux de substance organique qui n'a, pour ainsi dire, pas changé. En revanche, la répartition des composants de cette dernière a été profondément modifiée aux dépens des éléments les plus assimilables : appauvrissement marqué en glucides hydrolysables et solubles, et enrichissement simultané en principes moins digestibles. L'effet d'épargne exercé sur les premiers

TABLEAU II

Modifications des concentrations en éléments nutritifs en fonction du traitement de protection (modifications ($\pm$) exprimées en p. 100 des concentrations initiales).

Traitement	A. I. V.			Métabisulfite			Kofa		
	1a	Moy. de 1b-4b	Moy. des 2 essais	4a	Moy. de 2b-5b	Moy. des 2 essais	3a	Moy. de 3b-6b	Moy. des 2 essais
Substances sèches	- 4,4	+ 4,2	+ 0,1	+ 0,5	+ 1,9	+ 1,2	- 9,2	- 3,5	- 6,3
Substances organiques	- 0,4	- 1,4	- 0,9	- 2,8	- 2,3	- 2,5	- 2,2	- 0,9	- 1,5
Azote (Kjeldahl)	- 6,9	- 1,2	- 4,1	- 4,5	- 2,0	- 3,2	+ 14,6	+ 4,8	+ 9,7
Cellulose brute	+ 10,7	+ 1,1	+ 5,9	+ 2,0	+ 11,6	+ 6,8	+ 17,0	+ 5,9	+ 11,5
(Weende)									
Cellulose vraie (Kurschner)	+ 12,5	+ 6,4	+ 9,4	+ 11,7	+ 15,0	+ 13,3	+ 16,6	+ 8,4	+ 12,5
Extractif non azoté ..	- 18,4	- 5,6	- 12,0	- 14,2	- 15,9	- 15,0	- 38,9	- 11,5	- 25,2
Glucides hydrolysables	- 39,7	- 14,8	- 27,2	- 39,4	- 30,2	- 34,8	- 50,2	- 39,0	- 44,6
Glucides solubles									
totaux	- 80,3	- 60,5	- 70,4	- 74,6	- 79,9	- 77,3	- 97,3	- 86,0	- 91,7

varie notablement avec le traitement (fig. 2) : l'application de la solution A. I. V. de référence occasionne, en moyenne, des chutes de concentration de $-27,2$ p. 100 pour les glucides hydrolysables et de $-70,4$ p. 100 pour les sucres solubles ; en présence de métabisulfite, les baisses respectives sont plus fortes : $-34,8$ p. 100 et $-77,3$ p. 100 ; tandis que l'adjonction de « Kofa » entraîne des modifications négatives encore plus accusées : $-44,6$ p. 100 et $-91,7$ p. 100.

Comme d'autre part on constate, pour les deux derniers adjuvants, une élévation beaucoup plus forte du taux d'éléments cellulosiques

CONCENTRATIONS MOYENNES
% DES CONCENTRATIONS
INITIALES.

FIG. 2. — Modification des concentrations moyennes en éléments nutritifs.

qu'avec le premier ($+13,3$ p. 100 et $+12,5$ p. 100 contre $+9,4$ p. 100 de cellulose vraie), on est conduit à affirmer que la valeur nutritive est bien mieux sauvegardée au cours de la conservation, par la solution A. I. V. que par les deux substances bactériostatiques en question, parmi lesquelles le métabisulfite agirait plus efficacement. Il faut néanmoins noter à l'actif du « Kofa » une augmentation substantielle de la fraction azotée globale ; ce fait, apparemment curieux, sera commenté ultérieurement.

2° Action sur les pertes globales en matériaux calorigènes.

Métabisulfite et « Kofa » exercent, sans conteste, un pouvoir d'inhibiteur moindre que le procédé VIRTANEN sur l'activité dégradante de la microflore d'ensilage et des enzymes végétaux (tableaux III et IV).

TABLEAU III. — Substances nutritives disparues (pertes %) au cours du processus fermentaire d'ensilage

	A. I. V.			Métabsulfite			Kofa		
	Ia	moyenne		4a	moyenne		3a	moyenne	
		1b-4b	moyenne pondérée des 2 essais		2b-5b	moyenne pondérée des 2 essais		3b-6b	moyenne pondérée des 2 essais
Matière sèche.....	10,10	7,4 (7,7-7,2)	8,74	14,9	15,9 (14,5-17,2)	15,35	21,3	12,5 (11,3-13,7)	16,87
Matière organique.....	10,50	8,7 (9,4-8,1)	9,62	16,5	17,8 (17,2-18,4)	17,75	23,0	13,6 (13,5-13,6)	18,36
N total (Kjeldahl).....	20,10	11,0 (12,3-9,7)	15,57	21,7	20,9 (15,0-26,8)	21,27	13,6	12,3 (7,8-16,8)	12,93
Cellulose brute (Weende).....	0,50	6,4 (9,0-3,8)	3,44	12,1	6,2 (8,6-3,8)	9,13	7,9	7,3 (6,2-8,5)	7,61
Cellulose vraie (Kurschner).....	0,00	2,8 (2,2-3,4)	1,40	3,8	3,2 (13,5- 3,0)	3,50	8,5	5,2 (6,6-3,8)	6,83
E. N. A.....	26,60	12,7 (11,2-14,1)	19,64	26,0	29,2 (29,0-29,4)	22,58	51,9	22,6 (26,4-18,7)	37,25
Glucides hydrolysables.....	54,90	21,1 (22,4-19,9)	38,01	47,8	41,1 (38,5-43,8)	44,47	60,8	46,5 (46,1-47,0)	53,66
Sucres solubles totaux.....	64,80	63,3 (64,0-62,7)	63,76	78,1	82,8 (82,6-83,1)	80,44	97,8	87,8 (90,2-85,4)	92,8

TABLEAU IV

Action comparée des traitements de protection sur les pertes (résultats exprimés en % des valeurs du traitement de référence A. I. V. prises égales à 100)

	Métabsulfite			Kofa		
	Exp. a	moyenne		Exp. a	moyenne	
		Exp. b	moyenne		Exp. b	moyenne
Matière sèche.....	147,8	214,8	181,3	211,3	168,9	100,1
Matière organique.....	156,9	204,6	180,7	219,2	156,3	187,7
N total (Kjeldahl).....	107,6	190,0	148,8	67,3	111,8	80,5
Cellulose brute.....	260,8	96,8	178,8	171,5	114,1	142,8
E. N. A.....	97,6	229,9	163,7	195,2	177,9	186,5
Glucides hydrolysables.....	87,7	194,8	141,2	116,7	220,4	165,5
Sucres solubles totaux.....	121,6	130,8	126,2	152,4	138,7	145,5

Le dernier de ces traitements atténue nettement le processus de dislocation de la matière organique de la luzerne : la perte globale qui atteint — 9,62 p. 100 seulement, est peu importante et pratiquement similaire à celle enregistrée par JARL (46), HELLBERG (33), ULVESLI et coll. (8).

Les déperditions sont presque deux fois plus élevées en présence de métabisulfite ou de « Kofa », et très voisines pour ces deux drogues (17,75 p. 100 et 18,36 p. 100) ; elles ne paraissent cependant pas anormales, les pertes de matière sèche oscillant généralement, dans de bons ensilages, entre 13 et 24 p. 100 (16). Notons que COWAN et coll. (20 b ; 23) signalent pour de la luzerne traitée avec une dose de métabisulfite analogue, des pertes de matière sèche comprises entre 12,8 et 20,1 p. 100.

C'est essentiellement la fraction E. N. A. qui fait les frais du processus fermentaire ; elle constitue à elle seule, près des trois quarts des pertes globales en principes énergétiques : en moyenne 75,5 p. 100 de la matière organique totale disparue pour la solution A. I. V. — 61,7 p. 100 pour le métabisulfite et 74 p. 100 pour le « Kofa » ; la part de protides est négligeable, les valeurs correspondantes s'élevant à 5,43 p. 100, 4,31 p. 100 et 2,67 p. 100.

Après traitement avec A. I. V. il disparaît au cours de la conservation en silo 19,64 p. 100 de la masse globale d'extractifs non azotés, parmi lesquels 38,01 p. 100 des glucides hydrolysables initiaux et 63,76 p. 100 des sucres solubles totaux introduits (tableau III) ; après adjonction de métabisulfite, les valeurs respectives sont supérieures de + 63,7 p. 100, + 41,2 p. 100 et + 26,2 p. 100 ; en présence de « Kofa » elles dépassent de + 86,5 p. 100, + 66,5 p. 100 et + 45,5 p. 100 (tableau IV). Dans l'ensemble la glycolyse est nettement moins freinée par ce dernier adjuvant que par le métabisulfite ; mais les deux substances offrent une protection moindre contre la dislocation des principes les plus directement disponibles pour l'animal, que la solution A. I. V. Il est intéressant de noter d'autre part, que la cellulose vraie de la luzerne n'est pour ainsi dire pas attaquée par les microorganismes du silo (1,4 p. 100 de perte avec A. I. V., 3,5 p. 100 avec métabisulfite et 6,8 p. 100 avec « Kofa ») ; cela pourrait expliquer les concentrations relativement faibles d'acide propionique trouvées dans nos ensilages expérimentaux (tableau VI).

Les pertes relatives de protides s'élèvent à 15,57 p. 100 avec le traitement témoin (A. I. V.) qui, d'après CRASEMANN (34) peut épargner 97 à 75 p. 100 des réserves azotées d'un fourrage mis en conserve ; notre résultat paraît par conséquent très satisfaisant ; avec le métabisulfite, il en disparaît 21,27 p. 100, soit 48,8 p. 100 de plus ; COWAN et coll. (20 b ; 23) enregistrent également pour de la luzerne conservée avec une dose identique de produit, entre 18,4 et 30,8 p. 100 de pertes suivant la coupe et l'année d'expérience.

En présence de « Kofa », les pertes sont moins substantielles : 12,93

p.100 soit donc de — 10,5 p. 100 inférieures à celles observées avec la solution A. I. V. ; on verra plus loin que ce phénomène est imputable pour une bonne part, à une élimination d'azote plus faible dans l'exsudat cellulaire évacué (voir tableau V).

TABLEAU V

*Perte d'éléments nutritifs due à l'écoulement des exsudats de la plasmolyse.
(Essai « b » 1957).*

Traitement	Quantité de jus écoulé		Perte % de substance ensilée			Perte % de substance disparue globalement au cours de la conservation		
	absolue (kg)	relative % de poids de fourrage ensilé	mat. sèche	mat. organique	N Kjeldahl	mat. sèche	mat. organique	N Kjeldahl
A.I.V.	41,9	14,0	3,6	2,9	3,4	48,1	33,3	32,0
Métabisulfite	38,6	12,8	5,2	4,4	8,6	32,9	24,8	22,1
Kofa	21,0	7,0	2,3	2,0	2,0	18,2	14,7	28,5

Ce dernier constitue d'ailleurs, un facteur non négligeable de lessivage de substance alimentaire précieuse (la majeure partie étant cons-

FIG. 3. — Cadence et quantité de sève émise.

tituée probablement par des polysaccharides, acides organiques et formes azotées solubles). Le tableau V qui rapporte les mesures faites au cours de l'expérience « b » (1957) le montre clairement.

D'après ces données, près de la moitié des pertes de matière sèche et d'un tiers de matières organique et azotée sont occasionnées par le seul drainage, dans le cas du traitement A. I. V. ; l'intervention de ce facteur

semble avoir été bien moindre en présence de métabisulfite et surtout de « Kofa ». Cela laisse supposer un processus fermentaire gazogène plus intense, et par voie de conséquence, une combustion d'éléments calorigènes plus importante en présence de ces deux drogues bactériostatiques. Le volume et plus spécialement la cadence de libération de la sève cellulaire et interstitielle (fig. 3) témoignent d'une activité respiratoire des tissus végétaux plus lente et moins durable en présence de la solution A. I. V. qu'en celle des autres traitements ; cela explique les déperditions peu élevées de principes alimentaires dans l'ensilage A. I. V. ; quant à la perte protidique plus restreinte observée après adjonction de « Kofa », elle est sans doute la conséquence à la fois du faible volume de l'effluent correspondant et de la basse teneur de celui-ci en azote.

3^o Incidences sur la qualité de l'ensilage.

Les données rapportées dans les tableaux VI et VII permettent d'affirmer la qualité bien réussie des ensilages de l'expérience « b » ; celle obtenue au cours de l'essai « a » paraît, par contre, nettement moins bonne.

En effet, la teneur de ces derniers ensilages en acide butyrique est exagérée ; elle témoigne sans conteste d'une orientation défectueuse des processus biochimiques, même dans le cas d'une adjonction d'acides minéraux forts (A. I. V.) dont le pouvoir d'inhibition sur l'activité des *Clostridia* est pourtant universellement admis. Ce phénomène aberrant est imputable à des infiltrations d'eau de pluie à travers la couverture en isorel qui n'a pas résisté aux intempéries exceptionnelles du mois d'août 1956. Il en est résulté une activité excessive de *Clostridia* et de protéolytiques qui explique également les concentrations restreintes d'acide lactique observées dans ces ensilages.

TABLEAU VI

*Acides organiques apparus en fin de conservation
(en g p. 1 000 d'ensilage humide).*

Traitement	A. I. V.			Métabisulfite			Kofa		
Essai	1a	1b	4b	4a	2b	5b	3a	3b	6b
Acide acétique	6,25	7,73	7,27	6,41	9,38	9,15	9,45	10,65	10,12
Acide propionique	0,87	0,37	0,18	1,06	0,37	0,65	1,93	0,37	0,63
Acide butyrique	5,05	0,88	2,42	4,82	1,70	5,62	8,26	0,33	1,32
Acide valérianique	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Acides volatils totaux	12,17	8,98	9,87	12,29	11,51	15,42	19,64	11,35	12,07
Acide lactique	2,10	3,84	3,86	1,33	4,64	3,00	0,48	6,04	5,78
Acides organiques									
Totaux	14,27	12,82	13,73	13,62	16,15	18,42	20,12	17,39	17,85
pH	4,9	4,55	4,62	5,9	5,30	5,35	6,11	5,30	5,40

Quoi qu'il en soit, il semble certain à la lumière de ces résultats que dans des conditions de milieu défavorables, le « Kofa » offre une protection moins satisfaisante contre la déviation des fermentations que l'A. I. V. ou le métabisulfite.

L'influence comparée des trois procédés de protection sur la qualité se dégage avec plus de clarté si l'on rapporte les concentrations millimoléculaires des divers produits terminaux à la teneur en matière sèche (tableau VII) d'une part, et aux valeurs du traitement de référence A. I. V. d'autre part (tableau VIII).

Un premier fait se dégage de l'examen attentif des résultats d'ensemble concernant le traitement de référence (A. I. V.) : le pH de ces ensilages est anormalement élevé ; il est vraisemblable que la cause en soit l'insuffisance de la dose de solution acidifiante employée (17 normalités pour 100 kg de vert) ; celle-ci bien que supérieure à la quantité indiquée par l'auteur du procédé, n'a pas permis d'abaisser la concentration en ions H^+ de la luzerne mise en silo au niveau du pH 4,0-3,5 qui selon VIRTANEN est seul en mesure d'assurer un contrôle satisfaisant du processus fermentaire.

Par ailleurs, l'intensité de ce dernier a toutefois été remarquablement freinée par l'acidification préalable, les concentrations globales d'acides gras volatils formées au cours de la conservation étant réduites principalement dans l'essai « b » : la teneur en acide butyrique est très petite, tandis que l'acétogénèse se maintient dans des limites convenables et que le taux d'acide lactique est également faible (10,8 à 18,8 millimol. p. 100 m. s.) ; la présence de petites doses seulement d'acide propionique et l'absence totale d'acides gras supérieurs à C_4 (valérianique par ex.) est également un indice que l'ensilage A. I. V. est de bonne qualité (35). La basse concentration en métabolites terminaux de fermentation est d'ailleurs en rapport avec les faibles pertes de substrats glucidique et azoté enregistrées (tableau III) pour cet ensilage.

Globalement, ces faits ne font que confirmer les parfaites propriétés préservatrices du procédé A. I. V. pour la conservation des fourrages particulièrement altérables, telle une luzerne possédant un taux d'humidité au-dessous de l'optimum compatible avec un processus correct d'ensilage.

La confrontation de ces observations avec les données fournies par le métabisulfite et le « Kofa », fait constater qu'à la suite d'une adjonction de :

1° MÉTABISULFITE DE SODIUM : l'acétogénèse reste correcte et peu différente dans son ensemble (+ 11,5 p. 100 en moyenne) par rapport à l'A. I. V. ; les quantités d'acide butyrique apparues, bien que très variables au cours d'un seul et même essai (b) dépassent en moyenne de + 21,4 p. 100 celles du traitement de référence ; elles sont certes quelque peu élevées

TABLEAU VII

Concentration des ensilages en acides organiques de fermentation (résultats exprimés en millimolécules % de substance sèche).

	A. I. V.			Métabisulfite			Kofa		
	1 a	Moyenne des 2 essais		4 a	Moyenne de 2 b — 5 b		3 a	Moyenne de 3 b — 6 b	
Acide acétique.....	48,2	54,2 (54,9-53,3)	51,1	46,6	67,4 (69,2-65,6)	57,0	76,0	76,5 (84,2-68,8)	76,3
Acide propionique.....	5,4	1,6 (2,1- 1,1)	3,5	6,2	3,0 (2,2- 3,8)	4,6	12,6	3,1 (2,4- 3,8)	6,3
Acide butyrique.....	26,5	8,2 (4,2-12,1)	17,3	23,9	18,1 (8,8-27,4)	21,0	45,2	4,3 (1,8- 6,8)	24,2
Acide valériannique.....	0,0	0,0 (0,0- 0,0)	0,0	0,0	0,0 (0,0- 0,0)	0,0	0,0	0,0 (0,0- 0,0)	0,0
Acides gras volatils totaux.....	80,1	64,0	71,9	76,7	88,5	82,6	133,8	83,9	106,8
Acide lactique total...	10,8	18,5 (18,2-18,8)	14,7	6,4	18,6 (22,8-14,3)	12,5	2,6	30,4 (31,9-29,0)	16,5

TABLEAU VIII

Incidences comparées du Métabisulfite et du « Kofa » par rapport à la solution A. I. V., sur la qualité de l'ensilage (les valeurs de l'ensilage A. I. V. sont considérées égales à 100).

	A. I. V.			Métabisulfite			Kofa		
	exp. a	moyenne		exp. a	moyenne		exp. a	moyenne	
Acide acétique...	100	100	100	96,7	124,3	111,5	157,7	141,1	149,3
Acidepropionique	100	100	100	114,8	187,5	131,4	233,3	193,7	180,0
Acide butyrique..	100	100	100	90,2	226,7	121,4	170,6	52,4	139,9
Acidevalériannique	néant	néant	néant	néant	néant	néant	néant	néant	néant
Acide gras volatils totaux....	100	100	100	95,7	138,3	114,9	167,0	131,1	148,5
Acide lactique....	100	100	100	59,2	100,0	85,0	24,1	206,8	112,2

si l'on admet comme d'autres auteurs (13; 8) qu'une teneur de 5 grammes d'acide butyrique pour mille de produit humide constitue un résultat négatif, tandis qu'un ensilage en dosant moins d'un gramme est parfaitement réussi. Le taux d'acides volatils totaux ne dépasse que de peu (+ 14,9 p. 100) les valeurs de référence ; celui d'acide lactique leur est inférieur d'environ autant (— 15 p. 100 en moyenne).

En gros, le métabisulfite de sodium manifeste un pouvoir inhibiteur d'acides gras volatils et d'acide lactique, similaire à celui de la solution acide A. I. V. tout en fournissant un ensilage de pH beaucoup plus élevé (5,9-5,3) ; il ne favorise point la fermentation lactique, contrairement à ce qui a été prétendu par certains (21 ; 22) ; ce qui justifie l'opinion formulée par MURDOCH et coll. (25).

Les pertes plus importantes de matériaux nutritifs constatées avec cette drogue (tableau III) s'expliqueraient par conséquent par une activité enzymatique végétale gazogène plus prolongée, comme semble l'indiquer la plasmolyse plus tardive et très étale (fig. 3), et aussi par l'élimination d'un exsudat plasmatique plus riche (tableau V).

2° KOFA : l'acétogénèse et la fermentation lactique sont sensiblement plus intenses qu'avec les deux autres traitements ; le second phénomène est particulièrement apparent dans la deuxième expérience (*b*) ; ce sel bactériostatique ne diminuerait pas outre mesure l'activité souhaitable de la microflore lactoformatrice comme les deux autres agents de conservation. Un autre fait à noter : la teneur en acide butyrique qui est de 70,6 p. 100 supérieure à celle de l'ensilage A. I. V. dans l'essai (*a*), par suite de l'infiltration accidentelle d'eau qui a été signalée, ne représente plus que 52,4 p. 100 de la valeur de référence dans le second essai (*b*) où elle oscille entre 0,33 et 1,32 g par kg d'ensilage humide (tableau VI). Ce taux est très faible et proche de celui observé par d'autres (8). Il n'en reste pas moins que les quantités globales d'acides gras de bas poids moléculaire présentes dans les ensilages au « Kofa » sont, dans les deux épreuves de beaucoup supérieures à celles du fourrage traité à l'A. I. V. (+ 67 p. 100 et + 31,1 p. 100,) et les dépassent en moyenne de + 48,5 p. 100 (tableaux VII et VIII). Il est donc probable que le processus fermentaire plus prononcé et la plasmolyse tardive et limitée (fig. 3 et tableau V), qui témoignent d'une vie cellulaire durable dans le fourrage traité avec ce produit, soient à l'origine du gaspillage plus grand de substrat calorigène enregistré avec le « Kofa » (tableau III).

Bien que muni de propriétés bactériostatiques appréciables envers les microorganismes butyrogènes, cet agent de conservation agirait moins contre l'activité enzymatique propre à la cellule végétale, tout au moins dans le cas où l'anaérobiose est imparfaite (fait courant pour des ensilages de luzerne) ; or, cette activité s'effectue essentiellement aux dépens des principes énergétiques les plus immédiatement disponibles (polysaccha-

rides solubles) et les plus précieux du point de vue alimentaire. Dans l'ensemble, le « Kofa » constitue certainement un adjuvant améliorateur de la conservation en silo, mais son efficacité est sans doute moindre que celle du métabisulfite et surtout du procédé A. I. V.

B. — EFFETS SUR LE PROCESSUS PROTÉOLYTIQUE

Des renseignements, concernant l'influence des divers types de substances protectrices préconisées dernièrement pour l'ensilage, sur l'intensité et l'orientation de la dégradation protidique d'un fourrage aussi difficile à conserver que la luzerne, sont rares. L'aspect de la protéolyse constitue cependant l'un des critères les plus valables dans l'appréciation de l'efficacité d'un traitement de conservation, étant donné l'importance nutritionnelle capitale attribuée à l'état de la fraction azotée dans un aliment du bétail. C'est ce phénomène que nous avons exploré au cours de l'expérience « b » (1957), afin de déterminer l'action comparée des trois traitements à l'étude.

Pour avoir une idée aussi complète que possible des modifications des constituants azotés de la luzerne au cours de l'ensilage sous l'effet des substances ajoutées, nous avons déterminé, avant et après conservation, les concentrations et les répartitions de diverses formes azotées présentes.

A la mise en silo, les dosages nécessaires ont été effectués selon la technique de FAUCONNEAU (36) sur un échantillon moyen de luzerne verte lyophilisée. En fin de conservation, il a été procédé comme suit aux analyses des échantillons prélevés à la sonde selon la technique déjà décrite :

a) Extraction de l'azote soluble.

Des dosages de comparaison nous ont conduits à adopter la procédure ci-après qui nous a paru assurer une extraction correcte de N soluble : une prise de 200 g de tissu végétal brut, finement découpé, a été soumise à une cytolysse cellulaire de 30 minutes par macération dans de l'éther éthylique ; le fourrage a été ensuite pressuré à la presse médicale dans une gaze de mousseline (4 épaisseurs) ; après lavage et décantation des extraits éthérés, la phase aqueuse a été recueillie dans une fiole jaugée ; le résidu a été broyé 3 fois pendant 3 minutes au blender avec de l'alcool à 80° réfrigéré, et pressé chaque fois comme indiqué.

Tous les extraits ont été filtrés sur gaze, réunis, et ramenés à un volume connu (entre 1 000 et 1 200 cc). Les déterminations de diverses fractions de l'azote soluble ont été faites sur des prises aliquotes de l'extrait total.

b) Dosage de N protéique total.

L'azote insoluble du résidu d'extraction a été dosé selon la micro-méthode de KJELDAHL, après une minéralisation de huit heures en pré-

FIG. 4. — Chromatographie bidimensionnelle sur papier des acides aminés et amides libres d'un Ensilage A. I. V.

sence du catalyseur de DUMAZERT et MARCELET (37). L'azote protéique solubilisé au cours de l'extraction et précipitable à l'acide trichloracétique a été également dosé dans l'extrait liquide ; la somme de ces deux déterminations représente la teneur en N protéique total.

c) Dosage dans l'extrait des composés azotés solubles non protéiques.

Ont été déterminés dans l'extrait total :

— l'azote non protéique soluble, par la technique précitée, après défalcation faite de N du précipité trichloracétique ;

FIG. 5. — Chromatographie bidimensionnelle sur papier des Acides aminés et amides libres d'un ensilage au métabisulfite.

— l'azote ammoniacal, par la méthode de microdiffusion à froid de CONWAY (38) ;

— l'azote amidé total soluble, par dosage comme ci-dessus de N ammoniacal, libéré après hydrolyse selon VICKERY et coll. (39) (déduction faite du NH_3 , initialement présent dans le milieu) ;

— *acides aminés et amides libres*, par chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 1, selon la technique de BOURDET et HERARD (40) utilisant deux systèmes solvants monophasiques ; une partie aliquote du liquide d'extraction a été concentrée sous vide, reprise par de l'acide acétique 0,02 N et dessalifiée sur colonne de résine échangeuse d'ions (DOWEX 50) avant d'être chromatographiée ;

— *N aminé total et N amidé libre*, par calcul de l'azote des acides aminés et des amides obtenues par chromatographie ;

— *N soluble indéterminé* (constitué probablement de polypeptides, amines, bêtaïnes, bases puriques, etc.) par différence.

1° Influence comparée des traitements sur l'intensité de la protéolyse.

En gros, la reproductibilité des résultats pour un seul et même traitement (excepté l'azote amidé total soluble) est satisfaisante (tableau IX).

TABLEAU IX

Intensité de la protéolyse (résultats exprimés en N p. 100 N total).

	Luzerne avant ensilage	Luzerne après ensilage avec		
		A. I. V.	Métabisulfite	« KOFA »
		(moyenne 1b-4b)	(moyenne 2b-5b)	(moyenne 3b-6b)
N-protéique	77,34	50,91 (48,09-52,82)	35,4 (36,72-34,05)	32,3 (32,09-32,47)
N-non protéique	22,66	49,09 (51,01-47,18)	64,6 (63,28-65,94)	67,7 (67,91-67,53)
N-NH ₃	1,86	9,5 (9,05-9,98)	12,96 (14,12-11,8)	15,15 (14,36-15,93)
N-amidé total soluble (après hydrolyse)	3,90	1,76 (0,96-2,57)	2,13 (2,72-1,54)	2,24 (1,53-2,95)
N-amidé libre	1,18	0,4 (0,4-0,4)	0	0
N-aminé libre	3,30	16,17 (14,80-17,54)	24,83 (23,69-25,97)	26,13 (26,32-25,94)
N-soluble indéterminé	13,60	21,66 (26,20-17,09)	24,68 (22,75-26,63)	23,2 (25,70-20,71)

Une comparaison des valeurs moyennes avant et après conservation (tableau IX), permet de constater pour l'ensilage A. I. V. une diminution de 33 p. 100 de la teneur en N protéique et un accroissement simultané de la fraction non protéique qui est passée de 22,66 à 49,09 p. 100 de N total ; 9,5 p. 100 de ce dernier (au lieu de 1,86 p. 100) se retrouvent à l'état de NH₃ ; l'azote aminé libre total a presque quintuplé, tandis que les taux de N amidé total soluble a baissé de 55 p. 100 et de N amidé libre de deux tiers ; l'indéterminé soluble a augmenté de 59,3 p. 100.

Dans l'ensemble, le traitement A. I. V. a maintenu la protéolyse dans des limites convenables, compte tenu du pH (4,58) anormalement élevé, dont la cause a déjà été signalée précédemment.

La confrontation des résultats enregistrés pour l'A. I. V. avec ceux

des deux autres traitements (tableaux IX et X) fait ressortir des phénomènes protéolytiques nettement plus accentués en présence, soit de métabisulfite, soit de « Kofa ».

TABLEAU X

Effet du métabisulfite et du « Kofa » (valeurs exprimées en p. 100 des valeurs du traitement de référence A. I. V. prises = 100).

	Métabisulfite	Kofa
N-protéique	68,4	62
N-non protéique	131,6	138
N-NH ₃	136,4	159,5
N-amidé total soluble après hydrolyse	121	127,3
N-amidé libre	néant	néant
N-aminé libre	153,6	161,6
N-soluble indéterminé	114	111,6

On note, en particulier, la disparition complète de l'azote amidé libre transformé vraisemblablement en ammoniac. Exception faite de l'intensité de l'ammoniogenèse, plus marquée dans le cas du « Kofa », on observe peu de différences par ailleurs dans l'action des deux substances bactériostatiques. Cette dislocation plus importante des protéines pourrait s'expliquer par une concentration en ions H⁺ beaucoup plus faible dans ces ensilages (pH = 5,32-5,35) que dans celui de l'A. I. V. (pH = 4,58). On sait, en effet, que le processus de protéolyse est en relation directe avec cette concentration (5a ; 41).

2° Action sur l'orientation de la protéolyse.

a) Orientation globale.

En gros, l'orientation de la dégradation protidique diffère peu avec le traitement de protection (tableau XI).

TABLEAU XI

Répartition des constituants azotés solubles dans les ensilages (N p. 100 de N non protéique).

	Luzerne avant ensilage	Ensilages		
		A. I. V.	Métabisulfite	Kofa
		(moyenne 1b-4b)	(moyenne 2b-5b)	(moyenne 3b-6b)
N-NH ₃	8,2	19,4 (17,6-21,2)	20 (22,3-17,9)	22,4 (21,2-23,6)
N-amidé total soluble (après hydrolyse)	17,2	3,6 (1,8-5,4)	3,3 (4,3-2,3)	3,3 (2,3-4,3)
N-amidé libre	5,2	0,8 (0,8-0,8)	néant	néant
N-aminé libre	14,6	33,0 (30-36)	38,4 (37,4-39,4)	38,6 (38,7-38,5)
N-soluble indéterminé	60	43,2 (49,8-36,6)	38 (36-40)	35,2 (36,8-33,6)

Mais on note, pour le « Kofa » une proportion moyenne de $N-NH_3$ qui semble un peu plus élevée que pour les deux autres procédés. Par comparaison aux valeurs de référence (A. I. V.), on relève d'autre part pour cette drogue, comme pour le métabisulfite, des teneurs inférieures ($-18,5$ p. 100 et $-12,4$ p. 100) de N indéterminé soluble, et supérieures ($+16,2$ p. 100 et $+16,1$ p. 100) de N aminé libre.

L'analyse des variations des taux de N protéique et de N aminé libre au cours de la conservation indique effectivement qu'une partie importante du premier de ces constituants a été dégradée en acides aminés libres, phénomène moins intense en présence d'A. I. V. (tableau XII).

TABLEAU XII

Variation dans les ensilages des taux de N protéique et de N aminé (en p. 100 des valeurs initiales).

	Diminution de la teneur en N protéique	Accroissement de la teneur en N aminé libre	N protéique non retrouvé à l'état de N aminé libre
A. I. V.	$-26,43$ %	$+12,87$ %	$13,56$ %
Métabisulfite	$-41,94$ %	$+21,53$ %	$20,81$ %
Kofa	$-45,04$ %	$+22,83$ %	$22,21$ %

L'ensemble de ces données suggérerait que l'hydrolyse aurait été plus complète et au-delà du stade polypeptidique à la suite de l'adjonction des substances bactériostatiques expérimentées ; mais elles doivent être considérées avec réserve, les écarts observés pour un seul et même traitement étant sensibles (tableau XI).

b) **Modification de la répartition des acides aminés et amides libres.**

L'interprétation des modifications notées dans la distribution de l'azote aminé est particulièrement malaisée du fait que, dans un milieu biologique aussi complexe et instable que l'ensilage, les phénomènes de libération et de destruction d'acides aminés par des systèmes enzymatiques très actifs d'origine tant végétale que bactérienne sont concomitants.

L'analyse du contenu aminoacide des protéines de la luzerne initiale et de ses ensilages n'ayant pas été effectuée, les résultats consignés dans les tableaux XIII et XIV apportent des renseignements offrant un intérêt indicatif seulement ; en conséquence, l'absence d'un bilan biochimique complet ne permet pas de formuler des conclusions définitives quant à l'efficacité comparée des traitements étudiés.

Un fait mérite cependant d'être souligné : la présence dans les ensilages, quel que soit le conservateur ajouté, de 16 à 17 acides aminés à l'état libre ; mais la nature et le rapport intime de ces derniers diffèrent

d'une façon marquante de ceux observés dans la luzerne au moment de la mise en conserve.

L'examen approfondi de la *répartition de l'azote des acides aminés* (tableaux XIII et XIV) conduit à signaler plus spécialement :

1° L'absence totale de tryptophane à l'état libre ;

2° L'apparition de trois acides aminés libres nouveaux : phénylalanine et acide α -aminobutyrique en quantité appréciable, ainsi que de la méthionine identifiée qualitativement seulement. L'acide α -aminobutyrique proviendrait, entre autres, de la dislocation de la thréonine par certaines bactéries coliformes habituellement présentes dans les milieux d'ensilage et pourvues de systèmes enzymatiques désaminase-transaminase (42). Cette origine est surtout vraisemblable pour l'ensilage au « Kofa » dans lequel l'azote de la thréonine représentant initialement 6 p. 100 du N aminé total libre, ne figure plus qu'à l'état de traces (0,05 p. 100) en fin de conservation, tandis que N de l'acide α -aminobutyrique, inexistant au départ, s'élève parallèlement à 5,1 p. 100. La thréonine étant un peu plus épargnée par les traitements A. I. V. et métabisulfite, la proportion d'acide α -aminobutyrique présente dans ces deux types d'ensilage est plus faible d'environ 20 p. 100.

TABLEAU XIII

N-des acides aminés et amides libres exprimé en p. 100 de N total.

	Luzerne avant ensilage	Ensilages		
		A. I. V. moyenne 1b-4b	Metabisulfite moyenne 2b-5b	Kofa moyenne 3b-6b
<i>Acides aminés libres :</i>				
α -Alanine	0,65	3,21 (3,09 - 3,33)	5,40 (5,40 - 5,40)	6,71 (7,30 - 6,13)
Leucine + isoleucine ..	0,23	2,75 (2,60 - 2,91)	3,91 (3,51 - 4,31)	4,22 (4,15 - 4,29)
Méthionine*	0,00	2,13 (1,98 - 2,28)	2,78 (2,45 - 3,11)	3,32 (3,41 - 3,24)
γ -Aminobutyrique*	0,62			
Valine	0,17	1,47 (1,22 - 1,73)	2,65 (2,37 - 2,94)	2,66 (2,72 - 2,61)
Glycine	0,08	1,50 (1,35 - 1,66)	2,20 (2,26 - 2,13)	2,12 (2,06 - 2,18)
Proline	0,33	1,22 (1,18 - 1,27)	1,61 (1,39 - 1,83)	1,80 (1,67 - 1,94)
α -Aminobutyrique	0,00	0,68 (0,66 - 0,71)	1,07 (1,10 - 1,04)	1,34 (1,37 - 1,32)
Tyrosine	0,06	0,30 (0,22 - 0,37)	1,17 (1,10 - 1,24)	1,50 (1,06 - 2,04)
Phénylalanine	0,00	0,33 (0,31 - 0,35)	0,41 (0,44 - 0,38)	0,70 (0,67 - 0,72)
Sérine	0,57	0,23 (0,19 - 0,28)	0,29 (0,31 - 0,27)	0,24 (0,27 - 0,22)
Thréonine	0,20	0,25 (0,24 - 0,26)	0,43 (0,45 - 0,42)	0,015 (0,00 - 0,03)
Acide aspartique	0,06	0,00 (0,00 - 0,00)	0,13 (0,13 - 0,12)	0,00 (0,00 - 0,00)
Acide glutamique	0,08	0,32 (0,33 - 0,31)	1,03 (0,98 - 1,09)	0,28 (0,34 - 0,22)
Lysine	0,12	0,22 (0,17 - 0,27)	0,08 (0,17 - traces)	traces(traces-traces)
Arginine	0,11	1,34 (1,12 - 1,57)	1,34 (1,26 - 1,43)	0,98 (1,28 - 0,68)
Histidine		0,19 (0,15 - 0,23)	0,43 (0,64 - 0,22)	0,18 (0,21 - 0,15)
Acide cystéique	0,007	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
<i>Amides libres :</i>				
Asparagine	1,00	0,40 (0,40 - 0,40)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
Glutamine	0,18	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)

(*) Les valeurs rapportées représentent la somme Méthionine + acide γ -aminobutyrique, les deux systèmes solvants appliqués à nos ensilages n'ayant pas permis de les séparer correctement.

3° Une *destruction* totale de l'acide aspartique, sauf dans le cas du métabisulfite, où il subsiste encore à raison de 0,4 p. 100 du N aminé total, contre 1,9 p. 100 initialement. On peut relier cette constatation à l'accroissement de la part de l' α -alanine ; ce phénomène tranche plus particulièrement dans l'ensilage au « Kofa ». A noter que KEMBLE (43) signale également pour l'ensilage d'un rye-grass, une augmentation en alanine libre ; SCHARRER et RAKER (44) en trouvent de même dans divers types de luzerne ensilée des quantités globales supérieures à celles existantes dans le fourrage à la mise en silo ; une décarboxylation de l'acide aspartique par des Clostridia pourrait en être la cause selon ces auteurs.

TABLEAU XIV

N-des acides aminés libres exprimé en p. 100 de N-aminé total libre.

	Luzerne avant ensilage	Ensilages		
		A. I. V. moyenne 1b-4b	Matabisulfite moyenne 2b-5b	Kofa moyenne 3b-6b
α -Alanine	19,4	21,0 (23,0 - 19,0)	19,0 (17,0 - 21,0)	25,6 (27,7 - 23,6)
Leucine + Isoleucine ..	7,0	16,3 (16,0 - 16,6)	16,0 (15,0 - 17,0)	16,1 (15,8 - 16,5)
Méthionine*	0,0	12,5 (12,0 - 13,0)	11,1 (10,3 - 12,0)	12,7 (13,0 - 12,5)
γ -Aminobutyrique*	18,6			
Valine	5,2	9,2 (8,7 - 9,8)	10,6 (10,0 - 11,3)	10,2 (10,0 - 10,3)
Glycine	2,5	9,1 (8,7 - 9,4)	8,8 (9,5 - 8,2)	8,1 (7,8 - 8,4)
Proline	9,9	7,6 (8,0 - 7,2)	6,4 (5,8 - 7,0)	6,9 (6,3 - 7,5)
α -Aminobutyrique	0,0	4,0 (4,0 - 4,0)	4,3 (4,6 - 4,0)	5,1 (5,2 - 5,1)
Tyrosine	1,7	2,0 (1,8 - 2,1)	4,7 (4,6 - 4,7)	6,0 (4,0 - 7,9)
Phénylalanine	0,0	2,0 (2,1 - 2,0)	1,7 (1,9 - 1,5)	2,3 (1,8 - 2,8)
Sérine	17,3	1,7 (1,8 - 1,6)	1,1 (1,3 - 1,0)	1,0 (1,0 - 0,9)
Thréonine	6,0	1,6 (1,7 - 1,5)	1,7 (1,7 - 1,7)	traces (traces - 0,1)
Acide aspartique	1,9	0,0 (0,0 - 0,0)	0,4 (0,4 - 0,4)	0,0 (0,0 - 0,0)
Acide glutamique	2,6	1,9 (2,0 - 1,8)	4,1 (4,1 - 4,2)	1,1 (1,3 - 0,9)
Lysine	3,8	1,2 (1,0 - 1,5)	0,3 (0,7 - traces)	traces (traces - 0,0)
Arginine	3,4	8,2 (7,5 - 9,0)	5,4 (5,3 - 5,5)	2,6 (2,6 - 2,6)
Histidine		1,0 (1,0 - 1,1)	1,7 (2,7 - 0,8)	0,7 (0,8 - 0,6)
Acide cystéique		0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 (0,0 - 0,0)	0,0 (0,0 - 0,0)

4° Une *diminution* de proline de même ordre avec les trois traitements ; la présence d'un reste de lysine libre dans l'ensilage A. I. V. et de traces, seulement dans les deux autres types d'ensilage ; ce qui plairait en faveur d'une plus grande efficacité de l'acidification préalable (A. I. V.), qui semble inhiber davantage le mécanisme de décarboxylation de cet acide aminé essentiel conduisant à la formation d'amine (cadavérine?).

Si l'on en juge d'après la proportion initiale de N de sérine (17,3 p. 100 N aminé) on remarque qu'aucun des traitements ne l'a plus spécialement protégée.

Apparemment, le taux d'acide glutamique libre a un peu baissé dans l'ensilage A. I. V. et plus encore dans le « Kofa » ; sa teneur a, en revanche, presque doublé dans celui au métabisulfite.

5° Une *augmentation* importante des pourcentages des acides diaminés : arginine et histidine, dans les ensilages types A. I. V. et méta-

bisulfite ; dans le « Kofa » par contre, on enregistre une diminution du dernier de ces acides. Dans tous les ensilages, la libération de glycine, valine et leucines est encore plus marquée ; tandis que la tyrosine n'augmente notablement qu'avec les traitements au métabisulfite et au « Kofa ». Dans nos conditions expérimentales, il est impossible de savoir si l'intégrité de ce dernier acide aminé a été effectivement mieux protégée à son état naturel par la solution A. I. V. comme semble le suggérer le résultat rapporté par VIRTANEN (5 d), ou s'il a été libéré plus ou moins partiellement, et détruit par la suite.

En résumé, les processus de décarboxylation et de désamination apparaissent plus accentués dans l'ensilage au « Kofa » que dans ceux à l'A. I. V. et au métabisulfite ; ce dernier semblerait, d'autre part, protéger tout spécialement les acides dicarboxyliques.

Pour ce qui est de *l'azote amidé libre*, il y a lieu de signaler la disparition totale de la glutamine dans tous les ensilages (tableaux XIII et XIV), et la présence dans l'A. I. V. seulement, de 40 p. 100 de l'asparagine initiale. Ces amides ont constitué probablement l'une des sources les plus importantes de $N-NH_3$ que l'on retrouve en quantité accrue dans tous ces ensilages.

RÉSUMÉ et CONCLUSIONS

L'efficacité de deux substances bactériostatiques, métabisulfite de Na et « Kofa », pour l'ensilage de la luzerne, a été étudiée comparative-ment à celle du procédé A. I. V. adopté comme traitement de référence. L'expérience a été effectuée dans des silos cylindriques étanches et drainés, d'un m³ de capacité. Une première coupe de luzerne de variété Flamande a été mise en conserve en été 1956 (expérience « a ») et une seconde coupe en été 1957 (expérience « b ») ; 17 normalités d'acide A. I. V. ont été ajoutées par 100 kg de fourrage vert ; le métabisulfite et le « Kofa » ont été appliqués en saupoudrage aux doses respectives de 4 p. 1 000 et 2,5 p. 1 000.

Les critères retenus pour l'appréciation du degré de sécurité offert par ces agents de conservation ont été :

1° Les pertes en éléments calorigènes essentiels.

2° Les concentrations finales des ensilages en acides gras volatils et acide lactique.

3° L'intensité et l'aspect de la protéolyse (expérience « b » seulement).

Les faits suivants se dégagent des bilans dressés après 118 (exp. a) et 184 jours (exp. b) de conservation en silo :

1° Effets sur les pertes de conservation.

Les pertes de matériaux calorigènes (substance organique totale) ont été près de deux fois plus élevées après addition de métabisulfite

(— 17,75 p. 100) ou de « Kofa » (— 18,36 p. 100), qu'après adjonction de solution A. I. V. (— 9,62 p. 100). Les trois quarts environ de ces pertes proviennent de la fraction d'extractifs non azotés, tandis que les constituants protidiques n'y représentent qu'une très faible part (2,7 à 5,4 p. 100).

Les pertes globales d'azote Kjeldahl ont été en moyenne de 15,57 p. 100 pour le procédé A. I. V. contre 21,27 p. 100 pour le métabisulfite et 12,93 p. 100 pour le « Kofa » ; cette dernière valeur s'expliquerait par une élimination plus réduite d'azote dans l'exsudat de la plasmolyse.

2° Incidences sur la qualité d'ensilage.

Les remarquables propriétés préservatrices de la technique de VIRTANEN pour l'ensilage d'un fourrage particulièrement vulnérable tel que la luzerne, sont confirmées par nos résultats.

L'action inhibitrice du métabisulfite apparaît être en gros assez proche de celle de la solution acidifiante A. I. V. ; la teneur en acide butyrique a toutefois été un peu plus élevée dans l'ensilage conservé à l'aide de cette drogue (+ 21 p. 100), qui ne semble guère favoriser par ailleurs la fermentation lactique.

Le « Kofa » possède des propriétés bactériostatiques appréciables envers les microorganismes formateurs d'acide butyrique ; il semblerait même favoriser l'action des bactéries lactiques. Dans l'ensemble cependant, son efficacité paraît moins satisfaisante que celle du métabisulfite et surtout de la technique A. I. V. : par rapport à ce dernier traitement, les quantités globales d'acides gras volatils sont supérieures de + 48,5 p. 100, tandis que la teneur en acide lactique ne dépasse que de + 12,2 p. 100.

3° Effets sur le processus protéolytique.

La protéolyse a été dans son ensemble maintenue dans des limites convenables par le procédé A. I. V. Le phénomène a été nettement plus accentué avec l'adjonction de métabisulfite, et davantage encore après addition de « Kofa ».

Au cours de la conservation par la technique A. I. V., la proportion de la fraction non protéique de l'azote total est passée de 22,66 p. 100 à 48,09 p. 100 contre 64,6 p. 100 et 67,7 p. 100 après traitement au métabisulfite et au « Kofa » ; par rapport aux valeurs de référence (A. I. V.), le taux de N-NH₃ a été plus élevé de + 36,4 p. 100 après application de métabisulfite et de + 59,5 p. 100 après incorporation de « Kofa ».

Les amides libres (asparagine et glutamine) ont été détruites en totalité dans les ensilages préparés avec ces deux dernières drogues ;

cependant que dans celui conservé à l'A. I. V., il a été retrouvé de petites quantités d'asparagine libre.

Une importante libération d'acides aminés a été constatée : la présence de 17 de ces constituants, dont trois apparus en cours de conservation (phénylalanine, méthionine et α -amino-butyrique), a été notée. Certains de ces acides ont été plus ou moins détruits, en particulier dans l'ensilage au « Kofa » (lysine et thréonine par exemple).

Du point de vue général de l'orientation de la protéolyse, A. I. V. et métabisulfite semblent exercer une action protectrice similaire et plus bénéfique que le « Kofa ».

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) ZELTER (S. Z.). — Résultats en cours de publication.
- (2) MURDOCH (J. C.). — Conférence Européenne des Herbages (Paris). Projet O. E. C. E., n° 244, . 286, 1954.
- (3) MURDOCH (J. C.), BALCH (P. S.), ROLAND (F. et S. J.). — *J. Brit. Grassl. Soc.*, **10**, 135, 1955.
- (4) JARL (F.). — a) *Nord. Jordbrugsfork*, **33**, 670, 1951. — b) *Sverig. Utsädesforen Tidskv.*, **53**, 331, 1943.
- (5) VIRTANEN (A. I.). — a) *Schw. Landw. Monatsch.* **10**, 258, 1932. — b) *Emp. J. Exp. Agric.*, **1**, 143, 1933. — c) *Bull. Agric. Sci. Pract.*, **27**, 371, 1936. — d) *Proc. R. Dublin Soc.*, **3**, 311, 1947. — e) *Acta Chem. Fennica*, **6**, 13, 1933.
- (6) VIRTANEN (A. I.), KARSTROM (H.). — *C. R. Labor. Carlsberg*, **22**, 529, 1938.
- (7) WATSON (S. J.), FERGUSON (W. S.). — *J. Agric. Sci.*, **27**, 1 et 67, 1937.
- (8) ULVESLI (O.), FYRILEW (E.), BREIREM (K.). — Conf. Europ. des Herbages, Paris 1954. Projet O. E. C. E., n° 224, 279.
- (9) BROWER (E.). — *Biederm. Zentralbl. B. Tierernähr.*, **7**, 35, 1935.
- (10) STANG (V.). — *Angew. Chem.*, **49**, 757, 1936.
- (11) SPERLING. — *Angew. Chem.*, **48**, 501, 1935.
- (12) MØLGAARD (H.), THORBEC (G.). — *Beret. Forsoglab. Kobenhaven*, n° 196, **39**, 1941.
- (13) BREIREM (K.), HOMB (Th.), PRESTHEGGE (K.). — Les ensilages et l'utilisation des aliments ensilés. Projet O. E. C. E., n° 307, p. 91, 1957.
- (14) SCHARRER (K.), SCHREIBER (R.). — *Tierernähr.*, **16**, 1, 1944.
- (15) SCHARRER (K.), SCHREIBER (R.) KUHN (H.). — a) *Landw. Forsch.*, **4**, 59, 1952. — b) *Arch. Tierernähr.*, **3**, 160, 1953.
- (16) PFEIFER (G.). — *Tierernähr.*, **13**, 1, 1941.
- (17) DIJKSTRA (N. D.). — *Versl. Landbowk. Onderz.*, n° 60, 5, 1954.
- (18) MARTIN (J.), BUYSSE (F.). — *Meded. Landbowhog-en-Opozoekinst (Gent)*. a) **18**, 617, 1953. — b) **19**, 722, 1954.
- (19) ERIKSSON (S.). — *Lantbruksakad. Tidskr.*, **92**, 213, 1953.
- (20) COWAN (R. L.), BRATZLER (J. W.), SWIFT (R. W.). — a) *Prog. Rep.*, n° 99 (1953) *Pa. Agric. Exp. Stat.* — b) *Anim. Sci.*, **15**, 163, 1956.
- (21) ARCHIBALD (J. G.), KUZMESKI (J. W.). — *Dairy. Sci.*, **37**, 1283, 1955.
- (22) ALDERMAN (G.), COWAN (R. L.), SWIFT (R. W.), BRATZLER (J. W.). — *Dairy. Sci.*, **38**, 805, 1955.
- (23) COWAN (R. L.), BRATZLER (J. W.), KEEK (E. Jr), SWIFT (R. W.), ALDERMAN (G.), WASHKO (J. B.). — *An. Sci.*, **15**, 1188, 1956.

- (24) GORDON (G. H.), SHEPHERD (J. B.), WISEMAN (U. G.), MELUN (C. G.). — B. D. I. Inf. USDA, 155, 1953.
- (25) MURDOCH (J. C.), HALDSWORTH (M. C.), WOOD (M.). — *J. Brit. Grassl. Soc.*, **11**, 16, 1936.
- (26) BATEMAN (F. V.), JONES (I. R.), GILMOUR (C. M.), BEYRS (J. H.), SCHUBERT (J. R.). — *Proc. Dairy Sci.*, 105 (35th Ann. Meeting), 1954.
- (27) LEROY (A.-M.), ZELTER (S. Z.). — *Ann. Zoot.*, **3**, 402, 98, 1954.
- (28) LEROY (A.-M.), ZELTER (S. Z.), CHARLET-LERY (G.). — *Ann. Zoot.*, **6**, n° 1, 1, 1957.
- (29) ZELTER (S. Z.), LEROY (F.). — *Ann. Zoot.*, **7**, n° 3, 173, 1958.
- (30) ZELTER (S. Z.). — C. R. Journées d'Études de l'Association Française de Zootechnie sur la Conservation des Fourrages, Paris, p.220, juin 1952.
- (31) SCHOCH (W.). — Travaux de chimie aliment. et d'hygiène (Suisse), **40**, n° 3-4, 170, 1949.
- (32) BARNETT (A. J. G.). — *Bioch. J.*, **49**, n° 4, 527, 1951.
- (33) HELLBERG (A.). — *K. Lantbr. Akad. Tidskr. Stouch.*, **84**, 139, 1945.
- (34) CRASEMAN (E.). — O. E. C. E. Projet n° 307, p. 54, 1957.
- (35) BARNETT (A. J. G.), DUNCAN (R. E. B.). — *Bioch. J.*, **53**, XXX, 1953.
- (36) FAUCONNEAU (G.). — En cours de publication.
- (37) DUMAZERT (C.), MARCELET (Y.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **20**, 201, 1938.
- (38) CONWAY (E. J.). — Microdiffusion analysis and volumetric error. 1950 (Crossby London).
- (39) VICKERY (H. B.), PUCHER (G. W.), CLARK (H. E.), CHIBNALL (A. C.), WESTALL (R. G.). — *Bioch. J.*, **29**, 2710-2720, 1935.
- (40) BOURDET (A.), HERARD (J.). — *Ann. Techn.*, **7**, 177, 1958.
- (41) DE VILDT (J. C.), DE RUYTER. — *Landbouk. Rijk. Prs. grav.*, **40**, 875, 1934.
- (42) BARNETT (A. J. G.). — *Silage Fermentation*, p. 116, 1954 (London).
- (43) KEMBLE (A. R.). — *J. Sci. Fd. Agric.*, **7**, 125, 1956.
- (44) SCHARRER (K.) RAKER (K. O.). — *Tierern. u. Futterm.*, **13**, 65, 1958.

I. N. R. A.

BIBLIOTHEQUE 00 35906

DOMAINE DE CROUELLE

63039

CLERMONT-FD CEDEX 2

Le Directeur-Gérant : B. LACLAVERIE.