

# DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE LA CYSTINE APPLICATION AUX PRODUITS VÉGÉTAUX UTILISÉS DANS L'ALIMENTATION DU BÉTAIL

PAR

**Louis CHEVILLARD, Guy FAUCONNEAU et Jean ROCHE**

Laboratoire de Biochimie générale et comparée (Collège de France),  
Laboratoire de Biochimie des vitamines (École des Hautes Études)  
et laboratoire de Zootechnie de l'Institut Agronomique (I. N. R. A.)

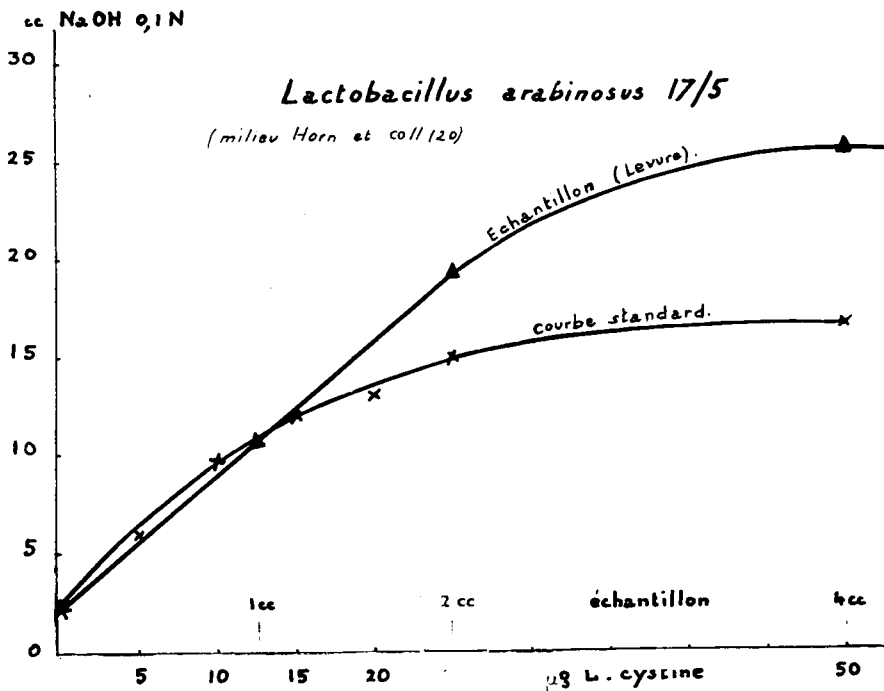
Le dosage de la cystine dans les végétaux qui constituent les principaux aliments des animaux domestiques présente deux difficultés importantes. De nombreux auteurs (18, 32, 35, 38, 40) ont signalé des pertes au cours de l'hydrolyse acide et, par ailleurs, les dosages colorimétriques de la cystine dans des milieux complexes sont d'une spécificité médiocre (6, 32). Aussi, avons-nous cherché à établir une méthode microbiologique fidèle et sensible, susceptible de s'appliquer au dosage de la cystine dans les végétaux.

## CHOIX DU MICROORGANISME

Deux microorganismes *Lactobacillus arabinosus* 17/5 et *Leuconostoc mesenteroides* P. 60 ont été mis en œuvre pour le dosage de la cystine. Les essais ont été poursuivis en titrant à la soude 0,01 N (par cc de milieu final) l'acidité libérée par l'un de ces organismes dans des conditions standardisées.

*Lactobacillus arabinosus* 17/5 (A. T. C. C. 8014). — L'emploi de *L. arabinosus* a été préconisé par de nombreux auteurs : BAUMGARTEN (5), BARTON-WRIGHT (4), MONDOLFO et CAMBONI (37), MAHADEVAN (35), HORN et coll. (27), parmi lesquels MAHADEVAN a donné des résultats numériques relatifs à une application (poils de rats et laine de mouton). Le milieu de culture de ce dernier auteur et celui de HORN et coll. (27) se sont avérés incomplets pour le dosage de la cystine dans les levures (fig. 1). La comparaison du milieu de culture préconisé par MAHADEVAN à celui de MONDOLFO et coll. (37) nous a conduits à augmenter la teneur en vitamines du groupe B ( $B_1 \times 10$ ,  $B_2 \times 5$ , PP  $\times 4$ , acide folique  $\times 2$ , 5, biotine  $\times 3$ ) pour régulariser la croissance du microorganisme. Les essais à blanc, lesquels consomment une quantité de soude importante dans la technique du premier auteur (35) (3 à 4 cc NaOH 0,04 N pour 4 cc volume total), augmentent alors encore plus, ils demeurent irréguliers malgré des lavages répétés de l'inoculum (5  $\mu$ g de cystine pour

10 cc) par centrifugation et mise en suspension dans un liquide isotonique stérile, nécessaires pour éliminer toute trace de cystine.



COURBES I.

Courbe standard du dosage de la L-cystine au moyen du *Lactobacillus arabinosus 17/5* et résultats expérimentaux obtenus sur un hydrolysate de levure. — abscisses : quantité de cystine dosée. — ordonnées : nombre de cc. de soude 0,1N utilisés pour la titration.

TABLEAU I

Résultats obtenus dans l'établissement de la courbe standard et un échantillon de levure de distillerie avec *Lactobacillus arabinosus 17/5* (milieu de HORN et coll. (20) volume final : 10 cc).

L. cystine en µg	cc NaOH <sub>0,1N</sub> employés pour le dosage	cc de l'échantillon mis en œuvre	cc NaOH <sub>0,1N</sub> employés pour le dosage
0	2,15	0	2,10
5	5,85	1	10,85
10	9,75	2	19,45
15	12,1	4	25,60
20	13,05	5	27,4
25	15,05		
50	16,7		

Les résultats obtenus, exprimés en acidité totale titrée avec de la soude 0,01 N pour 1 cc de volume total et 48 heures d'incubation, sont les suivants :

Milieu de culture	Nombre de cc NaOH 0,01 N employés pour le dosage			
MAHADEVAN.....	3,3	3,8	3,3	3,4
MAHADEVAN + B <sub>1</sub> (×10) + PP(×4) comme (20).....	4,6	4,5	3,8	3,1
MAHADEVAN + B <sub>1</sub> (×10) + B <sub>2</sub> (×5) + PP(×20) comme (25)...	7,2	7,0	7,9	6,7

*L. arabinosus* 17/5 présente donc, dans un milieu synthétique ne contenant pas de cystine, une croissance appréciable favorisée par les vitamines du groupe B. Comme les levures et d'autres produits végétaux contiennent d'assez grandes quantités de celles-ci, le dosage de la cystine à l'aide de ce microorganisme ne peut alors conduire qu'à des résultats irréguliers.

D'autres auteurs ont déjà signalé des difficultés pour sa réalisation : VELLICK et RONZONI (53) durent abandonner son emploi pour le dosage de la cystine dans plusieurs enzymes, RIESEN (42) et DUNN (16), étudiant le métabolisme de diverses bactéries lactiques ont constaté que la cystine n'est pas indispensable à la croissance de *L. arabinosus* 17/5. Cependant EVANS (19) et BARTON-WRIGHT (3, 4) ont admis que celle-ci exige la cystine au même titre que la méthionine pour être maxima. Les résultats contradictoires des divers auteurs tiennent sans doute au fait qu'EVANS (19) et BARTON-WRIGHT (3) utilisent des milieux synthétiques ne contenant que de la pyridoxine comme vitamine B<sub>6</sub>, alors que RIESEN (42) et DUNN (16) ont employé la pyridoxamine dans le même but. En effet, MARVIN (36) a observé que *L. arabinosus* n'exige pas la cystine en présence de pyridoxal ou de pyridoxamine, mais que cet acide aminé est indispensable en présence de pyridoxine, comme seule source de vitamine B<sub>6</sub>. Ainsi peut s'expliquer notre échec dans l'emploi de *L. arabinosus* pour le dosage de la cystine dans des produits contenant de la vitamine B<sub>6</sub> sous forme de pyridoxal ou de pyridoxamine, mais non la variabilité et la valeur élevée des témoins.

En résumé *L. arabinosus* n'a pas pu être utilisé pour le dosage de la cystine dans les levures et les luzernes ; il manque de spécificité en présence d'une des vitamines du groupe B en quantité susceptible d'être apportée par ces échantillons.

*Leuconostoc mesenteroides* P. 60 (A. T. C. C. 8042.) — EVANS (19), RIESEN (42), DUNN (16) et STEELE (50), en employant des milieux de culture différents montrent que la cystine est un élément indispensable à la croissance de *L. mesenteroides* P. 60. La plupart de ces auteurs ont montré la spécificité très étroite de *L. mesenteroides* pour la cystine ou la cystéine.

En effet, EVANS (19), utilisant un milieu à la pyridoxine comme vitamine B<sub>6</sub>, a observé que l'homocystéine ne peut remplacer la cystine et que la choline, additionnée de cystine et d'homocystéine, permet une croissance comparable à celle obtenue en présence de la cystine seule. Par ailleurs l'homocystéine ne peut pas remplacer la méthionine et elle ne provoque aucune croissance de *L. mesenteroides* en présence de cystine et de choline. Enfin, RIESEN (42) a établi que la L-cystine (HCl) et le glutathion (hydrolysé préalablement par HCl) ont la même action sur la croissance du *L. mesenteroides* P-60, tandis que le glutathion non hydrolysé, l'homocystéine et le thioglycolate de sodium sont à cet égard inefficaces. La D-cystine inhiberait la croissance de *L. mesenteroides* quand elle est autoclavée avec le milieu et elle aurait une faible activité quand elle est ajoutée à celui-ci après filtration. Pour MAR-

VIN (36), la cystine est un élément indispensable à la croissance de *L. mesenteroides* P. 60 quelle que soit la forme de vitamine B<sub>6</sub> apportée par le milieu. Cependant, pour HIFT et WALLACE (26), *L. mesenteroides* utilise l'homocystine comme la cystine (en la présence ou en l'absence de sérine), dans un milieu différent de ceux employés par RIESEN (42) ou par EVANS (19). Les raisons de ces résultats contradictoires paraissent devoir être recherchées dans les proportions relatives diverses de différents acides aminés et dans leurs interactions mutuelles.

Par ailleurs, selon WELLER, LUECKE et SNELL (56) seules la s.-allyl-L-cystéinesulfoxyde et L-cystinedisulfoxyde ont une faible activité sur la croissance du *L. mesenteroides* P. 60 (30 % de celle de la L-cystine). Ces faits mis en évidence en utilisant des milieux contenant de la peptone traitée par l'eau oxygénée (34), peuvent ne pas être retrouvés avec d'autres milieux ; en effet, CAMIEN et DUNN (12) ont montré que l'addition d'un hydrolysate de caséine oxydée à un milieu synthétique de base supprime la réponse de *L. arabinosus* à la D-méthionine et à la DL-méthioninesulfoxyde.

On peut conclure de cette étude théorique que la L-cystine est un élément indispensable à *L. mesenteroides* P. 60. La croissance de celui-ci est très faible dans un milieu dépourvu de cet acide aminé (essais à blanc peu élevés) STEELE (50), DUNN (16), MARVIN (36) et RIESEN (42) et sa spécificité vis-à-vis de la L-cystine est très étroite, car elle ne s'étend ni au glutathion, ni aux autres composés sulfurés étudiés, sauf à l'homocystine dans le cas du milieu de HIFT et WALLACE (26) et, dans une certaine mesure, à la cystinedisulfoxyde avec le milieu de LYMAN (12, 34).

### CHOIX DU MILIEU

D'après BRICKSON et ELVEHJEM (8) la croissance de *L. mesenteroides* est affectée par le déséquilibre provoqué par l'apport de certains acides aminés en excès, présents dans les échantillons analysés. Toutefois les concentrations nécessaires pour inhiber la croissance de ce microorganisme sont cinq fois plus grandes qu'avec *L. arabinosus*. La plupart des auteurs qui ont dosé la cystine par voie microbiologique dans des protéines pures ou dans des liquides biologiques (urine) (4, 11, 13, 22, 47, 54, 57) ont utilisé le milieu D de DUNN légèrement modifié (augmentation de la teneur en aminoacides). STEELE et SAUBERLICH (45, 50) ont mis au point un milieu de composition très différente (milieu VI). Ces auteurs étudient successivement la croissance de *L. mesenteroides* avec les 17 acides aminés indispensables à la croissance du microorganisme et ils prennent comme teneur du milieu en ceux-ci, 10 fois la quantité correspondant à la croissance maximum sauf pour la sérine (2,5 fois) et l'acide aspartique (5 fois). Ce milieu, de composition optimale pour la croissance du *L. mesenteroides*, peut être sensible aux perturbations apportées par les acides aminés de l'échantillon analysé, comme l'a montré MONDOLFO (37).

Les teneurs en vitamines B sont plus faibles que celles du milieu D de DUNN modifié dans sa teneur en acides aminés par divers auteurs (4, 11, 22, 47, 54). Or, une concentration plus élevée en vitamines du groupe B a pour effet de rendre les résultats plus réguliers et d'éviter des écarts de croissance dans des milieux légèrement différents (courbe standard et échantillon à analyser) susceptibles d'apporter des vitamines (37).

Nous avons poursuivi des essais sur le milieu D de DUNN adapté au dosage de la cystine dans l'urine (II) (principale modification : augmentation de 40 % de la teneur en acides aminés). Ce milieu ne contient pas d'acide aspartique et pas d'acide glutamique, lesquels gênent la croissance de *L. mesenteroides* pendant les premiers jours de son développement (37), car ce sont des produits de son métabolisme. Par ailleurs, la teneur en asparagine et en alanine est assez élevée ; or, SNELL a montré que l'alanine était un précurseur de la pyridoxamine et du pyridoxal et, comme nous n'employons que la pyridoxine comme vitamine B<sub>6</sub>, pareille teneur en alanine semble nécessaire.

En outre, de nombreux auteurs (11, 41, 47, 49) ont signalé des pertes variables en cystine pendant la stérilisation à l'autoclave des tubes contenant le milieu synthétique (formation de matières humiques). Pour éviter ces pertes, qui peuvent atteindre 65 % (49), nous avons utilisé la méthode de DUNN (11) (stérilisation séparée du glucose et du milieu synthétique). Nous stérilisons par ébullition à 100° (une demi-heure) les tubes contenant le milieu sans glucose et la solution standard de cystine ou les échantillons, puis nous introduisons aseptiquement, avec une pipette automatique stérile, le glucose préalablement stérilisé ; la solution de ce dernier peut, d'ailleurs, contenir l'inoculum. En outre, toutes les solutions : milieu synthétique, échantillon, solution standard de cystine, sont ajustées à pH = 6,32 au lieu de 6,80, ce qui contribue également à diminuer les pertes en cystine (11).

### MODE OPÉRATOIRE

On opère sur un volume total de 3 cc par tube : 1 cc de milieu concentré, 1 cc de solution de cystine ou d'extrait provenant de l'échantillon et 1 cc de glucose à 6 % contenant l'inoculum. Ce dernier est ajouté dans la proportion de 1 cc pour 100 cc de glucose. L'inoculum est préparé avec 3 cc d'une solution de cystine contenant 5 µg de cystine auxquels on ajoute 3 cc de milieu concentré, puis 3 cc de glucose à 6 %. Il est nécessaire que l'ensemencement de l'inoculum soit fait avec une souche de *L. mesenteroides* repiquée tous les 8 jours. Pour obtenir une bonne reproductibilité de la courbe standard, la durée d'incubation de l'inoculum doit toujours être la même : 20 heures. La durée d'incubation des tubes contenant le milieu synthétique et les solutions à analyser ou la solution de cystine doit être supérieure à 68 heures dans le cas de *L. mesenteroides* P. 60 (16). Comme le microorganisme est aérobic, les tubes doivent avoir le même diamètre intérieur (9,5 à 11,5 mm pour 3 cc

de volume total). Les corps interférant dans les échantillons agissent particulièrement sur la vitesse de croissance ; aussi utilisons-nous 70 heures environ d'incubation et titrons-nous l'acidité totale obtenue avec de la soude 0,03 N(16). Cette méthode, évitant toute perte de cystine pendant la stérilisation, est très *sensible* puisqu'elle permet d'appliquer le dosage à des échantillons contenant de 0,3 à 3  $\mu\text{g}$  de cystine ; elle est donc particulièrement adaptée aux produits végétaux, pauvres en cystine.

TABLEAU II (courbe II)

*Courbe standard obtenue avec Leuconostoc mesenteroides P. 60  
(volume final 3 cc, 70 heures d'incubation).*

Courbe standard de cystine en $\mu\text{g}$	NaOH <sub>0,03</sub> N employés pour le dosage
0	2,0
0,3	3,95
0,6	5,55
0,9	6,90
1,2	8,0
1,5	8,75
1,8	9,35
2,1	9,90
2,4	10,35
2,7	11,05
3	11,45

Chaque point est la moyenne des résultats de 2 dosages.

#### Fidélité de la méthode

La reproductibilité de la courbe standard s'est montrée satisfaisante pendant une année entière. Elle n'est d'ailleurs pas absolument nécessaire à l'exactitude du dosage, puisque l'on établit une courbe standard pour chaque essai ; mais elle contrôle la bonne conservation de la souche. La L-cystéine et la L-cystine permettent d'obtenir exactement la même courbe (cf. tableau II et courbe II).

Les dosages effectués pendant un an sur le même produit (luzerne II) ont donné les résultats suivants : 0,87, 0,88, 0,89, 0,90, 0,855, 0,89, 0,89, 0,88, 0,85, 0,89, 0,82, 0,865 mg/g de luzerne, les hydrolyses ayant été faites dans les mêmes conditions (HCl 6N, pendant 6 heures à 108° en tube scellé sous vide). La fidélité de la méthode sur un même échantillon est donc satisfaisante.

#### Précision de la méthode

L'analyse statistique des résultats (luzerne II) obtenus sur 5 concentrations (dosages en double) nous permet de définir celle-ci. Calculée en % du

maximum de la courbe standard 3  $\mu\text{g}$  nous avons successivement, pour les 5 concentrations croissantes et par cc d'hydrolysate dilué :

0,2 cc      0,4 cc      0,6 cc      0,8 cc      1 cc

73          69          71          72          75,5

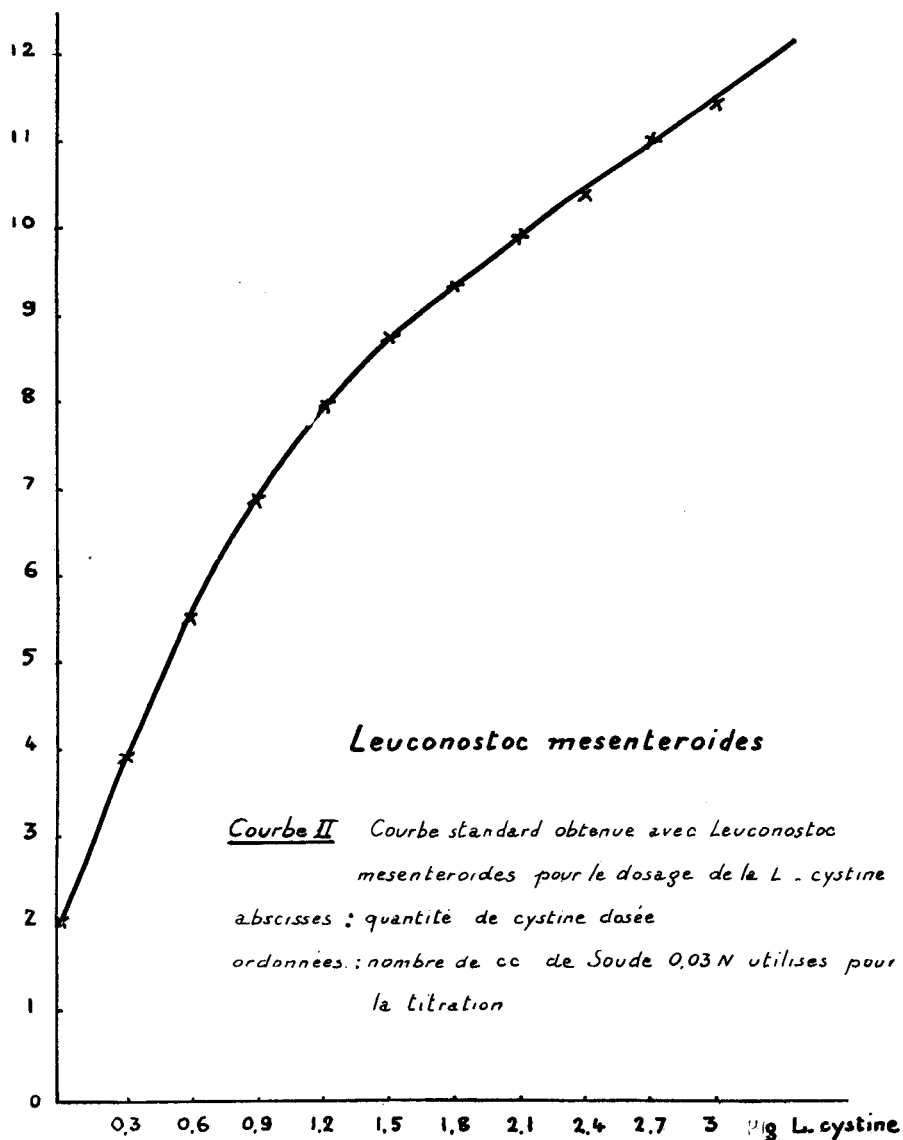
$6 = 72\mu, 1$  écart-type  $\bar{\mu} = 2,1$  9 degrés de liberté.

Résultats :  $72,1 \times 0,03 \times 100 \times 4 = 865 \mu\text{g}$  l'échantillon étant dilué 4 fois.

$2 \times 2,1 \times 0,03 \times 100 \times 4 = 50 \mu\text{g}$

cc NaOH 0,03 N

Courbe II



865  $\mu\text{g} \pm 50 \mu\text{g}$  c'est-à-dire 6 %, si l'on prend, comme on l'a fait ici,  $P = 0,05$ , ce qui correspond à 2 fois l'écart-type. La précision indiquée par l'analyse statistique ( $\pm 6 \%$ ) est donc satisfaisante. Elle se vérifie pour 12 dosages effectués dans les mêmes conditions.

### Conditions d'hydrolyse du matériel étudié

Les résultats obtenus par les différents auteurs sont assez contradictoires : HENDERSON et SNELL (23) d'une part, et STOKES (51) d'autre part, préconisent l'emploi de l'acide chlorhydrique 3N à 100° pendant 5 à 10 heures. MAHADEVAN (35) adopte HCl 3N pendant 5 à 7 heures à 120°. ALVING et MIRSKY (1) utilisant l'acide sulfurique pour l'hydrolyse de protéines pures trouvent que la teneur en cystine (méthode de FOLIN) augmente avec la concentration en acide (5N à 11N). Enfin, HESS et SULLIVAN (24), dans une étude des meilleures conditions d'hydrolyse pour le dosage de la cystine dans le virus de la mosaïque du tabac, ont obtenu la plus haute teneur en cystine avec  $\text{SO}_4\text{H}_26\text{N}$  pendant 12 heures et avec 1H à 57 % sous azote pendant 18 heures (0,69-0,71 %) alors que HCl à 20 % dans HCOOH pendant 24 heures ne permettait d'obtenir que 0,51 % et HCl à 20 % pendant 6 heures 0,47 %.

Les résultats semblent varier avec le matériel étudié, mais tous les auteurs notent la très grande facilité de destruction de la cystine, laquelle est accrue par la présence de tryptophane, de glucides et de traces de cuivre (38,48). L'hydrolyse enzymatique a donné de bons résultats à CALVERY et BLOCK (9) pour l'ovalbumine (2,1 % contre 1,3 % par hydrolyse acide) ; cependant elle ne paraît pas pouvoir être employée d'une manière très générale, car RIESEN et ELVEJHEM (43 et 44) n'ont retrouvé que 40 à 60 % de la cystine libre après 5 jours d'hydrolyse enzymatique de la caséine. De leur côté POLLARD et CHIBNALL (39) ont obtenu des résultats analogues pour l'hydrolyse acide (HCl 6N) et l'hydrolyse enzymatique de protéines d'herbes. De plus, de nombreux auteurs, entre autres BAILEY (2), FROMAGEOT (20) ont insisté sur la labilité de la cystine dans sa combinaison peptidique, labilité empêchant d'utiliser le test de surcharge pour contrôler la validité d'une technique d'hydrolyse.

Comme le besoin de *L. mesenteroides* en L-cystine est très spécifique (42) nous avons pu employer cet organisme pour étudier la stabilité de l'acide aminé dans les protéines au cours de l'hydrolyse, en fonction de la température, de la concentration en acide et du temps d'action de celui-ci. Les résultats maxima obtenus peuvent être considérés comme correspondant à une valeur acceptable de la teneur en cystine, probablement entachée d'une sensible erreur par défaut.

### *Test de surcharge*

L-cystine ajoutée avant l'hydrolyse.

A) Échantillon 1 g de luzerne II, hydrolyse par HCl 6N pendant 6 heures à 108°.



B) Échantillon 1 g de luzerne II + 600 µg de L-cystine, hydrolysé dans les mêmes conditions :

A	B	B-A		
		trouvé	théorique	% retrouvés
880 µg	1 400 µg	520 µg	600 µg	86
865 "	1 434 "	569 "	600 "	95
				90,5 %

Glutathion ajouté avant l'hydrolyse dans les mêmes conditions que la L-cystine (pour tester la destruction en combinaison peptidique) :

A	B	B-A		
		trouvé	théorique	% retrouvés
850 µg	2 000 µg	1 150 µg	1 500 µg	77
820 "	2 160 "	1 340 "	1 500 "	89
820 "	1 540 "	720 "	1 000 "	72
				moyenne 79 %

Une perte de la cystine du glutathion a donc lieu au cours de l'hydrolyse de celui-ci. Toutefois comme la dispersion des résultats est très grande comparative-ment à celle obtenue sur l'échantillon de luzerne, il est probable que la perte en cystine due à l'hydrolyse des protéines des végétaux est sensiblement moindre (2). On peut admettre, en première approximation qu'elle ne dépasse pas 10 %.

## RÉSULTATS

*Levures de distillerie.* — Les essais ont été faits en tube scellé sous vide et sous azote pour éviter la destruction de la L-cystine (1 g de levure n° 165 : N % : 5,8 % dans 20 cc d'HCl).

TABLEAU III

*Dosages microbiologiques de la cystine dans une levure hydrolysée dans des conditions diverses.*

Atmosphère des tubes	Concentration en HCl	Temps d'hydrolyse en heures	Température	L-cystine mg/g de produit
N <sub>2</sub> vide air	3N	8	108°	1,48
	3N	8	108°	1,55
	3N	5	115°	1,60
N <sub>2</sub> vide air	3N	15	108°	1,60
	3N	15	108°	1,60
	3N	15	108°	1,32
N <sub>2</sub> vide air	6N	8	108°	1,84
	6N	8	108°	1,93
	6N	8	108°	1,60
vide vide air	6N	15	108°	1,80
	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 6N	15	108°	1,55
	6N	15,30	108°	1,64

Les résultats les plus élevés ont été obtenus en employant HCl 6N sous vide pendant 8 heures, le réactif ayant été préalablement saturé d'azote par barbotage pendant 10 minutes.

*Résultat* : 1,93 mg/g de produit et 0,53 % des protéines (16 % N).

*Luzerne*. Nous avons essayé diverses conditions d'hydrolyse pour des luzernes récoltées à des stades de maturité variés :

luzerne I, campagne 1950, traitée par cubage avec 4 % d'huile, N % : 2,2 % ;

luzerne II, campagne 1951, séchée industriellement, N % : 2,5 % ;

luzerne III, très jeune, hauteur : 15 cm, séchée à l'infrarouge, N % : 4,3 %.

Toutes les hydrolyses ont été faites en tube scellé sous vide à 108°.

TABLEAU IV

*Dosages microbiologiques de la cystine dans une luzerne hydrolysée dans des conditions diverses.*

Acide et concentration	Temps d'hydrolyse en heures	mg de cystine par g. de produit		
		Luzerne I	Luzerne II	Luzerne III
HCl6N	4		0,90	
HCl6N	6		0,89	1,08
HCl6N	8	0,68	0,87	
HCl6N	10		0,73	0,93
HCl6N	16	0,51		
HCl6N	24	0,47		
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 6N	8		0,84	
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 6N	16	0,72	0,78	
SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 6N	24		0,71	

L'action de l'acide chlorhydrique 6N pendant 6 heures en tube scellé donne les résultats les plus élevés en cystine. Un essai d'hydrolyse dans les mêmes conditions, mais en matras sous réfrigérant à reflux, conduit au même résultat (0,850 mg/g). Nous avons adopté le premier mode d'hydrolyse.

Le chlorure de sodium des échantillons provenant de la neutralisation de l'acide chlorhydrique par la soude ne gêne pas la croissance, à condition de ne pas dépasser 20 mg de chlorure de sodium pour 3 cc de volume total. L'évaporation de l'acide chlorhydrique sous vide, à 45°, répétée trois fois après reprise par l'eau du résidu sec, conduit à des résultats identiques (0,890 mg/g pour la luzerne II).

Nous avons essayé sans succès l'hydrolyse en présence de chlorure stanneux, lequel réduit considérablement la formation de matières humiques solubles (29, 34, 55). La présence de l'étain provoque une inhibition de la croissance de *L. mesenteroides* et les résultats obtenus après son élimination à l'état de sulfure sont entachés d'une légère erreur par défaut (0,740 mg/g avant l'élimination de l'étain et 0,830 mg après).

*Analyse des divers échantillons*

L'analyse de tous les produits analysés a donné des résultats satisfaisants aux critères d'application de la méthode microbiologique. Nous n'avons observé en effet ni inhibition, ni activation de la croissance de *L. mesenteroides* pour des concentrations croissantes en hydrolysats des échantillons. Les résultats trouvés sont d'ailleurs souvent en accord avec des données bibliographiques les plus récentes.

TABLEAU V

*Dosage microbiologique de la cystine dans divers produits*

Échantillon	N % du produit	Cystine (mg/g de produit)	Cystine % des protéines (16 % N)	Données antérieures (cystine %) (c = méth. chim.)
Luzerne après floraison.....	1,1	0,30	0,43	1,7 (7) c 0,29 à 0,72 (52) 0,37 (6) c
Luzerne en floraison.....	2,2	0,70	0,51	
Luzerne séchée artificiellement	2,5	0,89	0,57	
Luzerne très jeune séchée I. R.	4,3	1,08	0,40	
Luzerne, foin .....	2,4	0,72	0,48	
Luzerne fraîche verte.....	0,53	0,135	0,41	
Luzerne fraîche très jeune....	1	0,185	0,30	
Protéine de luzerne .....	10	0,36	0,58	1,2 (33)
Ray gras frais .....	0,46	0,090	0,31	0,5 (39) c
Ray gras frais .....	0,37	0,057	0,25	
Ovalbumine OSI .....	12,2	21,5	2,82	2,98 (58)
Farine d'arachide .....	9,0	6,15	1,11	1,2 à 1,4 (58) 1,6 (7) c
Tourteau de lin.....	5	3,5	1,1	1,0 (7) c
Tourteau de colza.....	5	5	1,6	2,4 (7) c
Pomme de terre fraîche .....	0,36	0,154	0,68	0,58 (6) c
Liquide de rumen filtré sur mousseline.....	0,5	0,020	0,64	
— idem — .....	0,84	0,036	0,68	
— idem — .....	1,8	0,078	0,69	
Levure de distillerie .....	5,8	1,93	0,53	1,10 (7) c 1,60 (30) c

*Remarques.* Nous n'avons pas observé des différences significatives dans le pourcentage de cystine dans les luzernes d'âge croissant, ce qui est en accord avec les résultats de LUGG (33).

Les résultats obtenus par la technique microbiologique sont souvent plus faibles que ceux obtenus par des méthodes chimiques, comme l'ont signalé divers auteurs, entre autres SCHWEIGERT (47). Un récent rapport publié par l'Université RUTGERS (58) sur le dosage de la cystine, de l'ovalbumine et de la farine d'arachide par l'une et les autres, a signalé des différences systématiques entre les résultats obtenus, d'une part, dans deux laboratoires utilisant une méthode microbiologique et, d'autre part, dans trois laboratoires mettant en œuvre des méthodes chimiques (SULLIVAN et FOLIN), les valeurs déterminées par les dernières étant systématiquement plus élevées. Par ailleurs, BLOCK

et BOLLING (7) indiquent dans leur ouvrage des teneurs en cystine de levures et des luzernes plus fortes que celles obtenues par d'autres auteurs (6, 52, 58) et par nous-même.

*Résumé.* — Nous avons poursuivi des recherches sur l'établissement d'une méthode microbiologique de dosage de faibles quantités de cystine applicable à des produits végétaux utilisés dans l'alimentation animale.

*Lactobacillus arabinosus* 17/5 (A. T. C. C. 8014) et *Leuconostoc mesenteroides* P. 60 (A. T. C. C. 8042) ont été successivement mis en œuvre dans ce but. Le premier a dû être abandonné en raison des difficultés que l'on éprouve à couvrir son besoin en cystine en présence de quantités diverses de vitamines du groupe B, telles qu'en apportent les échantillons à analyser.

*Leuconostoc mesenteroides* P. 60, organisme très spécifique, a été adopté avec le milieu D de DUNN modifié. Nous avons pu doser de manière satisfaisante à l'aide du mode opératoire décrit des quantités de cystine allant de 0,3 à 3  $\mu$ g dans des tourteaux, des fourrages frais et secs et dans des levures.

#### BIBLIOGRAPHIE

- (1) ALVING (A. S.) and MIRSKY (A. E.). — The nature of plasma and urinary proteins in nephrosis. *J. Clin. Invest.*, **15**, 215-220, 1936.
- (2) BAILEY (K.). — The sulphur distribution of proteins. *Biochem. J.*, **31**, 1396-1405, 1937.
- (3) BARTON-WRIGHT (E. C.), EMERY (W. B.) and ROBINSON (F. A.). — The assay of methionine, lysine, phénylalanine, aspartic acid and proline with *Leuconostoc mesenteroides* P. 60. *Nature*, **157**, 628-637, 1946.
- (4) BARTON-WRIGHT (E. C.) and MORAN (I.). — The microbiological assay of amino acid ; cystine, methionine, lysine and threonine. *The analyst*, **71**, 267-278, 1946.
- (5) BAUMGARTEN (W.), GAREY (J. C.), OLSEN (M. J.), STONE (L.) and BORUFF (C. S.). — A medium for obtaining maximal growth response in microbiological assays of amino acids. *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 1607-1609, 1944.
- (6) BERNISCHKE (H.). — Cystinbestimmung in Pflanzensubstanzen. *Zeit. Pflanzenernährung Dtsch.*, **4**, 42-53, 1948.
- (7) BLOCK (R. J.) and BOLLING (D.). The amino acid composition of proteins and foods, 1 vol., Springfield 1951, Thomas Ed.
- (8) BRICKSON (W. L.), HENDERSON (L. M.), SOLHJELL (I.) and ELVEHJEM (C. A.). — Antagonism of amino acids in the growth of lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, **176**, 517-528, 1948.
- (9) CALVERY (H.) and BLOCK (W. J.). — The determination of some amino acids in crystalline pepsin. *J. Biol. Chem.*, **113**, 11-16, 1936.
- (10) CAMIEN (M. N.) and DUNN (M. S.). — A composite basal medium for the microbiological assay of leucine. *J. Biol. Chem.*, **173**, 137-140, 1948.
- (11) CAMIEN (M. N.) and DUNN (M. S.). — An improved microbiological method for the determination of cystine in human urine with *Leuconostoc mesenteroides* P. 60. *J. Biol. Chem.*, **183**, 561-568, 1950.
- (12) CAMIEN (M. N.) and DUNN (M. S.). — Antagonisms in the utilisation of D-aminoacids by lactic acid bacteria. III. Influence of DL-methionine sulfone and oxidised casein on the utilisation of D-methionine. *J. Biol. Chem.*, **187**, 365-368, 1950.
- (13) CARDINALL (E. V.) and HEDRICK (L. R.). — Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *J. Biol. Chem.*, **172**, 609-618, 1948.
- (14) DUNN (M. S.), SHANKMANN (S.), CAMIEN (M. N.), FRANKL (W.) and ROCKLAND (J.). — The nutrition requirements of *Leuconostoc mesenteroides* P. 60. *J. Biol. Chem.*, **156**, 703-713, 1944.

- (15) DUNN (M. S.), CAMIEN (M. N.), SHANKMANN (S.) and BLOCK (H.). — Urinary excretion of twelve amino acids by normal male and female subjects measured microbiologically. *Arch. Biochem.*, **13**, 207-216, 1947.
- (16) DUNN (M. S.), SHANKMANN (S.) and BLOCK (H.). — The amino acid requirements of twenty-three lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, **168**, 1-23, 1947.
- (17) DUNN (M. S.). — Determination of amino acids by microbiological assay. *Physiological Reviews*, **29**, 219-259, 1949.
- (18) Du VIGNEAUD (V.) and LORING (H. S.). — The solubility of the stereoisomers of cystine with a note on the identity of stone and hair cystine. *J. Biol. Chem.*, **107**, 267-274, 1934.
- (19) EVANS (R. J.). — Sulfur amino acid nutrition of some lactic acid producing bacteria. *Arch. Biochem.*, **16**, 357-360, 1948.
- (20) FROMAGEOT (C.) et de GARILHE (M. P.). — La composition du lysosyme en acides aminés. II. Acides aminés totaux. *Biochimica Biophysica Acta*, **IV**, 509-517, 1950.
- (21) HALWER (M.) and NUTTING (G. C.). — Cysteine losses resulting from acid hydrolysis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **166**, 521-530, 1946.
- (22) HELLER (G. L.) and KIRCH (E. R.). — The microbiological determination of proline, cystine and isoleucine. *J. Am. Pharm. Assoc.*, **36**, 345-349, 1947.
- (23) HENDERSON (L. M.) and SNELL (E. E.). — A uniform medium for determination of amino acids with various microorganisms. *J. Biol. Chem.*, **172**, 15-29, 1948.
- (24) HESS (W. C.), SULLIVAN (M. K.) and PALMES (E. D.). — The colorimetric determination of cystine in tobacco mosaic virus protein. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, **48**, 353-355, 1941.
- (25) HESS (W. C.), SULLIVAN (M. K.). — The rate of liberation of cystine from proteins by acid hydrolysis. *Arch. Biochem.*, **3**, 53-60, 1943.
- (26) HIFT (H.) and WALLACE (G. I.). — A study on the synthesis of cystine by some lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, **177**, 927-931, 1949.
- (27) HORN (M. J.), JONES (D. B.) and BLUM (A. E.). — Microbiological determination of methionine in proteins and foods. *J. Biol. Chem.*, **166**, 321-326, 1946.
- (28) KLUNGSVØR (M.), SIRNY (R. T.) and ELVEHJEM (C. A.). — Effect of incomplete hydrolysis on microbiological determination of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **189**, 557-569, 1951.
- (29) KOFRANYI (E.). — Proteinhydrolyse bei Anwesenheit von Zinn (II) chlorid. *Hoppe Seyler Z. physiol. Chem. Dtsch.*, **283**, 14, 1948.
- (30) LINDAN (O.), WORK (E.). — The amino acid composition of two yeasts used to produce massive dietetic liver necrosis in rats. *Biochem. J.*, **48**, 337-344, 1951.
- (31) LUGG (J. W.). — Some fundamental problems in the amino acid analysis of proteins. *Australian Chem. Inst. J. Proc.*, **14**, 233-249, 1947.
- (32) LUGG (J. W.). — Sullivans reaction for the quantitative determination of cysteine and cystine. *Biochem. J.*, **27**, 669-674, 1933; Idem, **27**, 1022-1029, 1933. Preparation of some protein samples from the fresh leaves of plants and the sulfur distribution of the preparation. *Biochem. J.*, **32**, 2114-2128, 1938.
- (33) LUGG (J. W.) and WELLER (R. A.). — Protein in senescent leaves of *Trifolium subterraneum*. Partial amino acid composition. *Biochem. J.*, **42**, 412-414, 1948.
- (34) LYMAN (C. M.), MOSELEY (O.), WOOD (S.) and HALE (F.). — Note on the use of hydrogen peroxide treated peptone in media for the microbiological determination of amino acids. *Arch. Biochem.*, **10**, 427-437, 1946.
- (35) MAHADEVAN (V.). — Dosage microbiologique de la cystine dans les protéines et les aliments à l'aide de *Lactobacillus arabinosus*. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **31**, 1478-1493, 1949.
- (36) MARVIN (L. S.) and PITT (D. A.). — A relationship between cystine and pyridoxal or pyridoxamine in the nutrition of certain bacteria. *Science*, **106**, 420-421, 1947.
- (37) MONDOLFO (U.) et C'AMBONI (V.). — Recherche sulla distribuzione di alcuni aminoacidi. La determinazione degli aminoacidi con i metodi microbiologici. *Boll. Inst. Ser.*, Milan, **28**, 333-352, 1949.
- (38) OLCOTT (H. S.) and FRAENKEL CONRAT (H.). — Formation and loss of cysteine during acid hydrolysis of proteins. Role of tryptophane. *J. Biol. Chem.*, **171**, 583-594, 1947.
- (39) POLLARD (A.) and CHIBNALL (A. C.). — The proteins of grasses III. The cystine content of certain grasses and other pasture plant proteins. *Biochem. J.*, **28**, 326-336, 1934.
- (40) RATNER (S.) and CLARKE (H. T.). — The action of formaldehyde upon cysteine. *J. Am. Chem. Soc.*, **59**, 200-206, 1937.
- (41) RAY SARKAR (B. C.), LUECKE (R. W.), EVANS (R. J.) and DUNCAN (C. W.). — A comparison of the chemical and microbiological methods for determining cystine in protein hydrolysates. *Michigan Agric. Exptl. St. Quant. Bull.*, **33**, 143-150, 1950.
- (42) RIESEN (W. H.), SPENGLER (H. H.), ROBLEE (A. R.), HANKER (L. V.) and ELVEHJEM (C. A.). — Cystine and related compounds in the nutrition of lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, **171**, 731-748, 1947.

- (43) RIESEN (W. H.) and ELVEHJEM (C. A.). — Liberation of amino acids from raw and heated casein by acid and enzyme hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **176**, 467-476, 1948.
- (44) RIESEN (W. H.) and ELVEHJEM (C. A.). — Influence of heating on the liberation of certain amino acids from whole soybeans. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, **70**, 416-419, 1949.
- (45) SAUBERLICH (H. E.) and BAUMANN (C. A.). — The effect of dietary protein upon amino acid excretion by rats and mice. *J. Biol. Chem.*, **166**, 417-428, 1946.
- (46) SCHWEIGERT (B. S.), ELVEHJEM (C. A.) and STRONG (F. M.). — The direct determination of valine and leucine in fresh animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **155**, 183-191, 1944.
- (47) SCHWEIGERT (B. S.), BENNET (B. A.) and GUTHNECK (B. T.). — Further studies on the amino acid composition of porc and lamb cuts. *J. Biol. Chem.*, **190**, 697-703, 1951.
- (48) SNELL (E. E.) and SCHWEIGERT (B. J.). — Microbiological methods for the estimation of amino acids. *Nutrition Abstracts and Reviews*, **16**, 497-509, 1947.
- (49) STEELE (B. F.), BAUMANN (C. A.), SAUBERLICH (H. E.) and REYNOLDS (M. S.). — Amino acids in the urine of human subjects fed eggs or soybeans. *J. Nutrition*, **33**, 209-220, 1947.
- (50) STEELE (B. F.), BAUMANN (C. A.), SAUBERLICH (H. E.) and REYNOLDS (M. S.). — Media for *Leuconostoc Mesenteroides* P. 60 and *Leuconostoc Citrovorum* 8081. *J. Biol. Chem.*, **177**, 533-544, 1949.
- (51) STOKES (S. L.), GUNNES (M.), DWYER (I. M.) and CASWELL (M. C.). — Determination of 10 essential amino-acids: phenylalanine with *L. delbrueckii* and the other nine with *S. faecalis*. *J. Biol. Chem.*, **160**, 35-49, 1945.
- (52) TISDALL (S. L.), DAVIS (R. L.), KINGSLEY (A. F.) and MERTZ (E. T.). — Methionine and cystine content of two strains of alfalfa as influenced by different concentrations of the sulfate ion. *Agronomy Journal New York*, **2**, 221-225, 1950.
- (53) VELICK (S. F.) and RONZONI (E.). — The amino acid composition of aldolase and d-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **173**, 627-639, 1948.
- (54) VELICK (S. F.) and WICKS (C. F.). — The amino acid composition of phosphorylase. *J. Biol. Chem.*, **190**, 741-751, 1951.
- (55) VICKERY (H. B.) et WHITE (A.). — The use of cystein cuprons mercaptide in the determination of cystine. *J. Biol. Chem.*, **99**, 701-715, 1932.
- (56) WELLER (L. E.), LUECKE (L. W.) and SELL (H. M.). — Effect of derivatives of L-cysteine on the growth of *Leuconostoc Mesenteroides* P. 60. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, **77**, 3-5, 1951.
- (57) WOODSON (H. W.), MIER (S. W.), SOLOMON (J. D.), BERGEM (D.). — Urinary excretion of amino acids by human subjects on normal diets. *J. Biol. Chem.*, **172**, 613-618, 1948.
- (58) Cooperative determination of the amino acid content and of the nutritive value of six selected protein food sources 1946-1950. *Rutgers University New Brunswick*, New Jersey, 1951.
-