

## EFFICACITÉ DE QUELQUES PROTIDES ALIMENTAIRES CHEZ LE PORC

V. — INFLUENCE DU TRAITEMENT TECHNOLOGIQUE  
SUR LA VALEUR DES PROTÉINES DU TOURTEAU DE SOJA.  
VALIDITÉ DE QUELQUES TESTS BIOCHIMIQUES POUR L'APPRÉCIATION  
DE LA QUALITÉ DES TOURTEAUX

J. DELORT-LAVAL et J. BOZA LOPEZ

Avec la collaboration technique de Michèle FISZLEWICZ, Arlette LISSAJOUX et A. ROUSTAN

*Laboratoire de Recherches sur la Conservation et l'Efficacité des Aliments,  
16, rue Claude-Bernard, Paris 5<sup>e</sup>*

---

### SOMMAIRE

La qualité du tourteau de soja est améliorée par le traitement thermique qui détruit les facteurs antinutritionnels contenus dans la graine crue. Mais des températures excessives risquent d'entraîner la dénaturation des protéines et la diminution de leur efficacité biologique.

La présente étude concerne six tourteaux industriels traités différemment, par pression ou par extraction, et ayant subi des durées et des températures de cuisson différentes. Ces produits ont été testés parallèlement sur le porc (valeur biologique par la technique de THOMAS-MITCHELL) et *in vitro*, par divers tests biochimiques (activité uréasique, test de FRÖLICH, solubilité dans l'eau, solubilités pepsique et trypsique).

L'étude des bilans complets d'azote montre que les différences entre tourteaux portent surtout sur l'utilisation digestive apparente et réelle (C U D R) et non sur la valeur biologique (V B). Il existe toutefois une relation nette entre l'intensité du traitement thermique et l'utilisation protéique nette ( $V B \times C U D R$ ) des tourteaux.

Parmi les tests biochimiques pour l'estimation du degré de cuisson et donc de l'efficacité azotée des tourteaux, la mesure de l'activité uréasique ou de la solubilité en milieu tampon proche de la neutralité permettent une première séparation des tourteaux crus et cuits. Mais la précision obtenue par application du test de FRÖLICH ou de la solubilité trypsique corrigée, mise au point dans cette étude, est bien supérieure : les résultats obtenus par ces deux tests sont en accord avec la digestibilité vraie mesurée sur le porc et, dans la mesure où peut être précisé le traitement thermique, avec l'intensité de ce dernier.

---

### INTRODUCTION

En raison de sa richesse en protéines et surtout en acides aminés indispensables, le tourteau de soja est un aliment de grande valeur pour les animaux de ferme. Mais la qualité des produits du commerce est, pour de nombreuses raisons, très variable.

La graine de soja contient en effet nombre de substances inhibitrices de la croissance des animaux (LIENER, 1958) : ce sont notamment, outre une lipoxydase et un facteur qui provoque l'hypertrophie de la thyroïde, une hémagglutinine qui serait pour une bonne part responsable du retard de croissance de rats consommant du soja cru (LIENER, 1953) et surtout un facteur antitrypsique (HAM et SANDSTEDT, 1944), globuline isolée (KÜNTZ, 1946) et caractérisée, qui s'oppose à l'action de la trypsine, en limitant le taux et la vitesse de libération d'acides aminés essentiels des protéines alimentaires (ALMQUIST et MERRITT, 1951, 1953). La consommation de tourteau cru, qui provoque une inhibition de la croissance et une réduction de l'efficacité alimentaire du régime (OSBORNE et MENDEL, 1917), s'accompagne d'une hypertrophie du pancréas chez le poulet (CHERNICK et *al*, 1948) et chez le rat (BOOTH et *al*, 1960) et d'une sécrétion accrue d'enzymes pancréatiques (LYMAN et LEPKOWSKY, 1957). BIRK et GERTLER (1961) considèrent que les facteurs antitrypsiques jouent un rôle très important, car : (1) la valeur du tourteau de soja cru n'est que faiblement améliorée par l'extraction de l'hémagglutinine, qui est, par ailleurs, détruite en milieu pepsine-HCl à pH 1,5 ; (2) la fraction résiduelle des facteurs antitrypsiques non extraite du tourteau par les techniques adoptées, résiste à l'action de la pepsine et pourrait exercer, au niveau duodénal, une action antiprotéolytique.

L'effet dépressif du tourteau cru sur la croissance peut être partiellement compensé par l'addition d'antibiotiques (BORCHERS et WEAVER, 1955) ou d'un mélange de plusieurs acides aminés essentiels (FISHER et JOHNSON, 1958). Un tel effet de supplémentation peut être relié, aux observations de RIESEN et *al* (1947), qui constatent la faible hydrolyse des protéines du tourteau de soja cru par la trypsine *in vitro*.

Les substances antinutritionnelles présentes dans la graine et le tourteau cru étant thermolabiles, un traitement thermique adéquat permet d'améliorer la qualité du produit. Les conditions de durée, de température et d'humidité subies par la graine au cours du traitement technologique déterminent le degré d'amélioration du tourteau et influent considérablement sur l'efficacité azotée du régime et la vitesse de croissance du Rat (HAYWARD et *al*, 1936), du poulet (WILGUS et NORRIS, 1936) et du Porc (BECKER et *al*, 1953). Mais des températures excessives, plus encore que de longues durées de chauffage (ZIMMERMANN, 1952), risquent d'entraîner le développement de réactions, entre certains acides aminés et d'autres substances, donnant naissance à des complexes stables et résistant à l'action enzymatique. Il peut en résulter une diminution du taux de disponibilité biologique d'acides aminés aussi importants que la lysine ou la cystine et un amoindrissement corrélatif de la valeur du produit final. Il est donc clair que la qualité d'un tourteau de soja est au premier chef tributaire de la conduite du traitement thermique qui accompagne la délipidation ; un tel traitement n'est correct que dans la mesure où il permet l'inactivation des anti-enzymes sans dénaturation des protéines elles-mêmes.

L'estimation du degré de cuisson des tourteaux de soja par des épreuves *in vitro* a fait l'objet de nombreux travaux (cf. revue LIENER, 1958). Ces techniques présentent un intérêt dans la mesure où leurs résultats sont en accord avec la réponse de l'animal. C'est pourquoi nous avons tenté dans la présente étude de mettre au point des tests biochimiques simples, pour l'appréciation de l'intensité du traitement thermique des tourteaux, et de comparer les données ainsi obtenues à des mesures d'efficacité azotée, effectuées sur porc selon la technique de THOMAS-MITCHELL.

## MATÉRIELS ET TECHNIQUES

*Caractéristiques des tourteaux de soja*

Six échantillons (A, B, C, D, E, F) issus d'un même lot de graines ont été fabriqués par pression, par extraction ou par une combinaison de ces deux techniques, selon le schéma décrit dans le tableau 1.

Pour les cinq premiers tourteaux, les graines, après un broyage grossier, ont subi deux chauffages successifs (tabl. 1), puis ont passé dans une presse Anderson à rotation soit rapide (tourteaux A et C), soit lente (tourteaux B et D). Le produit E a été soumis après un traitement analogue à celui du tourteau C, à une extraction complémentaire par l'« essence B » pour abaisser de 6. p 100 à moins de 1 p. 100 le taux de graisses résiduelles.

TABLEAU I

*Schéma des traitements technologiques appliqués à un lot de graine de soja pour la fabrication de 6 tourteaux expérimentaux*

Tourteau	Préparation de la graine	Préchauffage		Chauffage		Presse Anderson	Extraction par solvants	Élimination des solvants
		Durée (min)	Temp. (°C)	Durée (min)	Temp. (°C)			
A	Broyage	90	105-110	45	118 ± 5	30''	—	—
B	Broyage	90	105-110	75	118 ± 5	50''	—	—
C	Broyage	90	95	45	105 ± 5	30''	—	—
D	Broyage	90	95	75	105 ± 5	50''	—	—
E	Broyage	90	95	45	105 ± 5	30''	+	en atmosphère sèche
F	Mise en flocons	45	80	—	—	—	+	en atmosphère sèche

TABLEAU 2

*Composition centésimale des tourteaux de soja*

Produit	Humidité	Matières minérales	Matières azotées totales (N × 6,25)	Matières grasses (extraction à l'éther)	Cellulose Weende
A	3,8	6,5	48,1	5,3	5,4
B	3,0	6,6	48,6	4,2	5,5
C	3,6	6,1	48,1	5,9	5,5
D	3,8	6,3	48,1	4,9	5,6
E	10,5	6,0	47,4	0,4	5,4
F	12,3	5,6	45,9	1,0	5,6

Le tourteau F, après mise de la graine en flocons, a été légèrement chauffé avant extraction de l'huile : l'évaporation de l'essence a eu lieu en atmosphère sèche à une température inférieure à 100° C, sans cuisson humide complémentaire.

Au point de vue de l'intensité du traitement thermique, les six échantillons peuvent être répartis en trois groupes distincts comprenant respectivement les produits A, B — C, D, E, — F. Les tourteaux les plus chauffés sont ceux du premier groupe (A et B). Le tourteau E, qui a subi une extraction par solvants et par pression, se classe logiquement entre les groupes AB et CD, mais il est très proche de ces derniers en raison de la faible application de chaleur qui accompagne l'élimination du solvant résiduel. Le tourteau de diffusion F est le moins cuit. Dans la mesure où l'effet du type de presse est négligeable par rapport à celui des températures de chauffage, les trois groupes de produits définis ci-dessus peuvent être considérés comme homogènes et différant nettement les uns des autres.

La composition des tourteaux est indiquée dans le tableau 2.

Pour les études *in vitro*, nous avons utilisé en outre un tourteau industriel G qui ne provient pas du même lot de graines ; il a subi une cuisson complémentaire postérieurement à l'extraction aux solvants et ne présente plus d'activité uréasique.

#### Mesure de la valeur biologique des tourteaux de soja chez le Porc

La majorité des travaux conduits sur poulet (EVANS et MCGINNIS, 1946) et sur rat (JACQUOT et *al*, 1947 ; LIENER, 1958) montrent l'influence du degré de cuisson sur l'utilisation *in vivo* des protéides du soja. Peu de données existent sur le porc, cependant gros consommateur de tourteau de soja. Il nous a paru intéressant, pour étudier cette influence dans cette espèce, de choisir comme test d'efficacité protéique la mesure de la valeur biologique par la méthode de THOMAS-MITCHELL (MITCHELL 1923).

L'essai porte sur six porcs mâles castrés (R. U ; S. V ; T. W) de race *Large White*, qui proviennent de trois portées différentes. Au début de l'expérience, les poids de ces animaux varient entre 22,3 et 26,1 kg et leur âge moyen est de 116 jours.

Le tourteau de soja, seule source de protéines, est distribué de façon à fournir, dans le régime, un taux de 100 g de matières azotées digestibles par unité fourragère et complète l'aliment ternaire à 8 p. 100 de poudre de papier-filtre, dont la composition est décrite dans un mémoire antérieur (ZELTER et CHARLET-LÉRY, 1961). La ration est répartie en deux repas. La matière sèche distribuée est calculée sur la base de 4 p. 100 du poids vif ; elle est ajustée régulièrement en fonction du poids et de l'appétit des animaux, au plus tard trois jours avant le début de la mesure de bilan. Les refus sont pesés après chaque repas.

TABLEAU 3

#### Répartition des tourteaux au cours des périodes

Animal →	R	S	T	U	V	W
Période ↓						
I .....	A	A	B	B	C	D
II .....	E	E	F	F	D	C
Déplétion azotée.....	—	—	—	—	—	—
III .....	F	F	E	E	D	C
IV .....	B	B	A	A	C	D

Les animaux sont placés en cages à métabolisme individuelles. Les techniques de collecte des excréta et les méthodes d'analyses des échantillons de fèces frais et d'urine ont été décrites dans un mémoire antérieur (ZELTER et CHARLET-LÉRY, 1961).

Le schéma expérimental adopté a été établi de manière à éliminer l'effet période (tabl. 3). Il comporte cinq périodes de bilans d'azote de huit jours (réparties en 2 sous-périodes de même durée) précédées chacune d'un temps d'adaptation au moins égal. Une période de déplétion azotée placée au milieu du dispositif expérimental (tabl. 3) sert à l'estimation des dépenses endogènes. Elle est suivie de vingt jours d'alimentation azotée avant le début de la période suivante.

Le calcul de la valeur biologique s'effectue selon la méthode décrite dans un mémoire antérieur (DELORT-LAVAL et ZELTER, 1963).

*Tests biochimiques d'appréciation du degré de cuisson des tourteaux de soja*

C'est principalement à la détermination de l'activité résiduelle des substances antinutritionnelles et surtout des enzymes thermolabiles présentes à l'origine dans la graine crue que l'on a cherché à relier le degré de cuisson des tourteaux de soja.

Les travaux sur l'inactivation des enzymes par la chaleur concernent notamment l'amylase (DANGOU MAU *et al.*, 1951), la lipoxydase (SUMNER et TRESSLER, 1943) et surtout l'uréase (CASKEY et KNAPP, 1944) dont la teneur dans la graine atteint 0,012 p. 100 (SUMNER et SOMERS, 1947). La mesure de l'activité uréasique résiduelle permet de reconnaître un tourteau insuffisamment cuit.

Mais au-delà du seuil de l'inactivation totale des enzymes, il risque de se produire sous l'action du traitement thermique, une dénaturation des protéines. Selon certains auteurs, l'effet de surcuisson pourrait être mis en évidence par d'autres techniques analytiques : formol-titration (ALMQUIST et MAURER, 1953) et surtout fixation d'un colorant ; si la méthode à l'orange G se révèle infructueuse dans le cas du soja comme le montre un examen attentif des résultats de MORAN *et al.* (1963), le test de fixation du rouge de crésol par le tourteau semble lié à l'intensité du traitement thermique (FRÖLICH, 1954). D'autre part, la modification des propriétés physiques des protéines sous l'influence de la chaleur se marque par un abaissement de leur solubilité en phase aqueuse (BELTER et SMITH, 1952). Mais cette solubilité, faible pour un produit de bonne qualité, n'est que peu modifiée par un surchauffage (BALLOUN *et al.*, 1953). D'autres méthodes de fractionnement des protéines par solubilisation dans divers solvants ont été proposées par LUND et SANDSTRÖM (1943), DANGOU MAU et DEBRUYNE (1955), et ANWAR (1962).

La mesure de solubilité en présence de trypsine semble plus spécifique en raison de l'existence du facteur antitrypsique et de l'action possible de la chaleur sur la sensibilité des protides du soja à l'attaque des enzymes protéolytiques. RIESEN *et al.* (1947) obtiennent, après cinq jours de digestion pancréatique, une libération plus faible d'acides aminés d'un produit cru ou surcuit que d'un tourteau convenablement chauffé. Il faut cependant noter que CLANDINN et ROBBLEE (1952) mettent en doute la valeur de ce test, l'amélioration de la qualité des tourteaux traités par la chaleur dans les conditions du laboratoire ne correspondant pas toujours à des taux maximum de libération d'azote aminé. Toutefois, comme le seuil thermique de destruction du facteur antitrypsique semble plus élevé que celui de l'uréase (BORCHERS *et al.*, 1947), nous avons pensé que l'élaboration d'un test d'activité antitrypsique suffisamment sensible permettrait une meilleure appréciation de l'intensité de la cuisson que les épreuves actuellement préconisées.

Les différents tests biochimiques étudiés comparativement sont exposés ci-après :

— a) l'activité uréasique est mesurée par la méthode de SCHRAMM et AINES (1959) modifiée par DELORT-LAVAL et ZELTER (1960).

— b) la quantité de rouge de crésol fixée par le tourteau est déterminée dans les conditions de durée et de pH définies par FRÖLICH (1954) ;

— c) les solubilités azotées sont déterminées en l'absence et en présence d'enzymes sur 1 g de tourteau mis en suspension dans environ 100 ml d'eau distillée, à 40° C et sans agitation. Dans tous les cas, l'azote initial et l'azote résiduel, sont dosés, après filtration sur entonnoir BUCHNER, par la microtechnique de KJELDAHL. Les conditions expérimentales adoptées sont les suivantes :

— la solubilité en milieu pepsine-HCl se déroule durant 48 heures à pH 2,0 en présence de 50 mg de pepsine (pouvoir 200) ;

— la solubilité dans l'eau est mesurée en présence de 0,5 g de phosphate monopotassique, la solution étant ajustée à pH 7,5  $\pm$  0,1 par addition de soude normale et incubée durant huit heures : l'adoption d'un pH fixe nous a paru s'imposer à la suite d'une série d'essais sur le taux de solubilité et sur la reproductibilité de la mesure (fig. 1).

— le test de solubilité trypsique s'effectue dans les mêmes conditions que l'épreuve de solubilité dans l'eau en présence de 5 mg de trypsine (8 000 U. S. T. CHOAY, Paris). Un essai préalable a montré que la zone d'action optimum de la trypsine dans nos conditions expérimentales était comprise entre pH 7 et 8. (fig. 2) ;

— outre la solubilité azotée globale, l'azote  $\alpha$ -aminé formé au cours de l'hydrolyse trypsique est dosé par la méthode de MICHEL (1961). Le taux d'azote  $\alpha$ -aminé libéré sous l'action de cet enzyme est obtenu par différence entre les taux mesurés en présence et en absence de trypsine.

## RÉSULTATS

*Bilans azotés in vivo*

Les résultats moyens pour chaque période et chaque animal sont groupés dans le tableau 4.

Durant tout l'essai, la croissance des animaux peut être considérée comme nor-

male. Le traitement thermique des tourteaux n'a pas d'effet sur l'utilisation digestive de la matière sèche des régimes.

L'examen du tableau 5 permet de constater des différences entre les coefficients d'utilisation digestive apparente et réelle de l'azote des 6 tourteaux. Par contre, les valeurs biologiques de ces produits ne diffèrent pour ainsi dire pas. L'utilisation

TABLEAU 4

*Résultats moyens journaliers*

Période Animal	Poids (kg)	Croissance (kg)	M.S.i. (kg)	M. S. i. $\frac{1}{P^{0,7}}$	C U D M. S. (%)	N ingéré (g)	N urinaire (g)	N fécal (g)	N bilan apparent (g)
I. R.....	28,7	0,41	1,06	100,9	83,8	24,32	6,88	4,48	12,96
S.....	29,8	0,47	1,08	100,5	84,0	24,86	8,35	3,71	12,80
T.....	33,4	0,49	1,22	104,8	83,8	27,79	9,85	4,53	13,41
U.....	28,3	0,46	1,04	100,3	84,0	23,63	6,88	4,03	12,72
V.....	27,6	0,45	1,00	98,1	83,1	22,85	7,05	4,50	11,30
W.....	30,4	0,41	1,14	104,8	84,9	26,55	9,70	5,05	11,80
II. R.....	37,2	0,52	1,44	115,0	84,0	32,33	9,83	8,02	14,48
S.....	38,5	0,55	1,48	115,3	84,2	33,31	9,97	7,16	16,18
T.....	41,2	0,49	1,62	120,0	82,8	36,97	11,78	10,57	14,62
U.....	36,9	0,53	1,46	117,1	82,8	33,43	9,67	9,76	14,00
V.....	36,1	0,51	1,44	117,1	83,4	34,60	9,65	8,98	15,97
W.....	39,1	0,57	1,53	117,3	83,9	37,44	13,65	8,73	15,06
D. R.....	41,9		1,45	106,2	83,3	1,07	2,40	2,24	— 3,57
S.....	43,2		1,42	101,6	84,0	1,05	2,54	2,24	— 3,73
T.....	45,4		1,65	114,3	82,1	1,22	2,98	3,30	— 5,06
U.....	41,1		1,44	106,6	83,2	1,06	2,44	2,49	— 3,87
V.....	41,3		1,44	106,3	83,1	1,06	2,45	2,83	— 4,22
W.....	43,7		1,62	115,0	82,7	1,19	3,10	3,01	— 4,92
III. R.....	65,7	0,85	2,22	118,4	84,9	56,39	17,21	13,10	26,08
S.....	67,2	0,96	2,36	124,2	83,4	62,31	16,94	14,85	30,52
T.....	71,0	0,94	2,44	123,3	84,3	62,04	19,81	12,48	29,75
U.....	66,4	0,94	2,24	118,9	84,3	57,06	17,60	10,31	29,15
V.....	66,5	0,89	2,29	121,6	84,2	53,26	14,85	11,03	27,38
W.....	65,0	0,77	2,29	123,3	83,7	54,26	17,12	10,45	26,69
IV. R.....	82,6	1,01	2,71	123,5	85,2	62,39	24,07	8,39	29,93
S.....	86,2	1,01	2,79	123,4	85,4	64,22	24,51	9,85	29,86
T.....	87,7	0,88	2,91	126,8	84,9	68,53	26,48	10,62	31,43
U.....	80,5	0,69	2,57	118,9	86,8	60,59	22,44	7,69	30,46
V.....	83,0	0,91	2,63	119,4	85,7	67,09	22,49	12,16	32,44
W.....	80,4	0,90	2,54	117,7	85,2	63,49	20,44	10,73	32,32

protidique nette (UPN) de l'azote varie en fonction du traitement thermique, mais les écarts observés sont dus aux variations, non de la valeur biologique, mais de la digestibilité réelle (CUDR). L'étude statistique de ces différences (tabl. 6)

TABLEAU 5

*Efficacité azotée des tourteaux de soja*

Animal-Période	Digestibilité apparente	Digestibilité réelle	Valeur biologique	Utilisation protidique nette
Tourteau A				
R <sub>I</sub> .....	81,4	87,9	78,1	68,6
S <sub>I</sub> .....	84,9	91,8	73,5	67,5
T <sub>IV</sub> .....	84,3	91,5	63,7	60,8
U <sub>IV</sub> .....	87,2	93,0	65,4	60,8
Moyenne .....	84,5	91,0	70,2	64,4
Tourteau B				
T <sub>I</sub> .....	83,8	91,7	72,3	66,3
U <sub>I</sub> .....	83,1	90,1	78,1	70,4
R <sub>IV</sub> .....	86,6	92,6	63,3	58,6
S <sub>IV</sub> .....	84,8	91,0	63,4	57,7
Moyenne .....	84,6	91,3	69,3	63,3
Tourteau C				
V <sub>I</sub> .....	77,8	86,5	75,5	65,3
W <sub>II</sub> .....	76,3	83,5	66,3	55,4
W <sub>III</sub> .....	80,5	88,0	71,6	63,0
V <sub>IV</sub> .....	81,6	88,2	67,2	59,3
Moyenne .....	79,1	86,5	70,2	60,7
Tourteau D				
W <sub>I</sub> .....	80,7	87,8	70,3	61,7
V <sub>II</sub> .....	73,7	81,9	74,6	61,1
V <sub>III</sub> .....	79,0	87,1	74,2	64,6
W <sub>IV</sub> .....	82,9	89,4	70,7	63,2
Moyenne .....	79,1	86,5	72,5	62,7
Tourteau E				
R <sub>II</sub> .....	73,8	80,8	74,0	59,8
S <sub>II</sub> .....	77,3	84,7	72,0	61,0
T <sub>III</sub> .....	79,5	86,5	69,7	60,3
U <sub>III</sub> .....	81,5	88,0	70,8	62,3
Moyenne .....	78,0	85,0	71,6	60,9
Tourteau F				
T <sub>II</sub> .....	70,9	79,5	70,3	55,9
U <sub>II</sub> .....	70,3	78,2	70,6	55,2
R <sub>III</sub> .....	76,4	81,9	68,8	56,3
S <sub>III</sub> .....	75,7	82,1	72,6	59,6
Moyenne .....	73,3	80,4	70,6	56,8

montre l'influence significative du mode d'extraction des lipides sur le CUDR et l'UPN et celle de la température du chauffage précédent le passage à la presse sur la digestibilité des protéines des tourteaux de soja.

TABLEAU 6

*Influence des traitements technologiques  
sur les coefficients d'utilisation digestive réelle (CUDR)  
et l'utilisation nette (UPN) de l'azote des tourteaux de soja chez le porc*

Facteur étudié	Tourteaux comparés	Différence	
		CUDR	UPN
Température du préchauffage .....	AB — CD	4,7 (1)	2,1
Vitesse de rotation de la presse .....	AC — BD	0,1	— 0,4
Mode d'extraction des lipides .....	ABCD — F	8,4 (1)	6,4 (1)
Extraction des solvants après passage à la presse .....	C — E	1,3	0,3

(1) Différences hautement significatives ( $P < 0,01$ )

TABLEAU 7

*Influence de la quantité de trypsine sur les taux d'azote soluble corrigé  
et de libération d'azote  $\alpha$ -aminé de tourteaux de soja cuit (G) et non cuit (F)*

Quantité de trypsine (mg)	N soluble % N initial		N soluble % N initial corrigé		N aminé % N initial	
	T. non cuit F	T. cuit G	T. non cuit F	T. cuit G	T. non cuit F	T. cuit G
0 .....	35,0	14,6	0	0	—	—
0,5 .....	50,6	15,2	15,6	—	7,3	8,1
1 .....	57,4	41,3	22,4	26,7	8,4	11,0
2,5 .....	64,6	52,8	29,6	38,2	9,3	11,2
5 .....	74,9	70,3	39,9	55,7	12,2	16,3
10 .....	79,4	80,0	44,4	65,4	14,0	18,8
20 .....	84,8	87,8	49,8	73,2	14,1	26,6
50 .....	87,5	89,7	52,5	75,1	18,1	36,5
100 .....	89,3	92,3	54,3	77,7	27,5	44,7

### Tests biochimiques

Il existe (fig. 1) une corrélation très élevée entre le taux de solubilité azotée globale et le pH du milieu solvant ( $r = 0,971 \pm 0,015$  pour F et  $r = 0,950 \pm 0,027$  pour G.) La reproductibilité et la précision de cette mesure impliquent donc néces-



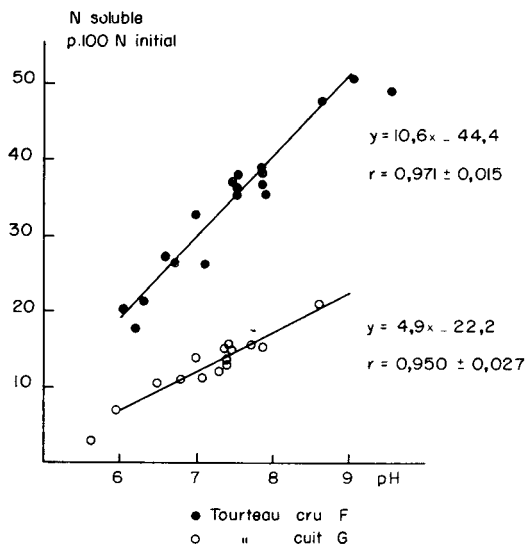


FIG. 1. — Variation, en fonction du pH final, de la solubilité azotée de deux tourteaux de soja, cru et cuit

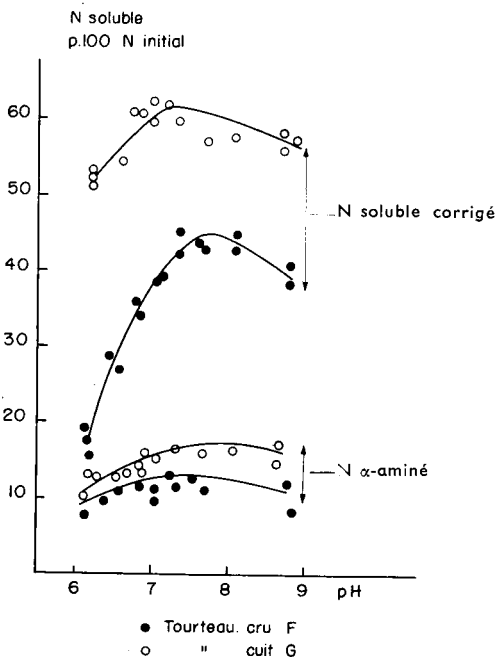


FIG. 2. — Variation, en fonction du pH final, des taux d'azote soluble corrigé et d'azote α-aminé libéré en présence de trypsine pour deux tourteaux de soja, cru et cuit

sairement le maintien d'un pH constant. Cela confirme les résultats de SMITH (1958) qui montrent la très forte influence du pH sur la solubilité azotée, lorsque celui-ci est inférieur à 7.

Les tests de solubilité azotée globale et de libération d'azote  $\alpha$ -aminé sous

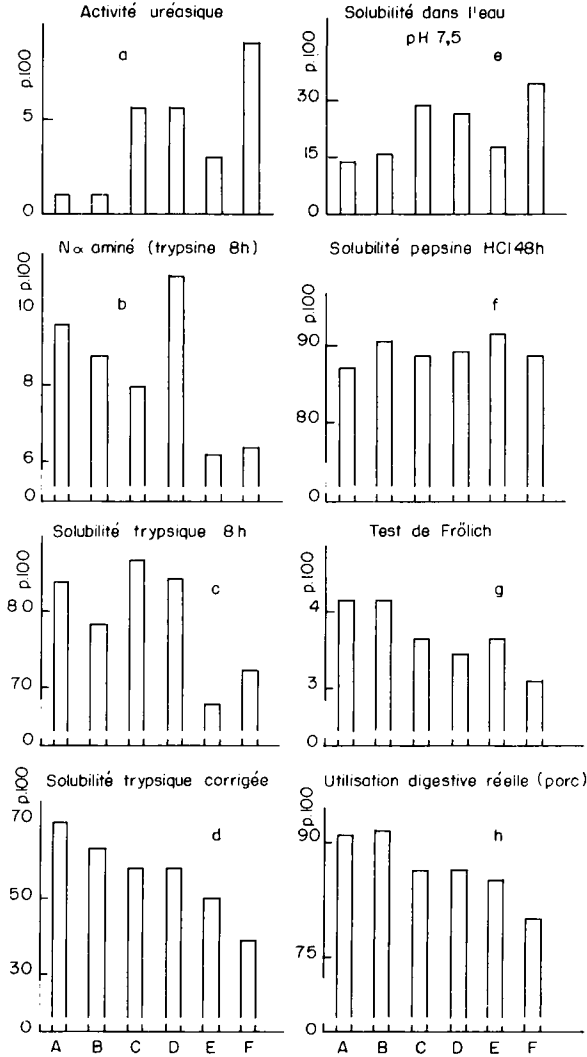


FIG. 3. — Comparaison de quelques tests d'appréciation de l'efficacité azotée des tourteaux de soja en fonction de leur degré de cuisson

l'action de la trypsine, appliqués à deux tourteaux cru (F) et cuit (G) permettent de distinguer les deux produits (fig. 1 et 2).

Les données concernant les six tourteaux expérimentaux (A à F) sont réunies dans la figure 3. Elles montrent que :

— les solubilités dans l'eau varient en fonction inverse de l'intensité du trai-

tement thermique et constituent un premier test parallèle à celui de l'activité uréasique (fig. 3 *a* et 3 *e*). Il faut cependant remarquer que l'activité uréasique et la solubilité azotée du tourteau E sont inférieures à celles du tourteau C, alors que les traitements thermiques subis par ces deux produits sont peu différents ;

— le test de solubilité trypsique n'est pas assez sensible pour permettre une discrimination nette entre échantillons (fig. 3 *c*) ; par contre, le taux de « solubilité trypsique corrigée » calculé par différence entre les taux de solubilité azotée globale en présence et en absence de trypsine permet un classement satisfaisant des tourteaux en fonction de l'intensité du traitement thermique (fig. 3 *d*). Remarquons toutefois que nos données ne représentent pas des valeurs absolues car elles peuvent varier largement en fonction de l'activité de la préparation enzymatique et du rapport enzyme-substrat.

Dans la présente expérience, le test pepsine-HCl ne permet pas non plus une discrimination entre les 6 échantillons en cause (fig. 3 *f*). Le test de FRÖLICH au rouge de crésol offre par contre une bonne corrélation avec le degré de cuisson des tourteaux (fig. 3 *g*).

Le taux de libération d'azote  $\alpha$ -aminé paraît, à cet égard, un test d'autant moins intéressant que la précision du dosage est faible, en raison des quantités limitées de cette forme d'azote libérées au cours de l'hydrolyse enzymatique.

## DISCUSSION

Les températures de chauffage de nos tourteaux ont été mesurées par des appareils de contrôle industriel. La précision de ces données n'est pas très élevée, mais correspond aux conditions de la pratique.

L'origine et les conditions de conservation des six tourteaux sont identiques et les résultats obtenus reflètent donc bien l'influence de la technologie. Ces six produits ne représentent toutefois qu'un éventail de traitement assez restreint : le tourteau « cru » F a été chauffé lors du conditionnement de la graine (tabl. I) et pour l'évaporation du solvant résiduel, après extraction de l'huile ; d'autre part, les tourteaux « cuits » A et B possèdent encore une légère activité uréasique. Nos essais ne peuvent donc pas toujours se comparer aux études portant soit sur des graines crues, soit sur des produits très cuits.

Les travaux que nous avons menés parallèlement nous permettent, à partir des bilans effectués sur porcs en croissance, de comparer les divers coefficients d'utilisation azotée à plusieurs tests biochimiques d'estimation du degré de cuisson.

### *Bilans azotés in vivo*

Les données *in vivo* relatives aux tourteaux les plus cuits (A et B) sont en bon accord avec celles de la littérature ; le coefficient d'utilisation digestive réelle (CUDR) et la valeur biologique (VB) du tourteau sont respectivement chez le rat : 89,6 et 71,3 (HENRY *et al.*, 1961) et chez le porc, 88,7 et 73,3 (COLUMBUS, 1950), 93,5 et 76 (ARMS-TRONG *et MITCHELL*, 1955) tandis que nos valeurs sont de 91,2 et 69,8. Par contre, la

valeur biologique mesurée par NEHRING et LAUBE (1961) chez ce dernier animal est nettement plus faible (60,0).

La digestibilité apparente et réelle de l'azote de notre tourteau « cru » est significativement plus basse que celle de nos tourteaux les plus cuits, ce qui recoupe les résultats recueillis sur le poulet (EVANS et MCGINNIS, 1946) et sur le rat, (GEBHART et COLUMBUS, 1957). Cet effet pourrait être rapporté à un retard (CARROLL *et al*, 1953) ou à un blocage (ALUMOT et NITSAN, 1961) de la protéolyse intestinale, par formation de complexes insolubles entre la trypsine et son inhibiteur (LEPKOWSKY *et al*, 1959). Il pourrait être aussi être relié à une sécrétion accrue d'enzymes pancréatiques (LYMAN et LEPKOWSKY, 1957) conduisant à un accroissement de la dépense métabolique fécale et à des besoins accrus en certains acides aminés nécessaires à cette sécrétion (HAINES et LYMAN, 1961). Il s'ensuivrait une modification du *pool* métabolique entraînant une excrétion plus élevée d'azote et donc, dans certains cas, une diminution de la rétention, phénomène que nous n'observons pas chez nos porcs.

Malgré la différence des conditions technologiques subies par les tourteaux, leurs valeurs biologiques restent très proches les unes des autres. Ce résultat s'oppose à ceux que citent JACQUOT *et al* (1947) et LIENER (1958) chez le rat, pour lequel l'intensité du traitement thermique entraîne des modifications de la valeur biologique des protéines du tourteau ; mais il s'accorde avec les données de RICHTER et SCHILLER (1959) qui, dans un travail très complet effectué également sur rat, constatent que, si graine crue et tourteau cru diffèrent surtout par leur valeur biologique, tourteaux crus et tourteaux cuits se différencient essentiellement par le coefficient d'utilisation digestive de leurs protéines.

LIENER (1958) attribue l'amélioration de la valeur biologique du tourteau cuit à une meilleure utilisation de sa méthionine ; l'un des rôles métaboliques de cet acide aminé étant celui de donateur de méthyl, on pourrait penser que la présence dans le régime de nos porcs de quantités élevées de choline et de vitamine B<sub>12</sub> a atténué l'effet de la carence de méthionine et pu masquer l'influence du traitement thermique sur la disponibilité de cet acide aminé.

Dans la limite d'un chauffage nettement insuffisant (tourteau F), légèrement insuffisant (tourteaux CDE.) ou correct (tourteaux A et B), notre essai fait ressortir l'existence d'une relation entre traitement thermique et utilisation protéique nette ou plus exactement coefficient de digestibilité réelle, car les valeurs biologiques sont identiques ; par contre il ne donne pas d'indications sur l'influence d'un surchauffage.

#### *Tests biochimiques*

Les tests d'activité uréasique et de solubilité dans l'eau permettent de reconnaître parmi divers échantillons celui qui est insuffisamment cuit (fig. 3 a ; 3 e). C'est à une même conclusion qu'aboutissent les travaux de BIRD *et al*. (1947) qui tendent à relier le test d'activité uréasique à une mesure de croissance sur poulet. De même, WOTTLING et PENCHINAT (1962) trouvent, dans la plupart des cas, une bonne corrélation entre la croissance du poulet, l'activité uréasique et la solubilité de la fraction azotée dans une solution aqueuse à 0,2 p. 100 de soude. Mais l'application de ces tests se révèle parfois insuffisante pour caractériser certains produits.

Dans un travail antérieur (DELORT-LAVAL et ZELTER, 1960), l'épreuve à la pepsine n'avait pas permis de différencier un tourteau cru d'un tourteau grillé. Dans la présente expérience, ce test ne permet pas non plus une discrimination entre nos 6 échantillons. On peut penser qu'en l'occurrence, les zones thermiques étudiées (105°C-120°C ; cf. tabl. I) n'ont pas été suffisamment étendues pour modifier le comportement des protéines du soja envers cette enzyme.

L'indice de FRÖLICH offre une corrélation très étroite ( $r = 0,95$ ) avec les coefficients d'utilisation digestive réelle des protéines de nos 6 produits. Cette observation rejoint celles de cet auteur et celles, plus récentes, d'ASCARELLI et GESTETNER (1962) pour lesquels la fixation du rouge de crésol est, parmi les tests étudiés (uréase, lysine disponible, activité antitrypsique, méthionine disponible), celui qui présente la meilleure corrélation avec la croissance du poulet.

La solubilité trypsique corrigée, telle que nous l'avons définie, montre une corrélation très étroite ( $r = 0,96$ ) avec les coefficients d'utilisation digestive réelle des protéines de nos six échantillons. Il n'en va pas de même du taux de libération d'azote  $\alpha$ -aminé, en raison notamment de la précision insuffisante du dosage. D'ailleurs, contrairement à INGRAM et al (1952), CLANDININ et ROBBLEE (1952) ne considèrent pas l'hydrolyse enzymatique comme un test sûr de la qualité des tourteaux : des produits, dont le rendement biologique est excellent, peuvent en effet fournir par hydrolyse enzymatique des quantités d'acides aminés ou d'azote aminé très différentes. Ce point de vue est confirmé par les travaux d'ANWAR (1962), lequel ne trouve pas de relation entre croissance du poulet et taux de libération d'azote aminé.

Aucun des échantillons étudiés n'ayant subi de surcuisson, il n'est pas possible de dire que le test de solubilité trypsique corrigée en permettrait le diagnostic ; et compte tenu des zones thermiques dans lesquelles nos tourteaux ont été travaillés, ce test n'autorise pas davantage à affirmer que l'activité antitrypsique a été totalement inhibée. Toutefois, sa signification, du point de vue de la destruction des facteurs antinutritionnels de la graine de soja, est vraisemblablement plus large que celle de l'uréase, dont le seuil d'inactivation est plus bas.

Enfin, aucun des tests biochimiques mentionnés ne peut se relier aux valeurs biologiques, similaires pour tous les produits.

*Reçu pour publication en octobre 1963.*

## SUMMARY

EFFICIENCY OF SOME DIETARY PROTEINS IN THE PIG.

V. — INFLUENCE OF THE MODE OF OIL EXTRACTION

ON THE PROTEIN EFFICIENCY OF SOYBEAN OIL MEALS.

VALUE OF SOME BIOCHEMICAL TESTS FOR THE ESTIMATION OF THEIR QUALITY

The well-known improvement of soybean quality by heat treatment can be explained by the inactivation or destruction of some toxic substances. But excessive heat may denature the proteins and decrease their biological value. Thus, the knowledge of the intensity of heat treatment is important for the estimation of the protein efficiency of soybean oil meals.

This intensity can be appreciated by biochemical tests (solubility or reactivity of proteins,

residual activity of enzymes present in the raw seed), but they are of value only if they are well correlated with the result of *in vivo* assays. The purpose of our study was to compare different biochemical tests (urease, solubility in presence or in absence of proteolytic enzymes, dye-binding test (FRÖLICH, 1954)) to the protein efficiency of six different soybean oil meals, processed in the same, plant from the same seed, under controlled conditions (table 1).

The reference data on the animal (biological value, apparent and true digestibility, net protein utilisation) were obtained on the pig by the technique of THOMAS-MITCHELL (MITCHELL, 1923). Six animals, placed in individual metabolic crates during 5 experimental periods of eight days, separated by adaptation periods of at least the same duration, received the soybean meals as a complement to protein-free diet so as to attain 10 p. 100 digestible crude protein per feeding unit. The initial weight of the animals was about 30 kg; they were fed according to their liveweight (4 p. 100) and appetite. The results (table 5) show that the main differences are found in digestibility and not in biological value. Some of these differences are highly significant (table 6), such as the mode of oil extraction (press/solvent) and the temperature of pre-cooking before the « expeller » processing (105°C-120°C).

The application of biochemical tests was preceded by a study on the solubility of soybean proteins in absence and in presence of trypsin. The results show :

— the important influence of pH on the solubility of the protein fraction of 1 g soybean oil meal in 100 ml water, containing 0,5 g  $KPO_4H_2$  and adjusted to pH, between 6 and 9, with N-NaOH, after eight hours, at 40°C (fig. 1) ;

— the role of pH (fig. 2) and of the quantity of trypsin (table 7) in the protein solubility of raw (F) and heated (G) soybean oil meals ;

— that the « corrected tryptic solubility », obtained by difference between solubilities in absence and in presence of trypsin, allows a good estimation of the intensity of heat treatment in soybean oil meals.

The comparison of biochemical tests with true digestibility of protein *in vivo* (fig. 3) show that :

— urease activity (SCHRAMM and AINES, 1959) and water solubility (fig. 3 a and 3 e) make possible the detection of insufficiently heated meal F, but are of less value for the differentiation of more cooked meals (A to E).

— peptic (fig. 3 f) and tryptic (fig. 3 c) protein digestion are ineffective for the distinction of the six meals,

— the dye-binding test of FRÖLICH (fig. 3 g) and our « corrected tryptic solubility » (fig. 3 d) show the best correlation (resp.  $r = 0,95$  and  $r = 0,96$ ) with the true digestibility and may represent a valuable index of heat treatment (if not excessive) of the industrially processed soybean oil meals.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALMQUIST H. J., MERRITT J. B., 1951. Effect of soybean antitrypsin on experimental amino acid deficiency in the chick. *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 450-453.
- ALMQUIST H. J., MERRITT J. B., 1953. Accentuation of dietary amino acid deficiency by raw soybean growth inhibitor. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **84**, 333-334.
- ALMQUIST H. J., MAURER S., 1953. A method for study of the effects of heat on the nutritive value of soybean oil meal. *Poultry Sci.*, **32**, 549-550.
- ALUMOT Eugénia, NITSAN T., 1961. The influence of soybean antitrypsin on the intestinal proteolysis of the chick. *J. Nut.*, **73**, 71-77.
- ANWAR A., 1962. Nutritive value of soybean meal as measured by chemical and physical methods. *Poultry Sci.*, **44**, 1915-1918.
- ARMSTRONG D. G., MITCHELL H. H., 1955. Protein nutrition and the utilisation of dietary protein at different levels of intake by growing swine. *J. anim. Sci.*, **14**, 49-68.
- ASCARELLI I., GESTETNER B., 1962. Chemical and biological evaluation of some protein feeds for poultry. *J. Sci. Food Agric.*, **8**, 401-410.
- BALLOUN S. L., JOHNSON E. L., ARNOLD L. K., 1953. Laboratory estimation of the nutritive value of soybean oil meals. *Poultry Sci.*, **32**, 517-527.
- BECKER D. E., ADAMS C. R., TERRILL S. W., MEADE R. J., 1953. The influence of heat treatment and solvent upon the nutritive value of soybean oil meal for swine. *J. anim. Sci.*, **12**, 107-116.
- BELTER P. A., SMITH A. K., 1952. Protein denaturation in soybean meal during processing. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **29**, 170-174.
- BIRD H. R., BOUCHER H. V., CASKEY C. D. Jr, HAYWARD J. W., HUNTER J. E., 1947. Urease activity and other chemical criteria as indicators of inadequate heating of soybean oil meal. *J. Ass. Off. Agri. Chem. Wash.*, **30**, 354-364.

- BIRK Y., GERTLER A., 1961. Effect of mild chemical and enzymatic treatments of soybean meal and soybean trypsin inhibitors on their nutritive and biochemical properties. *J. Nutr.*, **75**, 379-387.
- BOOTH A. N., ROBBINS D. J., RIBELIN W. E., D. Eds F., 1960. Effect of raw soybean meal and amino acids on pancreatic hypertrophy in rats. *Proc.Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 681-683.
- BORCHERS R. D., ACKERSON C. W., SANDSTEDT R. M., 1947. Trypsin inhibitor III. Determination and heat destruction of the trypsin inhibitor of soybean. *Arch. Biochem.*, **12**, 369-374.
- BORCHERS R. D., WEAVER J. M., 1955. Antibiotic growth stimulation of rats fed raw soybean oil meal. *J. Agric. Fd. Chem.*, **5**, 371-373.
- CARROLL R. W., HENSLEY G. W., SITTLER C. L., WILCOX E. L., GRAHAM W. R. Jr., 1953. Absorption of nitrogen and amino acids from soybean meal as affected by heat treatment or supplementation with aureomycin and methionine. *Arch. Biochem. Biophys.*, **45**, 266-269.
- CASKEY C. D., KNAPP Frances C., 1944. Method for detecting inadequately heated soybean oil meal. *Ind. Eng. Chem.*, **16**, 640-641.
- CHERNICK S. S., LEPKOWSKY S., CHAIKOFF I. L., 1948. A dietary factor regulating the enzyme content of the pancreas; changes induced in size and proteolytic activity of the chick pancreas by the digestion of raw soybean meal. *Amer. J. Physiol.*, **155**, 33-41.
- CLANDININ D. R., ROBBLEE A. R., 1952. The effect of processing on the enzymatic liberation of lysine and arginine from soybean oil meal. *J. Nutr.*, **46**, 525-530.
- COLUMBUS A., 1950. Die Variabilität des biologischen Eiweisswertigkeit unter verschiedenen Bedingungen nach Stoffwechslversuchen an wachsenden Schweinen. *Arch. Tierernähr.*, **1**, 38-55, 84-128.
- DANGOUMAU A., DEBRUYNE H., CLUZAN R., 1951. Note sur les traitements thermiques du soja et du colza. *Bull. Inf. ITERG.*, **5**, 306-310.
- DANGOUMAU A., DEBRUYNE H., 1955. Vérification du traitement thermique du tourteau de soja. *Rev. Franç. Corps Gras.*, **6**, 399-393.
- DELORT-LAVAL J., ZELTER S. Z., 1960. État actuel du problème de la qualité des tourteaux de soja et de son contrôle par des tests chimiques. *Ind. Alim. anim.*, **110**, 25-34.
- DELORT-LAVAL J., ZELTER S. Z., 1963. Effet de la conduite du séchage à la flamme sur la valeur biologique de farines de harengs chez le porc. *Ann. Zootech.*, **12**, 193-202.
- EVANS R. J., Mc GINNIS J., 1946. Influence of autoclaving soybean meal on the availability of cystine and methionine for the chick. *J. Nutr.*, **31**, 446-461.
- FISHER H., JOHNSON D. Jr., 1958. The effectiveness of essential amino acid supplementation in overcoming the growth depression of unheated soybean meal. *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 124-128.
- FRÖLICH A., 1954. Reaction between phtalein dyes and heated foodstuffs. *Nature.*, **174**, 879.
- GEHARDT G., COLUMBUS A., 1957. Einfluss von Antibiotikazusätzen auf die Verwertung entölter Sojabohnen vor und nach einer Hitzebehandlung. *Z. Tierernähr.*, **12**, 285-304.
- HAINES Phyllis, LYMAN R. L., 1961. Relationship of pancreatic enzyme secretion to growth inhibition in rats fed soybean trypsin inhibitor. *J. Nutr.*, **74**, 445-452.
- HAM W. E., SANDSTEDT R. M., 1944. A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. *J. Biol. Chem.*, **154**, 505-506.
- HAYWARD J. W., STEENBOCK H., BOHSTEDT G., 1936. The effect of heat as used in the extraction of soybean oil upon nutritive value of the protein of soybean oil meal. *J. Nutr.*, **11**, 219.
- HENRY Kathleen M., CORMACK R. M., KOSTERLITZ H. W., 1961. The determination of the nutritive value of a protein by its effect on liver nitrogen in rats. *Brit. J. Nutr.*, **15**, 199-212.
- INGRAM G. R., RIESEN W. H., CRAVENS W. W., ELVEHJEM C. A., 1949. Evaluating soybean oil meal protein for chick growth by enzymatic release of amino acids. *Poultry Sci.*, **28**, 898-902.
- JACQUOT R., MATET J., FRIDENSON O., 1947. Influence du traitement thermique industriel sur la valeur protidique des aliments. *Ann. Nutr., Paris.* **1**, 157-213.
- KUNITZ M., 1946. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, **29**, 149-154.
- LEPKOWSKY S., BINGHAM E., PENCHARZ R., 1959. The fate of the proteolytic enzymes from the pancreatic juice of chicks fed raw or heated soybean. *Poultry Sci.*, **38**, 1289-1295.
- LIENER I. E., 1953. Soyin, a toxic protein from the soybean. I. Inhibition of rat growth. *J. Nutr.*, **49**, 527-539.
- LIENER I. E., 1958. Effect of heat on plant proteins. In *Processed plant protein foodstuffs*. A. M. ALTSCHUL. Academic Press, New York.
- LUND A. P., SANDSTRÖM W. M., 1943. The proteins of various tree seeds. *J. Agric. Res.*, **66**, 349-356.
- LYMAN R. L., LEPKOWSKY S., 1957. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. *J. Nutr.*, **62**, 269-284.
- MICHEL M. C., 1961. Dosage de l'azote aminé dans quelques liquides biologiques. *Ann. Biol. anim. Biochim. Biophys.*, **1**, 248-255.
- MITCHELL H. H., 1923. A method of determining the biological value of protein. *J. Biol. Chem.*, **58**, 872-903.
- MORAN E. T. Jr., JEHSN I. S., Mc GINNIS J., 1963. Dye binding by soybean and fish meal as an index of quality. *J. Nutr.*, **79**, 239-244.
- NEHRING K., LAUBE N., 1961. Untersuchungen über die biologische Eiweisswertigkeit verschiedener Futterstoffe bei wachsenden Schwein. I. *Z. Tierphysiol., Tierernähr.* **16**, 121-132.

- OSBORNE T. B., MENDEL L. B., 1917. The use of soybean as food. *J. Biol. Chem.*, **32**, 369-376.
- RICHTER K., SCHILLER K., 1959. Die Wirkung von Dampferhitzen (Toasten) auf die biologische Eiweisswertigkeit von Sojaschrot. *Z. Tierphysiol., Tierernähr*, **14**, 241-252.
- RIESEN W. H., CLANDININ D. R., ELVEHJEM C. A., CRAVENS W. W., 1947. Liberation of essential amino acids from raw, properly heated and overheated soybean oil meals. *J. Biol. Chem.*, **167**, 143-150.
- SCHRAMM G., AINES P. D., 1959. Colorimetric determination of urease activity in soybean meals. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **36**, 1-3.
- SMITH A. K., 1958. Vegetable protein isolates. In *Processed plant protein foodstuffs*, 249-276. A. M. ALTSCHUL, Academic Press, New York.
- SUMNER R. J., TRESSLER D. K., 1943. Lipid oxydase in soybean meals. *Ind. Eng. Chem.*, **35**, 921.
- SUMNER J. B., SOMERS G. E., 1947. *Chemistry and Methods of Enzymes*. Academic Press, New York.
- WILGUS H. S., NORRIS L. C., 1936. Effect of heat on nutritive value of soybean oil meal. *Ind. Eng. Chem.*, **28**, 586-588.
- WOTTLING H., PENCHINAT A., 1962. Vérification zootechnique des critères d'appréciation des tourteaux de soja cuit. *Rev. Franç. Corps Gras.*, **3**, 141-144.
- ZELTER S. Z., CHARLET-LÉRY Geneviève., 1961. Efficacité de quelques protides alimentaires chez le porc. I. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **1**, 29-46.
- ZIMMERMANN G., 1952. *Die Wirkung der Hitzebehandlung auf der Nährwert des Eiweisses in Nahrungs- und Futtermitteln*. Juris Verlag, Zürich.
-