

MODIFICATIONS DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE LA LUZERNE DURANT L'ENSILAGE

ACTION PROTECTRICE COMPARÉE DE LA SOLUTION AIV,
DU GLUCOSE, DU MÉLANGE AMIDON-MALT ET DE L'URÉE.

A. DEVUYST, W. VERVACK, R. ARNOULD, M. VANBELLE,
M. AUSLOOS et A. MOREELS

*Université de Louvain,
Centre de Recherches zootechniques de l'Université, Lovenjoel (Belgique)*

SOMMAIRE

Cent soixante et onze échantillons de luzerne ont été ensilés dans des bocaux en verre d'un litre et demi avec des doses variables de glucose, d'amidon malté, d'urée, et d'acides minéraux forts. On a suivi la cinétique de la dégradation des protéines (formation d' NH_3), des pertes en azote protéique total et en 17 acides aminés.

Les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

A. — *Allure générale de la dégradation des protéines* (tabl. 1)

1. *Durée et intensité.*

La dégradation des protéines évolue très rapidement ; elle est pratiquement terminée après 3 semaines.

Le pourcentage de l'azote total se retrouvant sous forme d' NH_3 ne représente qu'une faible part de l'azote des acides aminés étudiés. Pour 15 p. 100 d' $\text{N NH}_3/\text{N}$ total, on observe en réalité 40 p. 100 de pertes en protéine vraie totale et 40 p. 100 de pertes en azote des 17 acides aminés dosés.

2. *Évolution individuelle des acides aminés.*

L'arginine et l'histidine disparaissent presque totalement. La thréonine, la tyrosine, la lysine, les acides aspartique et glutamique, la sérine et la proline disparaissent pour 40 p. 100.

D'autres acides aminés sont moins vulnérables ; notamment, la phénylalanine, la glycine, la valine, la méthionine et la leucine. On constate un léger gain en isoleucine. Les seuls acides aminés qui se forment en quantités importantes dans les silos n'ont pas grande importance en alimentation : l'alanine double sa teneur et l'acide α -amino-butyrique apparaît dans l'ensilage sans avoir été décelé dans la luzerne d'origine. (L'augmentation des teneurs en ces deux acides aminés est un indice de l'intensification des fermentations putrides.)

B. — *Dégradation des protéines dans les ensilages avec des acides minéraux forts*

Dans les ensilages AIV, les destructions d'acides aminés sont 3 à 4 fois moins importantes que dans les ensilages ordinaires (tabl. 2).

C. — *Effet du glucose et de l'amidon malté sur la destruction des protéines*

L'emploi de glucose (2 p. 100) ou d'amidon malté (6 p. 100) améliore également le bilan des acides aminés mais de manière beaucoup moins importante (tabl. 4).

D. — *Effet de l'urée sur la dégradation des protéines* (tabl. 4)

L'azote de l'urée (à la dose de 2 p. 1 000 d'urée dans la luzerne) ne sert en aucune façon à la synthèse de protéines bactériennes dans l'ensilage. En présence d'urée, tous les acides aminés sont plus fortement détruits (à l'exception de l'alanine, de l'isoleucine et de l'acide α -amino-butérique dont les teneurs augmentent en présence d'urée mais dont la formation est un signe d'intensification des fermentations putrides).

L'addition d'urée dans les ensilages augmente donc les pertes protidiques pendant la conservation.

INTRODUCTION

En physiologie digestive du ruminant, on accorde une importance croissante à la nature de la fraction azotée de la ration qui atteint le rumen (BLACKBURN, 1965). Dans tous les ensilages, les protéines du fourrage subissent des modifications plus ou moins profondes selon que la conservation est bonne ou mauvaise (BARNETT, 1954). Pour apprécier l'efficacité d'un traitement de conservation, nous considérons avec ZELTER et SALOMON (1959) que le degré de protéolyse est le critère le plus valable. Cette protéolyse peut s'arrêter au stade d'amino-acides en passant par celui de polypeptides et peptides, mais la dégradation peut même porter atteinte à l'amino-acide lui-même qui peut être désaminé ou décarboxylé. Dans cette protéolyse, les enzymes d'origine végétale interviennent probablement au début (GOUET et FATIANOFF, 1964) et l'on s'efforce expérimentalement de réaliser des ensilages avec des fourrages bactériologiquement stériles afin de déterminer la part respective des enzymes d'origine végétale et bactérienne dans ces phénomènes (KEMBLE, 1956).

Les connaissances actuelles concernant les modifications de la répartition des acides aminés au cours du processus fermentaire sont assez fragmentaires. Or, comme le soulignent ZELTER et SALOMON (1959), l'établissement d'un bilan biochimique complet en amino-acides s'avère indispensable pour l'étude de l'efficacité comparée des traitements de protection.

Dans la plupart des études, on a surtout relevé les modifications des teneurs en acides aminés libres de l'ensilage. (BARNETT, 1954 ; MAYNONE et *al.*, 1963 ; KEMBLE, 1956 ; ZELTER et SALOMON, 1959 ; LANDIS, 1960 ; BRADY, 1960 et 1965 ; MACPHERSON et VIOLANTE, 1966 *a* et 1966 *b* ; GOUET et *al.*, 1965). Certaines études rapportent le bilan complet pour quelques acides aminés (VIRTANEN, 1957 ; SCHARRER et RÄCKER, 1958 et 1959 ; LANDIS, 1960 ; PLATKANOW et SANDEW, 1961). Selon les

conditions de conservation (pH, taux de matière sèche, température...) l'azote aminé de l'ensilage peut subir des modifications profondes, qui peuvent affecter plus ou moins sérieusement la valeur biologique des protéines présentées aux ruminants. L'aspect quantitatif de cette redistribution azotée n'est pas encore totalement élucidé (BRADY, 1965 ; MACPHERSON et VIOLANTE, 1966 a). Les recherches sur les bilans biochimiques complets en amino-acides ont été jusqu'ici assez limitées.

Nous avons entrepris d'approfondir cet aspect de la modification des teneurs en amino-acides durant la conservation des ensilages en étudiant son évolution dans le temps et en essayant de dégager l'action protectrice de plusieurs traitements couramment appliqués en Belgique.

Nous avons étudié le taux de destruction ou de formation dans les silos de 17 acides aminés. Nous avons tenté de mettre ces variations en relation avec l'orientation des fermentations dans les ensilages (fermentations lactique, acétique, butyrique, putride...) et leurs conditions (pH, présence de sucres...).

Pour cela, nous avons réalisé un total de 400 silos de luzerne (microsilos de laboratoire) dans les conditions les plus variables. Nous y effectuons les bilans à des temps de conservation variant de 24 heures à plusieurs mois.

Cette étude porte sur une série de 171 silos de luzerne sur lesquels nous avons :

- 1° mesuré l'intensité de la protéolyse, le bilan des acides aminés et leur évolution dans le temps ;
- 2° étudié l'effet de conservants tels que le sucre, l'amidon malté, la solution AIV sur l'évolution de la dégradation des protéines ;
- 3° essayé de savoir si l'azote de l'urée ajoutée peut servir à la synthèse de protéines bactériennes et améliorer le bilan de la fraction aminée, comme le trouvent MODJANOW *et al.* (1960) ;
- 4° déterminé le meilleur mode d'expression des pertes azotées dans un silo (bilan de l'azote total, bilan de l'azote protéique total ou rapport azote ammoniacal/azote total ($N NH_3/N$ total)).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Condition de l'expérience

Le meilleur matériel pour étudier la dégradation des protéines est la luzerne car elle contient de fortes teneurs en protéine et sa conservation est rendue difficile par manque de sucres fermentescibles.

Afin d'obtenir des conditions d'ensilage et de conservation variables, nous avons ajouté à certains ensilages des produits de conservation :

- 1° du glucose (à la dose maximum de 2 p. 100) ;
- 2° de l'amidon malté (mélange composé de 5 parties d'amidon et d'une partie de malt moulu ; le malt étant destiné à transformer l'amidon en glucides disponibles pour les ferments lactiques). Nous avons employé ce mélange à des taux trois fois supérieurs à ceux du glucose car nous avons observé lors d'essais antérieurs (DEVUYST *et al.*, 1966 a) que le rendement de l'amidon malté (taux de transformation en acide lactique par les bactéries de l'ensilage) est trois fois moins bon que celui du sucre (33 p. 100 au lieu de 95-100 p. 100) ;
- 3° des acides minéraux forts (système AIV) au taux de 15 équivalents-grammes d'acides par 100 kg de luzerne. Ces ensilages AIV servent de témoins pour indiquer l'optimum de réussite qu'il est possible d'atteindre dans les conditions de l'expérience ;

4° de l'urée à la dose maximum de 2 p. 100.

Nous avons déjà montré (DEUYST et *al.*, 1966 *b*) que l'urée, à des taux semblables, n'apporte pas grande modification à la réussite des ensilages. Nous vérifions ici son action sur la dégradation des protéines. Nous nous proposons, entre autres, de contrôler si elle peut servir de matériau de base à une synthèse protéique bactérienne dans l'ensilage.

Schéma expérimental

Nous avons réalisé notre expérience sur une série de 171 microsilos de luzerne. Ces microsilos sont des bocaux à stériliser de ménage de un litre et demi. Nous les remplissons jusqu'au bord au moyen de 1 250 g de luzerne (broyée par une ensileuse lacéreuse Lundell) et nous les fermons par leur couvercle de verre pressé par une pince sur un joint de caoutchouc (équipement normal du bocal à stériliser), (DEUYST et *al.*, 1964). Ces 171 silos sont répartis en 9 séries de 19 silos pour étudier des durées croissantes de conservation et suivre l'évolution des fermentations. Les temps de conservations sont de 1, 4, 7, 11, 20, 47, 77, 120 et 166 jours.

Dans chaque série de 19 bocaux, nous avons introduit :

- 1° de l'acide AIV servant de traitement témoin ;
- 2° trois taux d'urée (0 p. 1 000, 1 p. 1 000, et 2 p. 1 000) ;
- 3° trois taux de glucose (0 p. 1 000, 1 p. 1 000 et 2 p. 1 000 ;
- 4° trois taux d'amidon (0 p. 1 000, 3 p. 1 000 et 6 p. 1 000.

La figure 1 schématise la répartition des conservants dans chaque série de 19 silos.

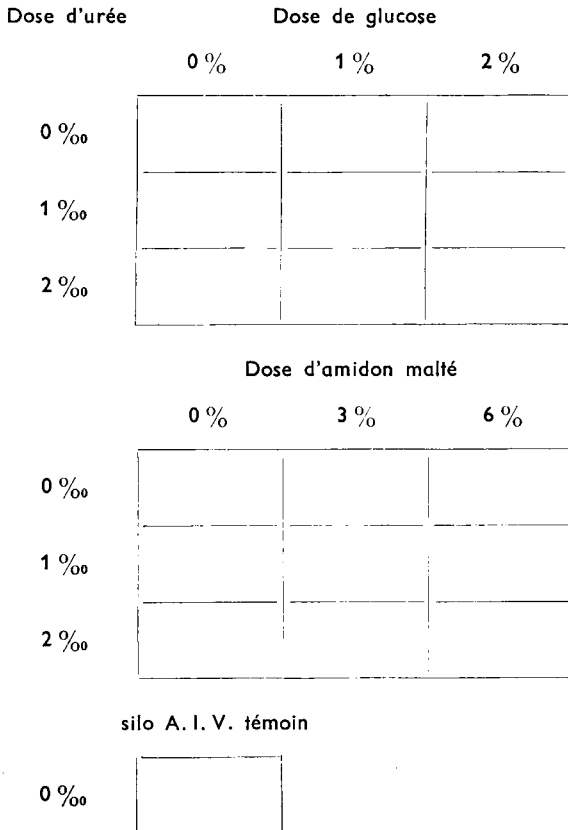


FIG. 1. — *Plan expérimental*
Schéma d'une série de 19 silos

Méthodes d'analyse

— Les acides gras volatils ont été dosés par distillation fractionnée (méthode de LEPPER-FLIEG, 1937).

— L'azote protéique total est déterminé par la méthode de Stutzer (méthode officielle belge par précipitation à l'hydroxyde de cuivre, filtration et détermination de l'azote sur filtre).

— L'azote total est déterminé par la méthode Kjeldahl.

— L'azote soluble s'obtient par différence entre les deux dosages précédents.

— Les acides aminés sont déterminés par la méthode de MOORE et STEIN (MOORE et *al.*, 1958) sur colonne d'amberlite IR 120, chromatographie grade, type 3, après une hydrolyse par HCl 6 N, à ébullition, sous réfrigérant à reflux, pendant 22 heures. Comme source de chaleur, nous utilisons des Infrabath. L'hydrolysate est porté à un volume connu, dont une partie aliquote est concentrée dans un évaporateur rotatif de Graigg pour éliminer l'acide chlorhydrique. On reprend ensuite par un tampon à pH 2,2 et on amène à un volume tel que 1 ml contienne entre 1,5 et 2 mg d'azote total.

Afin de ne pas avoir de pertes en acides aminés, nous ne séchons pas les échantillons d'ensilage, l'hydrolyse est faite sur matière fraîche homogénéisée. Cette méthode d'hydrolyse ne porte pas atteinte aux acides aminés libres ainsi que l'ont démontré de nombreux auteurs (DUSTIN et *al.*, 1953 ; ADRIAN, 1963 ; ROACH, 1966 ; DEVUYST et *al.*, 1968).

RÉSULTATS

Pour chacun des 171 ensilages, nous avons mesuré :

- le pH,
- les teneurs en acides butyrique, acétique et lactique (en p. 100 de la matière fraîche),
- les teneurs en matière azotée totale ($N \times 6,25$) et en protéine vraie totale (Azote Stutzer $\times 6,25$) en p. 100 de la matière fraîche,
- la teneur en NH_3 et le rapport Azote ammoniacal/Azote total ($N NH_3/N$ total en p. 100),
- les teneurs en 17 acides aminés exprimées en grammes d'acides aminés par 100 grammes de matière azotée totale.

Pour les ensilages contenant de l'urée, les teneurs en acides aminés sont exprimées en p. 100 de la matière azotée totale en excluant l'azote provenant de l'urée ajoutée à la mise en silo.

Les résultats sont résumés dans les tableaux 1 et 2.

Dans le tableau 1, figurent les résultats des ensilages témoins n'ayant reçu aucun conservant (chaque valeur représente la moyenne des résultats de deux ensilages).

Dans le tableau 2, nous donnons les résultats correspondants pour les ensilages AIV (chaque donnée représentant un ensilage).

Les résultats de l'analyse de variance sont rapportés dans le tableau 3 (les ensilages AIV ne sont pas intégrés à l'analyse).

Dans cette analyse nous étudions l'effet de 4 causes de variations :

- 1° la durée de conservation (8 degrés de liberté) ;
- 2° l'effet de la dose d'urée (0 p. 100, 1 p. 100 ; et 2 p. 100) ;
- 3° l'effet de la dose de glucose ;
- 4° l'effet de la dose d'amidon malté.

Dans le tableau 4, nous donnons la composition moyenne des ensilages conservés au moins 20 jours, en fonction du traitement.

TABLEAU I

Évolution au cours du temps de la composition des ensilages sans conservants

	Teneurs avant ensilage	Durée de conservation en jours								
		1	4	7	11	20	47	77	120	166
Acide butyrique % .		0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,05	0,22	0,10	0,10
Acide acétique % .		0,75	0,60	0,77	0,84	1,18	1,60	1,30	1,33	1,37
Acide lactique % . .		1,33	1,22	1,71	1,53	1,35	1,14	0,96	1,33	0,96
Protéine vraie totale %	2,76	2,40	2,27	1,70	1,99	1,92	1,20	1,70	1,53	1,61

Acides aminés dont la teneur diminue au cours de la conservation (en % de la protéine)

Acide aspartique...	13,04	10,01	7,40	6,56	4,48	4,47	4,37	3,94	2,78	3,72
Thréonine	4,34	3,45	3,39	3,08	2,29	1,92	2,22	1,88	1,56	1,90
Sérine	4,08	3,57	3,41	2,83	3,33	2,14	2,32	2,27	1,70	2,68
Acide glutamique .	8,21	7,24	5,92	5,19	5,06	3,75	4,11	3,82	2,48	3,83
Proline	6,04	3,10	3,10	3,83	3,29	2,69	2,31	2,37	1,90	3,00
Glycine	4,36	4,48	4,37	4,05	4,13	3,36	3,14	3,45	3,69	3,07
Tyrosine	3,22	3,51	2,40	2,10	1,68	1,40	1,70	1,79	0,86	1,58
Phénylalanine	3,98	4,50	3,90	3,90	2,96	3,03	3,51	3,58	2,70	3,92
Histidine	3,33	1,36	3,76	2,05	1,04	1,51	1,72	0,50	0,68	1,05
Lysine	4,85	5,60	4,22	3,47	3,03	2,95	2,95	2,26	2,23	2,34
Arginine	4,20	2,00	1,08	1,54	1,52	1,59	1,31	1,12	0,60	0,50

Acides aminés dont la teneur ne change pas significativement au cours de la conservation (en % de la protéine)

Valine	4,28	4,29	4,44	4,67	4,42	4,63	4,52	4,24	5,39	5,62
Méthionine	2,61	2,19	1,99	1,83	1,66	1,93	1,95	1,68	1,76	2,58
Leucine	5,01	5,31	5,37	5,62	5,67	5,56	6,09	4,77	4,89	6,26

Acides aminés dont la teneur augmente au cours de la conservation (en % de la protéine)

Alanine	4,56	5,21	8,18	8,01	9,80	9,46	9,00	8,71	9,40	9,95
Acide amino-butyr- ique	0,00	1,33	0,30	0,17	0,96	0,85	0,86	1,05	1,43	0,72
Isoleucine	2,80	3,30	3,15	3,52	3,76	3,63	3,99	3,02	3,12	3,94
% de l'azote total retrouvé dans les 17 acides aminés	74,63	56,66	56,27	52,08	48,89	46,08	41,57	40,64	38,36	45,01

TABLEAU 2

Évolution de la composition des ensilages AIV au cours de la conservation

	Teneurs avant ensilage	Durée de conservation en jours								
		1	4	7	11	20	47	77	120	166
Acide butyrique %		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00
Acide acétique %		0,08	0,10	0,48	0,09	0,15	0,19	0,17	0,14	0,23
Acide lactique %		0,34	1,29	0,24	0,19	0,40	0,66	0,53	0,56	0,41
Protéine vraie totale %	2,76	2,51	2,45	2,36	2,14	2,23	2,14	2,30	2,20	2,50

Acides aminés dont la teneur diminue au cours de la conservation (en % de la protéine)

Acide aspartique	13,04	13,26	9,44	11,43	12,31	13,18	11,74	10,22	8,55	10,25
Thréonine	4,34	4,30	2,28	3,65	3,73	4,36	4,03	3,66	3,07	3,35
Sérine	4,08	5,42	3,84	3,66	4,35	5,11	4,02	4,04	3,05	3,68
Acide glutamique	8,21	6,98	6,12	6,29	8,29	9,48	7,57	8,18	6,54	8,18
Proline	6,04	4,42	2,36	3,23	3,83	4,80	3,41	6,12	4,56	5,44
Glycine	4,36	3,20	—	3,34	4,40	6,28	3,08	3,69	2,80	4,16
Tyrosine	3,22	2,16	3,61	1,86	3,78	4,47	2,55	2,47	2,02	2,24
Phénylalanine	3,98	4,01	4,89	2,93	4,36	6,91	4,36	3,89	3,04	3,28
Histidine	3,33	1,56	1,38	3,27	1,81	2,97	1,36	1,88	1,78	1,96
Lysine	4,85	4,05	3,99	4,13	4,81	5,98	4,79	5,05	3,83	5,32
Arginine	4,20	3,57	4,05	1,29	4,84	2,86	3,99	2,65	2,55	4,57

Acides aminés dont la teneur ne change pas significativement au cours de la conservation (en % de la protéine)

Valine	4,68	5,29	4,15	3,93	4,43	8,00	—	4,70	3,59	4,28
Méthionine	2,61	1,78	0,80	1,56	1,23	2,18	1,59	1,71	1,69	2,84
Leucine	5,01	5,67	4,85	5,25	5,52	9,67	5,27	5,94	4,43	5,70

Acides aminés dont la teneur augmente au cours de la conservation (en % de la protéine)

Alanine	4,56	3,77	4,56	3,96	5,40	12,73	3,95	4,52	3,03	5,00
Acide α -amino-butyrrique	0,00	0,00	0,26	0,61	0,29	0,61	0,00	0,00	2,00	0,00
Isoleucine	2,80	3,30	2,59	3,51	3,51	5,44	3,34	3,21	,57	3,71
% de l'azote total retrouvé dans les 17 acides aminés	74,63	60,18	49,20	52,55	64,79	86,45	54,87	59,46	47,71	63,92

TABLEAU 3
Résultats des analyses de variance
 (Rapports de variance F)

	Effet de la durée de conservation	Effet des conservants après au moins 20 jours de conservation (voir tabl. 4)		
		Urée	Glucose	Amidon malté
	$F_{0,05} = 2,07$ $F_{0,01} = 2,76$	$F_{0,05} = 3,06$ $F_{0,01} = 4,75$	$F_{0,05} = 3,06$ $F_{0,01} = 4,75$	$F_{0,05} = 3,06$ $F_{0,01} = 4,75$
Acide lactique (% MF) ...	2,67*	1,04	21,87**	18,68**
Protéine vraie totale	96,72**	0,08	6,18**	10,04**
Acide aspartique	62,70**	1,95	1,97	5,70**
Thréonine.....	23,53**	6,20**	3,02	18,27**
Sérine.....	27,50**	6,15**	5,45**	18,47**
Acide glutamique	26,08**	2,26	4,67*	3,94*
Proline	4,21**	0,80	3,00	4,85**
Glycine	4,23**	0,04	10,51**	1,99
Tyrosine	9,25**	0,33	1,68	2,20
Phénylalanine.....	4,24**	1,56	1,65	0,30
Histidine	4,92**	3,08*	0,95	0,38
Lysine.....	18,40**	3,06*	1,13	1,39
Arginine	9,48**	0,77	1,05	0,10
Valine	2,06	0,07	2,26	0,75
Méthionine	1,87	0,49	0,29	2,40
Leucine.....	1,34	0,66	1,10	2,37
Alanine	2,91**	0,16	4,26*	3,47*
Acide α -amino-butérique ..	15,74**	0,24	4,60*	0,98
Isoleucine	4,55**	2,40	0,43	3,07*
% de l'azote retrouvé dans les acides aminés	2,17*	3,19*	10,29**	4,65*

* = Significatif pour $P_{0,05}$.

** = Significatif pour $P_{0,01}$.

TABLEAU 4

% MF	Teneurs avant ensilage	Composition des ensilages conservés au moins 20 jours avec divers conservants								
		Glucose (%)			Amidon malté (%)			Urée (‰)		
		0	1	2	0	3	6	0	1	2
Acide butyrique ..		0,10	0,06	0,02	0,10	0,05	0,02	0,05	0,05	0,07
Acide acétique....		1,47	1,23	0,84	1,48	1,15	0,86	1,02	1,20	1,31
Acide lactique		1,17	1,96	2,91	1,37	2,92	3,59	2,43	2,36	2,17
Protéine réelle totale	2,76	1,61	1,75	1,76	1,57	1,75	1,76	1,72	1,67	1,71

Teneurs en acides aminés de la protéine

Acide aspartique...	13,04	3,29	3,92	4,00	3,93	4,12	5,16	4,36	4,01	3,82
Thréonine	4,34	1,71	1,79	2,12	1,85	1,80	2,75	2,25	1,85	1,89
Sérine	4,08	1,99	2,26	2,57	2,22	2,19	3,13	2,64	2,24	2,29
Acide glutamique ..	8,21	3,08	3,55	3,88	3,54	3,69	4,24	3,88	3,60	3,50
Proline	6,04	2,16	2,36	2,98	2,49	2,62	3,49	2,78	2,76	2,50
Glycine	4,36	2,96	3,82	3,76	3,69	3,73	4,07	3,68	3,69	3,65
Tyrosine.....	3,22	1,37	1,71	1,73	1,78	1,67	1,81	1,74	1,63	1,74
Phénylalanine	3,98	3,46	3,62	3,52	3,56	3,46	3,68	3,61	3,50	3,54
Histidine.....	3,33	0,92	1,17	1,27	0,95	1,11	1,17	1,36	0,94	0,99
Lysine	4,85	2,11	2,34	2,54	2,29	2,75	2,63	2,73	2,33	2,27
Arginine	4,20	1,03	1,06	1,39	0,76	0,72	0,84	1,09	0,95	0,85
Valine.....	4,68	4,83	4,54	5,10	5,03	4,71	4,90	4,81	4,88	4,86
Méthionine	2,61	1,73	1,78	1,63	1,95	1,54	1,88	1,82	1,68	1,75
Leucine	5,01	4,99	5,41	5,28	5,77	5,25	5,82	5,45	5,29	5,52
Alanine	4,56	8,30	9,69	8,86	10,77	9,67	9,68	9,42	9,45	9,60
Acide α -amino butyrique	traces	0,71	1,16	0,74	0,90	0,92	0,71	0,85	0,90	0,82
Isoleucine	2,80	3,29	3,16	3,29	3,68	3,28	3,46	3,35	3,24	3,49
% de l'azote total retrouvé dans les acides aminés ..	74,63	38,28	43,74	45,19	44,70	43,34	48,10	45,55	43,11	43,02

DISCUSSION

I. — ORIENTATION GÉNÉRALE DES FERMENTATIONS

Il est évident que la dégradation des protéines ne se déroule pas de la même façon en présence d'une fermentation lactique ou d'une fermentation butyrique, qui modifient considérablement les conditions de milieu. En outre, on ne peut pas, par l'étude d'un seul ensilage, prétendre connaître la généralité du phénomène. Aussi, avons-nous cru utile de bien définir la réussite de nos ensilages avant d'étudier la dégradation de leurs protéines. Pour juger de la réussite, nous disposons du pH et des teneurs en acides butyrique, acétique et lactique en p. 100 de la matière fraîche.

A. — *Le pH*

Dans un ensilage sans urée, un pH acide est l'indice d'une meilleure fermentation favorisant la conservation du fourrage. Mais le pH n'est pas un indice de réussite en présence d'urée dont la réaction comme celle de NH_3 qu'elle peut engendrer, est alcaline.

Nous nous contenterons donc d'analyser rapidement les pH des seuls ensilages non traités à l'urée (tabl. 5).

TABLEAU 5

		Durée de conservation en jours								
		1	4	7	11	20	47	77	120	166
Glucose (%)	0	5,00	4,80	4,72	4,71	4,81	4,80	6,20	4,80	4,91
	1	4,59	4,34	4,32	4,20	4,44	4,41	4,50	4,36	4,66
	2	4,23	4,05	4,12	3,94	4,14	4,09	4,20	4,32	4,20
Amidon malté (%)	0	5,10	5,89	4,85	4,65	4,82	4,80	4,80	4,88	5,05
	3	4,53	4,39	4,50	4,27	4,30	4,23	4,34	4,28	4,34
	6	4,37	4,22	4,19	4,00	4,11	3,99	4,09	4,14	4,22
AIV.....		3,62	2,99	3,20	2,95	3,30	3,30	3,31	3,23	3,49

a) Le pH est stable depuis le premier jour et n'évolue pratiquement plus au cours du temps.

b) Sans conservant, le pH est de 4,70-5,00, ce qui indique une assez mauvaise allure des fermentations.

c) Avec 2 p. 100 de glucose ou 6 p. 100 d'amidon malté, le pH approche de 4,00, valeur beaucoup plus favorable (ces conservants ont donc un effet favorable assez marqué).

d) Le pH des ensilages AIV, est très acide : 3,00-3,50.

Nous avons des pH allant de 5,00 (mauvais) à 4,00 (bons) et même 3,00 (pour les AIV). Cette gamme étendue des pH nous permet d'étudier la dégradation des protéines dans des conditions suffisamment variables.

B. — *La teneur en acide acétique*

La teneur en acide acétique n'a que peu de valeur pour renseigner sur la réussite des ensilages car elle n'est pas en relation étroite avec le bilan des principes nutritifs. Nous noterons cependant que cette teneur est assez élevée dans nos ensilages, puisque après quelques semaines, elle s'établit aux environs de 1,50 p. 100 dans les ensilages sans conservant, mais seulement à 0,80-0,90 dans les ensilages à 2 p. 100 de glucose ou 6 p. 100 d'amidon malté (tabl. 4).

C. — *La teneur en acide butyrique*

Nos ensilages ne contiennent pratiquement pas d'acide butyrique quelles que soient les doses de conservant (tabl. 4). Ce serait parfait s'il n'y avait pas la présence parallèle de quantités assez importantes d'acide acétique.

D. — *La teneur en acide lactique*

La teneur en acide lactique est, d'ordinaire, un excellent indice de la conservation des ensilages. Aussi, il nous a paru intéressant d'en faire l'analyse de variance (tabl. 3). Pour l'ensemble des 162 silos (AIV non compris) la teneur en acide lactique est, en moyenne de 2,12 p. 100 de la matière fraîche. Elle s'établit très tôt à sa valeur définitive et l'on peut dire qu'elle reste stable après 20 jours (tabl. 1). Nos ensilages sont donc, dans l'ensemble, assez riches en acide lactique. Ce sont surtout les ensilages aux fortes doses de conservant (en particulier ceux à l'amidon malté) (tabl. 4) qui contiennent le plus d'acide lactique (4 p. 100).

D'après le pH et les teneurs en acides gras volatils, nos ensilages sont donc en général bien réussis.

Dans l'ensemble, la teneur en acide lactique est bonne et celle en acide butyrique est nulle. La teneur en acide acétique est peut-être un peu trop élevée mais cela n'a guère de signification au point de vue de la réussite de l'ensilage (conservation des principes nutritifs).

Les ensilages avec conservant (glucose ou amidon malté) sont mieux réussis que les témoins. Les ensilages avec urée ne semblent pas bien différents des autres. Ils ne paraissent pas moins bien réussis (tabl. 4).

II. — ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DES PROTÉINES

A. — *La teneur en matière azotée totale* (tabl. 6)

Dans le tableau 6, nous donnons, pour tous les ensilages sans urée, la teneur en matière azotée totale ($N \times 6,25$). On remarquera que cette teneur ne se modifie pas au cours du temps.

Le poids total de produit désilé n'étant modifié que de façon insignifiante au cours du temps (au maximum 3 à 4 p. 100 pour quelques rares silos), nous pouvons tirer deux conclusions importantes :

1^o la perte en matière azotée totale est nulle. Les pertes en protéine vraie ne représentent qu'un remaniement de la répartition des fractions azotées ;

2^o l'évolution des teneurs en acides aminés au cours de la conservation, exprimée en p. 100 de la matière azotée totale, nous renseigne automatiquement sur leur bilan pondéral absolu.

TABLEAU 6

Teneurs en matière azotée totale en p. 100 de la matière fraîche dans les ensilages sans urée

		Durée de conservation en jours								
		1	4	7	11	20	47	77	120	166
Glucose (%)	0	3,38	3,67	3,67	3,44	3,74	3,63	3,53	3,81	3,34
	1	3,66	3,68	3,39	3,44	3,44	3,38	3,37	3,50	3,45
	2	3,31	3,69	3,29	3,39	3,91	3,44	3,69	3,59	3,04
Amidon malté (%)	0	3,31	3,52	3,64	3,56	3,72	3,31	3,37	3,50	3,39
	3	3,31	3,50	3,43	3,59	3,62	3,46	3,63	3,28	3,37
	6	3,35	3,25	3,43	3,20	3,39	3,46	3,55	3,55	3,20
AIV.....		3,22	3,25	3,43	3,22	3,46	3,44	3,48	3,50	3,39

Tous les résultats concernant l'évolution des différentes formes de l'azote, peuvent donc être considérés comme l'état de leur bilan pondéral.

B. — *Le rapport Azote ammoniacal/Azote total (N NH₃/N total)*

Le rapport N NH₃/N total n'a aucune signification pour les ensilages additionnés d'urée puisque l'azote uréique influence la mesure à la fois de l'azote total et de l'azote ammoniacal. Par contre, ce rapport présente une très grande importance pour l'évolution des pertes de protéine vraie dans les ensilages sans urée.

D'après les rapports N NH₃/N total des ensilages sans urée, nous remarquons (tabl. 7) que :

1^o les rapports évoluent jusqu'à 3 semaines pour dépasser la valeur de 15 p. 100 en fin de conservation dans les ensilages sans conservant. Cette valeur élevée de 15 à 18 p. 100 est loin d'être satisfaisante car elle est l'indice d'une dégradation des protéines trop intense ;

2^o la dégradation ammoniacale tombe à 10-11 p. 100 avec les conservants sucrés ou amylacés ; valeur correspondant à un indice de bonne conservation ;

3^o dans les ensilages AIV, la dégradation ammoniacale est pratiquement nulle (de l'ordre de 3 p. 100).

Cette gamme assez étendue de rapports N NH₃/N total permet d'étudier l'évolution de la composition en acides aminés dans des conditions suffisamment variables.

TABLEAU 7

(teneur avant ensilage 3,40 p. 100)
Rapports N NH₃/N total en p. 1000

		Durée de conservation en jours								
		1	3	7	11	20	47	77	120	166
Glucose 0 (%)	1	9,63	9,30	9,29	11,41	13,54	15,51	28,09	14,79	15,77
	2	6,63	6,04	7,92	8,11	10,51	11,31	11,65	12,10	11,29
	3	5,93	5,18	7,53	5,94	8,06	10,51	10,64	10,65	11,04
Amidon 0 malté (%)	1	9,52	10,13	10,64	12,62	14,16	17,63	18,09	14,02	17,37
	2	7,02	6,49	7,08	8,49	9,99	11,64	12,66	11,65	12,57
	3	6,78	6,52	7,53	9,04	9,90	10,15	11,06	10,61	14,04
Silos AIV.....		1,09	1,03	1,66	2,41	1,79	2,40	3,56	3,25	3,35

C. — La teneur en protéine vraie totale (Stutzer)

Les tableaux 1, 2 et 4 rapportent l'évolution de la teneur en protéine vraie totale en p. 100 de la matière fraîche de l'ensilage.

Compte tenu de la remarque formulée plus haut, ces teneurs peuvent être interprétées comme le bilan pondéral de la protéine vraie totale des ensilages.

Le tableau 3 donne l'analyse de variance de ces résultats.

1° La teneur en protéine vraie totale diminue considérablement au cours du temps. Elle se stabilise pratiquement après 3 à 4 semaines.

2° Cette teneur, qui était de 2,76 p. 100 avant ensilage, tombe, après 166 jours à 1,61 p. 100 dans les ensilages sans conservant. La chute est donc très importante puisqu'elle atteint 40 p. 100.

3° Dans les ensilages AIV, la teneur en protéine vraie totale ne descend pas en dessous de 2,30-2,20 p. 100. La diminution est donc 2 fois plus faible : 20 p. 100 au lieu de 40 p. 100 dans les ensilages ordinaires.

4° Pour les 3 doses d'urée nous n'observons aucune différence significative entre les teneurs en protéine vraie totale (tabl. 4) :

protéine vraie totale	
sans urée	1,72 p. 100
1 p. 1 000 d'urée	1,67 p. 100
2 p. 1 000 d'urée	1,71 p. 100

On ne peut donc en aucune façon espérer une synthèse de protéines dans les ensilages à partir de l'azote de l'urée (du moins une synthèse suffisamment importante pour avoir une signification nutritionnelle).

Nous constatons donc que :

- la diminution en protéine vraie totale atteint 40 p. 100 sauf dans les ensilages AIV, où la perte n'est que de 20 p. 100 ;
- l'urée ne donne lieu à aucune synthèse protéique au sein de l'ensilage ;
- la perte en protéine vraie totale est le double de celle calculée d'après l'ammoniaque apparue. L'azote des protéines détruites ne se retrouve que pour moitié sous forme d'ammoniaque.

D. — *Le bilan des acides aminés*

Dans les tableaux 1, 2 et 4, nous donnons la composition en acides aminés des ensilages pour diverses durées de conservation et pour divers conservants.

L'évolution au cours de la conservation des teneurs en acides aminés des ensilages n'ayant pas reçu de conservant et le pourcentage d'azote total retrouvé dans les 17 acides aminés figurent au tableau 1.

1. *Évolution au cours de la conservation.*

D'après les résultats de l'analyse de variance (tabl. 3) des teneurs de 162 ensilages (les ensilages AIV n'étant pas intervenus dans l'analyse), on voit que la plupart des teneurs en acides aminés évoluent au cours de la conservation et sont influencées par les conservants.

Rapidité de la dégradation.

La destruction des acides aminés est très rapide. Elle est déjà pratiquement terminée après 20 jours. Les changements intervenant encore après 3 semaines sont à peine perceptibles. (C'est pour cette raison qu'au tableau 4, nous groupons tous les ensilages ouverts à partir du vingtième jour, afin de faciliter l'étude des conservants.)

Importance de la destruction.

La destruction est très importante. Avant ensilage l'azote des acides aminés représente plus de 74,63 p. 100 de l'azote total. Après ensilage, cette part de l'azote total descend à 40-45 p. 100. La destruction des acides aminés atteint en moyenne 45 p. 100 et est du même ordre de grandeur que la perte en protéine vraie totale.

L'apparition d' NH_3 dans une proportion de 15-18 p. 100 de l'azote total ne renseigne que pour une faible part sur la destruction des acides aminés.

Évolution individuelle des acides aminés.

Si la plupart des acides aminés sont détruits dans l'ensilage en proportions considérables, il existe cependant des différences individuelles assez importantes.

- L'arginine disparaît presque totalement.
- L'histidine disparaît pour 60-70 p. 100.
- D'autres acides aminés très importants en alimentation comme la thréonine, la tyrosine, la lysine disparaissent pour 50 p. 100.

— La fraction d'acides aminés non indispensables est également très attaquée. Les acides glutamique et aspartique perdent plus de 50 p. 100 tandis que la sérine et la proline perdent 40 p. 100.

— D'autres acides aminés sont moins vulnérables. C'est le cas de la phénylalanine, de la glycine, de la valine, de la méthionine, et de la leucine.

— On obtient un gain en isoleucine, mais il est de très faible amplitude.

— Les deux seuls acides aminés qui sont formés en proportion importante n'ont pas grande signification en alimentation. Ce sont l'alanine qui double sa teneur et l'acide α -amino-butyrique qui apparaît dans l'ensilage sans avoir été décelé dans la luzerne.

Le bilan est donc autrement plus négatif que ne le laisse supposer la formation d'ammoniaque. Et pourtant, il ne s'agit pas de très mauvais ensilages, mais d'ensilages de réussite moyenne comme on en rencontre en majorité dans la pratique.

2. Destruction des protéines dans les ensilages AIV (tabl. 2).

Nous avons déjà signalé que la formation d'ammoniaque était pratiquement nulle dans les ensilages AIV ($N\ NH_3/N$ total de l'ordre de 3,50 p. 100 au lieu de 15-18 p. 100 dans les autres ensilages), et que la perte en protéine vraie totale était deux fois plus faible dans les ensilages AIV.

Il en est de même au point de vue de la conservation des acides aminés. Le pourcentage de l'azote total retrouvé dans les acides aminés, au lieu de tomber à 45 p. 100 comme dans les ensilages ordinaires, reste dans les ensilages AIV aux environs de 60 p. 100.

Pour ne prendre que deux exemples, l'arginine qui disparaît totalement dans les autres ensilages ne régresse que de 30 p. 100 dans les ensilages AIV ; l'alanine dont le taux double dans les mauvais ensilages n'augmente pas dans les ensilages AIV.

En somme, dans les ensilages AIV les pertes n'atteignent pas le tiers de ce qu'elles sont dans les autres ensilages. Cela confirme donc pleinement l'excellent comportement des ensilages AIV que l'on connaissait déjà par l'étude des acides gras volatils ou de l'ammoniaque.

3. Effet du glucose et de l'amidon malté sur la dégradation des protéines (tabl. 4).

Une augmentation de la dose de glucose ou d'amidon modifie les teneurs en certains acides aminés.

Il a déjà été dit que l'addition de sucre ou d'amidon malté freine la production de NH_3 et permet une meilleure conservation de la protéine vraie totale. Les données du tableau 4 montrent que le p. 100 de l'azote retrouvé dans les 17 acides aminés est également amélioré par le sucre et l'amidon malté.

La destruction des acides aminés est donc freinée. Cela se remarque en particulier pour certains acides aminés comme les acides aspartique et glutamique, la thréonine, la sérine, la proline, la glycine, la tyrosine, l'histidine, la lysine.

4. Effet de l'urée sur la destruction des protéines (tabl. 4).

Pour les 11 acides aminés dont la teneur diminue en cours de conservation, l'emploi de 2 p. 1000 d'urée aggrave les pertes (cette aggravation est hautement significative, tabl. 3).

Pour les 3 acides aminés dont la teneur augmente au cours du temps (alanine, isoleucine et acide α -amino-butérique), l'urée accentue cette augmentation de manière hautement significative.

L'augmentation est d'autant plus importante que les fermentations putrides sont plus prononcées ; alors que dans les ensilages AIV dont la qualité est excellente, leur formation est beaucoup moins importante.

L'accentuation de leur formation en présence d'urée témoigne donc d'une intensification des fermentations nuisibles.

Pour l'ensemble des acides aminés, l'effet global de l'urée est d'ailleurs déficitaire : le pourcentage de l'azote retrouvé dans les acides aminés diminue significativement de 45 p. 100 sans urée à 43 p. 100 avec urée.

On doit donc en conclure que l'azote de l'urée ne sert pas à la synthèse de protéines bactériennes, puisqu'en présence d'urée tous les acides aminés de la luzerne sont plus intensément détruits (à l'exception de l'alanine, de l'acide α -amino-butérique et de l'isoleucine), et que l'addition d'urée aggrave les pertes protidiques.

Reçu pour publication en juin 1968.

REMERCIEMENTS

Cette publication a été rendue possible grâce aux subsides de l'I. R. S. I. A. (Institut pour l'encouragement de la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture), auquel les auteurs expriment leur plus vive gratitude.

SUMMARY

CHANGES IN AMINO ACID COMPOSITION OF LUCERNE DURING ENSILING. COMPARATIVE PROTECTIVE EFFECTS OF AIV SOLUTION, OF GLUCOSE, OF A MIXTURE OF STARCH AND MALT AND OF UREA

A series of 171 samples of lucerne were ensiled in glass jars of 1.5 litres with different proportions of glucose, malted starch, urea of strong mineral acids. The kinetics of degradation of protein (formation of NH_3), losses of total protein nitrogen and 17 amino acids were followed.

The following conclusions could be drawn :

a) *General tendencies in the degradation of protein* (table 1)

1. *Duration and intensity.*

Degradation of proteins develops very rapidly ; it is practically finished after 3 weeks.

The percentage of total nitrogen recovered as NH_3 represents only a small part of the nitrogen of the amino acids studied. For 15 per cent total NH_3 N there was in fact 40 per cent loss of total true protein and 40 per cent loss of nitrogen from the amino acids estimated.

2. *Changes in individual amino acids.*

Arginine and histidine disappeared almost completely. Threonine, tyrosine, lysine, aspartic and glutamic acids, serine and proline were reduced by 40 per cent.

Other amino acids were less vulnerable, notably phenylalanine, glycine, valine, methionine and leucine. There was a small increase of isoleucine. The only amino acids which were formed in large amount in the silos were not of great importance for feeding. Alanine content doubled and α -amino butyric acid appeared in the silage although it had not been shown in the original lucerne. (The increase in the contents of these two amino acids is an indication of the intensification of putrefactive fermentation).

b) *Degradation of proteins in silages with strong mineral acids*

In the AIV silages breakdown of amino acids was 3 or 4 times less than in ordinary silages (table 2).

c) *Effect of glucose and malted starch on the destruction of protein*

Glucose, 2 per cent or malted starch, 6 per cent, also improved the stability of amino acids but to a much less degree (table 4).

d) *Effect of urea on the degradation of proteins* (table 4)

The nitrogen of urea, when 2 ‰ urea was added to the lucerne, did not serve in any way towards synthesis of bacterial protein in the silage. In the presence of urea all the amino acids were more actively destroyed except for alanine, isoleucine and α -amino butyric acid, of which the contents increased when urea was added, but the formation of which is a sign of intensification of putrefactive fermentation. The addition of urea to silage thus increases the loss of protein during conservation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADRIAN J., 1963. La réaction de Maillard. Étude du comportement de six acides aminés purs. *Ann. Nutr. et Alim.*, **17**, 1-35.
- BARNETT A. J. C., 1954. *Silage fermentation*, p. 111-123. Academic Press Inc. Publishers New York.
- BLACKBURN T. H., 1965. Nitrogen metabolism in the rumen dans *Physiology of Digestion in the Ruminant*, p. 322-334. Edited by DOUGHERTY R. W., ALLEN R. S.; BURROUGH, JACOBSON N. L. and Mo. GILLIARD A. D. London Buterworths.
- BRADY C. J., 1960. Redistribution of nitrogen in grass and leguminous fodder plants during wilting and ensilage. *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 276-284.
- BRADY C. J., 1965. Nitrogen redistribution during ensilage at low moisture level. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 508-513.
- DE VUYST A., ARNOULD R., VANBELLE M., VANDERSTAPPEN R., VANSTAEN L., VERVACK W., MOREELS A., 1964. Description d'une méthode de testage des conservants pour ensilages. *Agricultura*, **12**, 551-579 (Héverlé-Belgique).
- DE VUYST A., VANBELLE M., ARNOULD R., VERMEULEN H., VERVACK W., MOREELS A., AUSLOOS M., 1966 a. L'emploi de l'amidon, des céréales et du malt comme conservants des ensilages. *Agricultura*, **14**, 391-416 (Héverlé-Belgique).
- DE VUYST A., ARNOULD R., VANBELLE M., MARTINOT C., VERVACK W., MOREELS A., AUSLOOS M., 1966 b. L'effet de l'urée et du carbonate de calcium sur la réussite des ensilages. *Agricultura*, **14**, 531-553 (Héverlé-Belgique).
- DE VUYST A., VERVACK W., VANBELLE M., ARNOULD R., AUSLOOS M., CRÈVECOEUR E., MOREELS A., 1968. Influence des conditions d'hydrolyse sur la stabilité des acides aminés libres. Résultats non publiés.
- DUSTIN J. P., CZAJKOWSKA C., MOORE S., BIGWOOD E. J., 1953. A study of the chromatographic determination of amino acids in the presence of large amounts of carbohydrates. *Anal. Chim. Acta*, **9**, 256-262.
- FLIEG O., 1937. Eine einfache Methode zur Bestimmung des Milchsäure in Sauerfutter. *Tierernährung*, **9**, 178-183.
- GOUET P., FATIANOFF Nathalie, 1964. Les bactéries de l'ensilage. I. Tentative de différenciation entre les actions enzymatiques des cellules végétales et bactériennes dans la glycolyse et la protéolyse d'un ensilage de luzerne. *Ann. Inst. Pasteur*, **107**, 711-723.
- GOUET P., FATIANOFF Nathalie, ZELTER S. Z., DURAND Michèle, CHEVALIER R., 1965. Influence de l'élevation du taux de matière sèche sur l'évolution biochimique et bactériologique d'une luzerne conservée par ensilage. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 79-100.
- KEMBLE A. R., 1956. Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. *J. Sci. Food Agric.*, **7**, 125-130.

- LANDIS J., 1960. Untersuchungen über Zusammensetzung und des Nährwert der stickstoffhaltigen Nahrungsfraktion in Grünfütter und in vergleichbarenensilagen. *Promotionarbeit von der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*. Juris Verlag, Zürich.
- MACPERRSON H. T., VIOLANTE P., 1966 a. Ornithine, putrescine and cadaverine in farm silage. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 125-127.
- MACPHERSON H. T., VIOLANTE P., 1966 b. The influence of pH on the metabolism of arginine and lysine in silage. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 128-130.
- MAYNONE B., BATAGLINI A., TIBERIO M., MAZZIOTTI DI CELSO P., 1963. Loss of dry matter of net energy and vitamins and degradation of proteins in warm silage stored in open molded stacks. *An. Speriment. Agrar.*, **17**, 53-90.
- MODJANOW A. W., KOSMANISCHWILL A. T., KISSELOW E. W., 1958. L'urée et le sulfate d'ammoniaque comme moyen d'enrichissement des ensilages de maïs laitex (en russe). *Shivotnowodstvo (Zootechnie)*, **20**, 20-26.
- MOORE S., SPACKMAN D. H., STEIN W. H., 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Anal. Chem.*, **30**, 1185-1190.
- PLATKANOW N., SANDEW S., 1961. Über die bei der Einsäuerung von Grünmaïs mit und ohne Zusatz von Harnstoff auftretenden Veränderungen im Aminosäuregehalt. *Archiv. Tierernährung*, **11**, 321-326.
- ROACH A. G., 1966. The preparation of feedstuffs and samples for amino acid analysis. *Techniques in amino acid analysis*. Technicon Instruments Company Ltd. Chertsey, England, 86-92.
- SCHARRER K., RACKER K. O., 1958. Der Einfluss der Silierung auf den Aminosäuregehalt der Luzerne. I. Mitteilung. *Zeitschr. Tierphys., Tierernähr. Futtermittelk.*, **13**, 65-73.
- SCHARRER K., RACKER K. O., 1959. Der Einfluss der Silierung auf den Aminosäuregehalt der Luzerne. 2. Mitteilung. *Zeitschr., Tierphys., Tierernähr. Futtermittelk.*, **14**, 108-113.
- VIRTANEN A. I., 1937. The microbiology of ensilage production. *Zbl. Bakteriol.*, **95**, 472-477.
- ZELTER S. Z., SALOMON Michèle, 1959. La conservation par ensilage d'une luzerne en vert. I. Action protectrice comparée de la solution AIV, du métabisulfite de sodium et du mélange formiate de calcium-nitrite de sodium. *Ann. Zootech.*, **8**, 147-173.