

increases with incubation time and represents on average 57.7, 35.6 and 39.2% for RG2, RG1 and RC, respectively. M1 takes into account all the particle-associated microorganisms, but, unfortunately, underestimates the contamination because of the labelling of fixed microorganisms from the labelled feeds. It seems to be expected that the  $^{15}\text{N}$ -enrichment of the M2 and M3 bacteria is similar to that of the bacteria associated with the undigested residues in the bags.

**Étude *in vitro* (RUSITEC) de la transformation de divers composés soufrés dans le rumen.** S Komisarczuk-Bony, M Carcelen (INRA, unité de physio-pathologie du rumen, École vétérinaire de Lyon, BP 83, 69280 Marcy-l'Étoile, France)

Les cinétiques de réduction des diverses formes d'apport de soufre aux microbes du rumen doivent être prises en compte afin d'adapter dans le temps la disponibilité du soufre à celle des substrats énergétiques et azotés. Dans cette expérimentation, le devenir de quatre formes de soufre, sulfate de sodium, soufre élémentaire, D-L méthionine et un hydroxy-analogue de méthionine (HAM), est étudié à l'aide d'un système de culture semi-continue de type RUSITEC. Quatre fermenteurs reçoivent 13 g de cellulose, 3 g d'amidon et 650 mg d'urée par jour et un apport de 30 mg de S en dose unique sous l'une des 4 formes testées. Les sulfures sont dosés en milieu basique avec une électrode spécifique, les thiols dissous (R-SH) par absorbance à 412 nm en présence de DTNB 5 mM final (acide 5,5' dithio-bis-2-nitrobenzoïque) et les sulfates par turbidimétrie sous forme de sulfate de baryum. La méthionine est dosée par HPLC.

Le sulfate et la méthionine disparaissent rapidement des milieux : -86% et -75% respectivement après 6 h. La disparition des sulfates s'accompagne d'une production rapide de sulfures dissous : production beaucoup plus lente avec les 3 autres formes de S testées. La disparition de la méthionine pourrait être en partie due à une incorporation directe par les microbes. La fraction de méthionine transformée conduit, en plus des sulfures, à des thiol dissous dans les heures suivant l'apport (2,6 mg S/l après 6 h). Ces composés ne sont pas retrouvés lors de la distribution du HAM ni avec les 2 formes inorganiques de S. Sur 24 h, les productions de sulfures gazeux non utilisés par les microbes sont de

4,7, 1,5, 0,3 et 0 mg pour le sulfate, la méthionine, le HAM et le S élémentaire respectivement.

Parmi les 4 composés soufrés testés, seul le sulfate de sodium présente une cinétique de transformation rapide et massive en sulfures. *In vivo*, compte tenu de l'absorption des sulfures à travers la paroi du rumen, l'utilisation du sulfate pourrait conduire à des carences temporaires en soufre pour les microbes, préjudiciables notamment à l'utilisation optimale des rations riches en ligno-cellulose dont la matière organique est dégradée lentement.

**Prédiction de la dégradabilité des *corn gluten feed*.** F Martignoni, G Boucher, A Bourdillon, MB Assoumani (Sanders, 17 quai de l'industrie, 91200 Athis-Mons, France)

Sur 9 échantillons de *corn gluten feed* de différentes origines, nous avons réalisé des mesures de dégradabilité ruminale des protéines par la technique des sachets nylon (DT6) et par mesure de la solubilité enzymatique de l'azote selon 2 méthodes : la première (DE1), en une étape, fait intervenir une protéase de *Streptomyces griseus* à pH 8 pendant 1 h, et la deuxième (DE2), en 2 étapes, consiste en une attaque amylasique à pH 4,85 pendant 1 h, suivie d'une attaque par une protéase neutre de *Bacillus subtilis* à pH 6,5 pendant 4 h. La solubilité sans addition d'enzyme (effet pH) a été mesurée dans les 2 méthodes (TE1 et TE2).

La dégradabilité *in situ* de l'azote des *corn gluten feed* était en moyenne de 66,8% et variait dans un intervalle compris entre 60,3% et 72,1%. Les matières azotées totales sur sec étaient en moyenne de 22,4% et variaient dans un intervalle compris entre 20,1% et 23,8%.

Les corrélations ( $r$ ) entre DT6 et DE1, DE2, MAS, TE1, TE2 sont respectivement égales à 0,79 ; 0,71 ; 0,80 ; 0,81 ; 0,78. La prise en compte de la cellulose brute permet d'améliorer la prédiction de la dégradabilité, soit :

$$\text{DT6} = -4,67 + 0,81 \times \text{DE1} + 3,28 \times \text{CB} \quad [1]$$

$$\text{ETR} = 2,29 \quad r^2 = 0,81 \text{ au lieu de } r^2 = 0,62 \text{ sans la cellulose brute}$$

$$\text{DT6} = -12,07 + 0,97 \times \text{TE2} + 3,63 \times \text{CB} \quad [2]$$

$$\text{ETR} = 1,93 \quad r^2 = 0,86 \text{ au lieu de } r^2 = 0,61 \text{ sans la cellulose brute}$$

Cette étude intra-matière première montre qu'il est possible de prédire la dégradabilité ruminale de l'azote du *corn gluten feed* avec une précision suffisante en utilisant à la fois des critères chimiques [cellulose brute, action du pH sans les enzymes (TE2)] et des critères biologiques [dégradabilité enzymatique (DE1)].

La solubilité enzymatique à pH ruminal (DE2) ne semble pas mieux prédire la DT6 que la solubilité par action du pH (TE2). Ceci montre que les *corn gluten feed* testés ont subi un traitement thermique modéré et que leurs protéines sont facilement accessibles. La prédiction de la dégradabilité des matières azotées totales des *corn gluten feed* par TE2 et la cellulose brute [2] présente l'intérêt d'être la plus précise et la moins coûteuse.

**Characterization of protein fractions of sunflower seeds during rumen degradation.** R Nola <sup>1</sup>, S lametti <sup>2</sup>, F Sessa <sup>2</sup>, GF Greppi <sup>3</sup>, S Pagani <sup>2</sup> (<sup>1</sup> *Ist Zootec Gen, Milan*; <sup>2</sup> *Dip Sc Mol Agr Alim, Milan*; <sup>3</sup> *Dipartimento di Scienze Anatomiche, Fisiologiche e delle produzioni animali, viale della Piaggera, 2, 56121 Pisa, Italy*)

The protein value of a feed utilized in polygastric nutrition depends on rumen degradation as well as on the amino-acid composition and digestibility of the undegraded proteins passing to the small intestine. The nylon-bag method is an effective tool for the prediction of rumen degradation, but further indications can be provided by investigating the rumen degradability of specific protein fractions. In this study we monitored the breakdown rates of sunflower-seed protein fractions during rumen incubation. The amino-acid composition of slowly degradable fractions was determined with the aim of correlating these polypeptide fractions with the level of microbial proteolysis in the goat rumen and the post-ruminal amino-acid availability.

Sunflower seeds were incubated in goat rumen (0, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 48 and 72 h) and the protein fraction of the undegraded residues was solubilized. Samples from each ruminal incubation time and containing 20 µg of nitrogen were electrophoresed on 15% polyacrylamide gel according to Laemmli. Fractional protein degradation was monitored by image processing. The slowly degradable polypeptides were transferred from

the electrophoretic gel to a polyvinylidene difluoride membrane and directly hydrolysed for amino-acid analysis.

Amino-acid analysis was performed by reversed-phase HPLC (C18) after derivatization with phenylthiocyanate. The protein fractions of apparent  $M_r$  of 21, 23, 32, 34, 42 and 57 kDa showed different time-courses of degradability. None of these bands were detected by SDS-PAGE after 48 h rumen incubation. The 21 and 42 kDa polypeptides showed the major resistance to rumen microbial proteolysis with respective degradation percentages of 3.6 and 24.5 after 2 h, 74.4 and 54.4 after 8 h, and 86.6 and 91.2 after 24 h.

The relative amino-acid distributions of the 21 and 42 kDa were the following: 30.4 and 22.4 hydrophobic residues, 0.6 and 2.3 cysteine, and 14.0 and 14.7 basic residues, respectively.

Our results show that the study of fractional protein degradation is an important task in order to find dietary protein fractions with higher rumen bypass. The amino-acid composition of sunflower seed 21 and 42 kDa polypeptides indicated that slight amino-acid differences can be responsible for different susceptibilities to rumen microbial proteolysis.

**Effect of the rate of energy supply on nitrogen digestion in dairy cows fed a fresh forage diet.** JL Peyraud, L Astigarraga (*Station de Recherches sur la Vache Laitière, 35590 Saint-Gilles, France*)

The digestion of high-nitrogen (N) grass diets is characterized by a high rate of ammonia production and ruminal N losses. N could be used more efficiently if the rate of dietary energy supply and N release were synchronised.

The effects of supplementing white clover (42.5 gN/kg DM) with wheat, whose rate of energy release matches ammonia production from white clover, or beet pulp (respectively 93 and 51% digestible OM (DOM) disappearing after 4 h incubation *in sacco*), on digestion were investigated in a cross-over design on 6 fistulated dairy cows (21 kg milk). Fresh grass was given *ad libitum* in 3 meals per day. Concentrates made up 30% of the diet and were distributed before the first and the last forage meals. Wheat straw (500 g/d) was offered to prevent bloating. The flow of duode-