

Nouvelles méthodes d'estimation de la valeur alimentaire des fourrages

II - Méthodes enzymatiques

J. Aufrère et B. Michalet-Doreau

Les méthodes de laboratoire utilisées pour estimer la valeur nutritive des aliments doivent être mises au point à partir d'échantillons mesurés *in vivo* (digestibilité de la matière organique pour la prévision de la valeur énergétique, dégradabilité théorique en sachets de nylon pour la prévision de la valeur azotée des aliments). Les méthodes chimiques, très employées il y a une quarantaine d'années, ont tendance à être abandonnées car elles donnent souvent des résultats dont la fiabilité est peu satisfaisante. Les méthodes biologiques, basées sur la simulation *in vitro* de la digestion microbienne, sont fiables mais elles présentent l'inconvénient d'une mise en œuvre délicate due à la nécessité de disposer d'animaux fistulés.

Parmi les méthodes modernes d'estimation, les méthodes enzymatiques présentent certains avantages : ce sont des tests rapides, reproductibles, économiques qui ne font pas appel aux animaux. Elles doivent pouvoir être appliquées à des aliments très différents et, pour cela, les enzymes utilisées doivent être peu spécifiques

MOTS CLÉS

Fourrages, méthode d'estimation, méthode enzymatique, prévision, valeur alimentaire, valeur azotée, valeur énergétique.

KEY-WORDS

Energy value, enzymatic methods, feeding value, forages, method of evaluation, nitrogen value, predicting.

AUTEURS

Unité "valeur alimentaire", I.N.R.A., Theix, F-63122 St-Genes-Champanelle.

(NOCEK, 1988). De plus, elles doivent être simples afin de pouvoir être mises en application dans les laboratoires d'analyses en série. Ces méthodes, plus précises que les méthodes chimiques (AUFRÈRE et MICHALET-DOREAU, 1988), restent cependant parfois délicates à utiliser ; nous nous proposons d'examiner ici certaines conditions à prendre en compte pour leur bonne utilisation au laboratoire.

Prévision de la valeur énergétique

Au laboratoire, la digestibilité des fourrages peut être prévue à partir de la composition chimique, mais à condition d'utiliser des équations de régression spécifiques à chaque espèce et chaque cycle. Ces équations ne peuvent cependant être utilisées pour prévoir la digestibilité des fourrages à flore complexe : mélanges semés et prairies naturelles ; il faut alors avoir recours à d'autres méthodes.

L'activité cellulolytique étant la principale caractéristique de la population microbienne du rumen, de nombreux auteurs après DONEFER et al. (1963) et JARRIGE et al. (1970), ont cherché à reproduire cette activité en utilisant des préparations cellulolytiques souvent extraites de champignons. Depuis, de très nombreuses méthodes de digestibilité à la cellulase ont été proposées (tableau 1). Elles présentent des variantes, notamment par la nature des enzymes cellulolytiques qui peuvent être classées comme suit :

— des préparations fongiques principalement (*trichoderma viride*, *aspergillus niger*, *trichoderma reesi*) ;

— des cocktails d'enzymes (hémicellulases, cellulases, protéases...) (MCQUEEN et VAN SOEST, 1975 ; CASTAGNA et al., 1984 ; RIVEROS et ARGAMENTERIA, 1988) ;

— des enzymes purifiées qui permettent de connaître le mode d'action de ces enzymes (HUNGATE et al., 1983 ; NOCEK et HALL, 1984 ; GABRIELSEN, 1986) ;

— des préparations microbiennes extraites des fécès qui seraient plus proches des conditions du rumen (OMED et al., 1989).

Un pré- ou post-traitement est le plus souvent associé à l'action des enzymes. Les pré-traitements les plus employés sont la pepsine dans de l'acide chlorhydrique à différentes concentrations et/ou à différentes températures (JONES et HAYWARD, 1973 et 1975 ; KELLNER et KIRCHGESSNER, 1977) ; des détergents acides ou neutres (MCQUEEN et VAN SOEST, 1975 ; HARTLEY et al., 1974 ; DOWMAN et COLLINS, 1982) ; du Na₂SO₃ (ABE et al., 1972). CLARK et BEARD (1977), LILA et al. (1986) associent des enzymes amylolytiques à la pepsine pour estimer la digestibilité de rations contenant des graines de céréales. L'intérêt de ces pré-traitements est surtout de diminuer l'erreur de prédiction (OSBOURN et SIDONS, 1980).

Méthodes enzymatiques pour estimer la valeur alimentaire

Référence	Type de fourrage utilisé (nb de répétitions)	Méthode utilisée	r	Sr
DONEFER et al. (1963)	Fourrages verts de graminées et légumineuses (14)	"Cellulase 36" + pepsine 24 h à 40° C	0,93	
JARRIGE et al. (1970)	Fourrages verts, foin et ensilages (129)	Cellulase "SEAB" 24 h à 40° C	0,87	3,5
ABE et al. (1972)	Graminées et pailles	Pré-traitement Na ₂ SO ₄ +Cellulase		
HARTLEY et al. (1974)	Graminées et légumineuses (45)	NDF + Cellulase "Basidiomycètes" 16 h à 37°C	0,90	1,4
JONES et HAYWARD (1973)	Graminées	Cellulase "BDH"	0,92	2,5
JONES et HAYWARD (1975)	Fourrages verts, graminées et légumineuses (19)	Pepsine HCl 0,1N 24 h à 40°C + Cellulase "BDH" 48 h à 40°C	0,93	2,9
MCQUEEN et VAN SOEST (1975)	Fourrages verts, graminées et légumineuses (18)	Cellulase + Hemicellulase	0,80	
TINIMIT et THOMAS (1976)	Fourrages verts et foin (12)	Pepsine HCl 0,075N à 39°C 60 h + Cellulase "Marschall" 60h à 39°C	0,88	2,4
KELLNER et KIRCHGESSNER (1977)	Fourrages verts et conservés (47)	HCl 2N 30mn à 100°C + Cellulase 24h à 40°C + pepsine 24h à 40°C	0,94	3,5
ADEGBOLA et PALADINES (1977)	Fourrages tropicaux de graminées et légumineuses (11)	Pepsine HCl 0,05 N 48 h à 40°C + Cellulase "Trichoderma"	0,98	2,3
CLARK et BEARD (1977)	Fourrages verts, foin et pailles (23)	Pepsine HCl 0,1N 24h à 40°C + Cellulase "aspergillus niger" 48 h à 40°C	0,80	4,7
DOWMAN et COLLINS (1977)	Ensilages (45)	Pepsine HCl 0,1 N 24 h à 40°C + Cellulase "BDH" 24 h à 40°C	0,85	2,2
GOTO et MINSON (1977)	Fourrages tropicaux (45)	Pepsine HCl 0,1N 48h à 40°C + Cellulase "Onozuka SS-P 1500" 48 h à 40°C	0,94	2,7
ROUGHAN et HOLLAND (1977)	Graminées et légumineuses (34)	NDF, Cellulase "Trichoderma viride" 5 h à 50°C	0,98	2,8
TSUTSUMI et ABE (1977)	Graminées et légumineuses (12)	NDF, Cellulase		
TERRY et al. (1978)	Graminées et légumineuses (73)	Pepsine HCl 0,1N 24 h à 40°C + Cellulase "BDH"	0,82	3,8
McLEOD et MINSON (1978)	Graminées et légumineuses tropicales (82)	Pepsine HCl 0,1N 48h à 39°C + Cellulase "Onozuka SS-P 1500" 48 h à 39°C		2,8
CARLIER et al. (1979)	Fourrages verts et foin de graminées (19)	Pepsine HCl 0,1N 24 h à 40°C + Cellulase "BDH" 48 h à 40°C	0,91	2,52
ADAMSON et TERRY (1980)	Foin (34)	Pepsine HCl 0,1N 24 h à 40°C + Cellulase "BDH" 48 h à 40°C	0,51	2,4
McLEOD et MINSON (1980)	Graminées et légumineuses tropicales (80)	Pepsine HCl 0,1N 48 h à 39°C + Cellulase "Onozuka 3S" 48h à 39°C		2,9
BARTHIAUX-THILL et al. (1980)	Fourrages verts (26)	Comparaison de méthodes		
AUFRERE J. (1982)	Graminées et légumineuses (154)	Pepsine HCl 0,1N 24h à 40°C + Cellulase "Onozuka R10" 24h à 40°C	0,92	2,3
DOWMAN et COLLINS (1982)	Ensilages de graminées, de maïs et foin (56)	Comparaison de méthodes		1,7 à 3
PACE et al. (1984)	Graminées et légumineuses (32)	Comparaison de méthodes		
VANDERHAEGHE et BISTON (1987)	Fourrages verts, foin et ensilages (91)	Pepsine HCl 0,1N 24 h à 40°C + Cellulase "BDH" 24 h à 40°C		2 à 2,4
DE BOEVER et al. (1988)	Fourrages, ensilages et pailles (80)	Pepsine HCl 0,1N 24h à 40°C + Hydrolyse 45mn à 80°C + Cellulase 24 h à 40°C	0,94	1,96
GIVENS (1989)	Ensilages (124)	Comparaison de méthodes		

TABLEAU 1 : Pour des fourrages, liaisons entre la digestibilité in vivo et la digestibilité à la cellulase, selon différents auteurs.

TABLE 1 : Relation between in vivo digestibility and cellulase digestibility for forages, according to various authors.

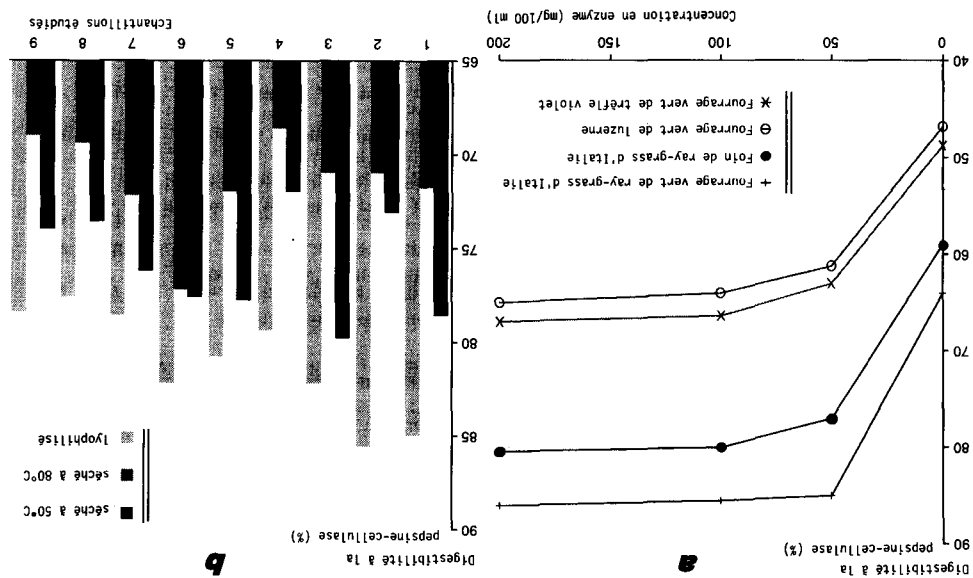


FIGURE 1 : Influence sur la digestibilité à la pepsine-cellulase, a) de la concentration en cellulase "Onozuka R10", b) du conditionnement pour du fourrage vert de trèfle violet.

FIGURE 1 : Effect on pepsin-cellulase digestibility of a) "Onozuka R10" concentration, b) processing of red clover fresh forage.

En général, des quantités importantes d'enzymes sont utilisées (100 mg/100 ml de tampon pour la méthode que nous utilisons, figure 1a), ces méthodes sont donc relativement peu sensibles aux variations de l'activité cellulolytique de l'enzyme utilisée, comme le confirment les résultats de CLARKE et al. (1982).

Le mode de conditionnement de l'échantillon peut avoir une incidence sur la digestibilité par la cellulase. Différents modes de conservation (lyophilisation, séchage à 50°C et 80°C) ont été comparés sur des fourrages verts. Les résultats de la figure 1b indiquent que la digestibilité à la pepsine-cellulase est plus élevée pour les fourrages lyophilisés que pour les fourrages séchés à 50°C et 80°C. Elle diminue quand la température de séchage augmente, mais de façon différente selon les fourrages. De plus, on sait qu'une température de séchage trop élevée (>80°C) peut entraîner des modifications importantes du fourrage (réactions de Maillard) avec formation de complexes inaccessibles aux enzymes.

Les méthodes enzymatiques permettent une bonne précision (d'environ 2 points) de la prévision de la digestibilité des fourrages (JONES et HAYWARD, 1975 ; OSBOURN

et SIDONS, 1980 ; ADAMSON et TERRY, 1980 ; VANDERHAEGHE et BISTON, 1987 ; DE BOEVER et al., 1988 ; AUFRÈRE et DEMARQUILLY, 1989). Ces méthodes, bien que plus répétables et reproductibles (WAINMAN et al., 1981 ; VAN DER MEER, 1983), sont en général un peu moins précises (COEHLO et al., 1988 ; DE BOER et al., 1988 ; GIVENS et al., 1989) ou équivalentes (DOWMAN et COLLINS, 1982) à celles utilisant du jus de rumen. En revanche, elles nécessitent souvent l'emploi d'équations de prévision différentes selon la famille ou l'espèce végétale et le mode de conservation du fourrage, à la différence des méthodes utilisant du jus de rumen (MCQUEEN et VAN SOEST, 1975 ; TERRY et al., 1978 ; PACE et al., 1984 ; AUFRÈRE, 1982 ; AUFRÈRE et DEMARQUILLY, 1989).

En conclusion, les méthodes à la cellulase permettent une bonne prévision de la digestibilité de la matière organique des fourrages. Certaines peuvent d'ailleurs être utilisées à la fois pour les fourrages, les sous-produits, les aliments concentrés et composés (AUFRÈRE et DEMARQUILLY, 1989). Elles sont très nombreuses et il serait souhaitable de les standardiser si l'on veut comparer les résultats obtenus par les différents auteurs, et surtout utiliser les mêmes équations de prévision.

Prévision de la valeur azotée

Contrairement aux méthodes enzymatiques de prévision de la valeur énergétique, il existe peu de méthodes enzymatiques de prévision au laboratoire de la valeur azotée ; elles ont été en général mises au point sur des aliments concentrés et n'ont été testées que très rarement sur les fourrages. La valeur de référence est la dégradabilité *in sacco* ou les méthodes *in vivo* et actuellement les valeurs de référence sont trop peu nombreuses.

Jusqu'à maintenant les méthodes de prévision utilisées étaient basées sur la solubilité dans des solutions tampons. Elles varient par la nature, la température, le pH, la force ionique des solutions, le temps de contact, le degré d'agitation (HENDERICKX et MARTIN, 1963 ; WOHLT et al., 1973 ; CROOKER et al., 1978 ; VÉRITÉ et DEMARQUILLY, 1978 ; WALDO et GOERING, 1979 ; KRISHNAMOORTHY et al., 1982 ; STERN et SATTER, 1982 ; SATTER, 1986). Le fait de rajouter dans les solutions tampons des enzymes devrait permettre, comme dans le rumen, de dégrader une fraction des protéines insolubles et, par là, de mieux prédire la dégradabilité des constituants azotés dans le rumen.

Des enzymes d'origines différentes sont utilisées pour prévoir la dégradabilité de l'azote des aliments dans le rumen. Les principales catégories d'enzymes utilisées sont répertoriées dans le tableau 2. Les enzymes du commerce employées ont des origines très différentes et ne peuvent simuler qu'en partie l'activité des complexes enzymatiques du rumen (MAHADEVAN et al., 1987) ; des enzymes purifiées extraites

ENZYMES DU COMMERCE

Références

* enzymes bactériennes

streptomyces griseus

SNIFFEN et al., 1979 (foins et aliments concentrés)
 PICHARD et VAN SOEST, 1977 (foins et aliments concentrés)
 KRISNAMOORTHY et al., 1982 (1 foin, 1 ensilage, 12 aliments composés)
 SIDDONNS et al., 1985 (1 foin)
 POOS-FLOYD et al., 1980-1985 (9 aliments concentrés)
 SUSMELL et al., 1989 (1 foin, 2 ensilages et 13 aliments concentrés)
 JANICKI et STALLINGS, 1988 (foins et ensilages)
 AUFRERE et al., 1989 (97 aliments concentrés, 49 aliments composés, 21 foins)
 GENEST, 1982 (pronase E) (58 aliments concentrés et aliments composés)

* enzymes non bactériennes

. origine végétale

ficine (ficus glabrata)
 bromelain (ananas cosmosus)
 papaine (corica papaya)

GENEST, 1982 (papaine) (58 aliments concentrés et aliments composés)
 POOS-FLOYD et al., 1985 (ficine, bromelain, papaine) (9 aliments concentrés)

. origine animale

trypsine
 pepsine
 pancréatine

BEEVER et al., 1976 (pepsine)
 MEHREZ et al., 1980 (pepsine) (farine de poisson)
 SIDDONNS et BEEVER, 1981 (11 foins et ensilages)
 GENEST, 1982 (pepsine, trypsine) (58 aliments concentrés et aliments composés)
 SIDDONNS et al., 1985 (pancréatine, pepsine) (1 foin et 3 aliments concentrés)

. origine fongique

aspergillus oryzae

POOS-FLOYD et al., 1985 (9 aliments concentrés)

ENZYMES BACTERIENNES PURIFIEES

extraites du jus de rumen

streptococcus bovis
 butyrivibrio strain
 bacteroides amylophilus

LAYCOCK et al., 1985 (aliments concentrés)
 RUSSEL et al., 1981 (aliments concentrés)
 MAHADEVAN et al., 1980 (aliments concentrés)

TABEAU 2 : Enzymes utilisées par différents auteurs pour la prévision de la valeur azotée des fourrages et des autres aliments.

TABLE 2 : Enzymes used by different authors for prediction of nitrogen value of forages and other feeds.

du jus de rumen se rapprocheraient plus des conditions physiologiques du rumen mais leur utilisation dans les laboratoires d'analyses en série semble difficile actuellement.

Pour un même aliment, comme l'ont montré SIDDONNS et al. (1985), la dégradation enzymatique de l'azote varie suivant la nature et la concentration de l'enzyme utilisée (figure 2), de la durée de l'attaque..., mais la proportion d'azote dégradé est également (et c'est ce que l'on cherche à mesurer) dépendante de la nature du substrat (MAHADEVAN et al., 1980) et de la localisation des protéines dans l'aliment (TAMMINGA, 1983).

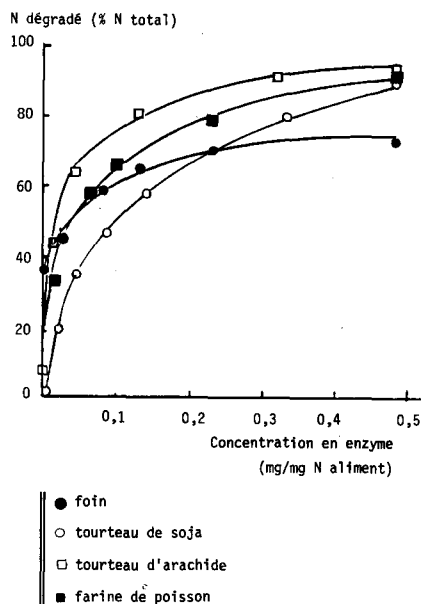


Figure 2

FIGURE 2 : Influence du rapport enzyme/substrat sur la quantité d'azote dégradé par une protéase après une incubation de 18 heures à 39°C sur un foin, du tourteau de soja, du tourteau d'arachide, de la farine de poisson (SIDONS et al., 1985).

FIGURE 2 : Effect of enzyme : substrate ratio on the amount of feedstuff nitrogen digested during an 18 hours incubation of hay, soy-bean meal, groundnut meal and fish meal with protease at 39°C (SIDONS et al., 1985).

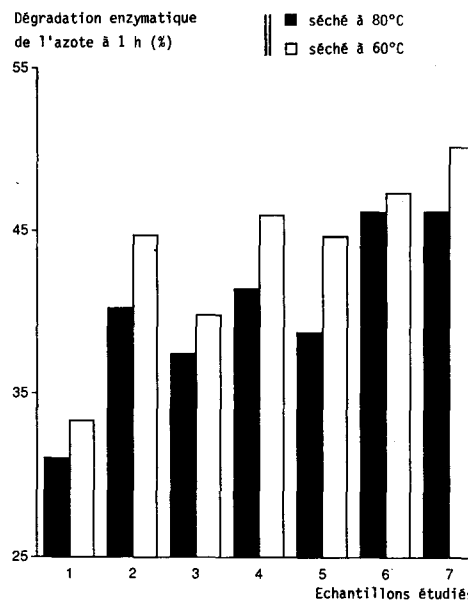


Figure 3

FIGURE 3 : Influence de la température de séchage des échantillons sur la dégradation enzymatique de l'azote à 1 heure pour des aliments composés.

FIGURE 3 : Effect of drying on enzymatic nitrogen degradation at 1 hour on feed mixtures.

Contrairement aux méthodes enzymatiques de prévision de la valeur énergétique, les méthodes enzymatiques de prévision de la valeur azotée utilisent de faibles concentrations en enzymes (rapport enzyme/substrat de 0,05 pour la méthode pepsine-cellulase et de 0,002 pour la méthode enzymatique de prévision de valeur azotée que nous utilisons au laboratoire). Il est donc possible de réaliser des cinétiques de dégradation enzymatique de l'azote en fonction du temps et de les comparer à celles obtenues dans le rumen. Nos résultats, en accord avec ceux de NOCEK et al. (1983), montrent que la dégradation de l'azote des aliments varie en fonction du

rapport enzyme/substrat, au moins pour les aliments concentrés, une augmentation de la concentration en enzyme pouvant accroître ou non la dégradabilité de l'azote de certains aliments. Dans le but d'utiliser des équations de prévision valables pour une gamme étendue d'aliments, un même rapport enzyme/substrat a été retenu pour tous les aliments (AUFRÈRE et CARTAILLER, 1988) ; la concentration de la protéase utilisée (extraite de *Streptomyces griseus*) est faible, quoique voisine de celle mesurée dans le rumen (KRISHNAMOORTHY, 1982).

La dégradation de l'azote des aliments est donc très sensible à la concentration en enzyme et il est donc impératif, avant d'utiliser un nouveau lot d'enzyme, de tester son activité.

Le mode de conditionnement de l'échantillon peut avoir une incidence sur la dégradation enzymatique de l'azote comme l'indiquent les résultats présentés dans la figure 3 et qui se rapportent à des aliments concentrés et composés : deux températures de séchage des échantillons (60°C et 80°C) ont été testées. On constate, de façon générale, que la dégradation enzymatique de l'azote est plus élevée si l'aliment est séché à 60°C, mais cette augmentation est variable selon l'aliment, ces variations étant sans doute dues à la nature des protéines de l'aliment.

Le broyage de l'échantillon peut avoir également une influence sur la dégradation de l'azote de l'aliment : des aliments concentrés et composés ont été broyés à différentes grilles (0,6 ; 0,8 ; 1,0 ; 1,5 mm). Les résultats de la figure 4 montrent qu'en fait les différences de dégradation observées sont peu importantes, au moins pour les aliments étudiés. L'effet du conditionnement a été également étudié pour des fourrages verts et des ensilages de graminées et légumineuses (figure 5). La dégradation enzymatique, au temps 24 heures, de l'azote est plus élevée si le fourrage est lyophilisé ; le séchage à 60°C entraîne une dégradation plus faible et le séchage

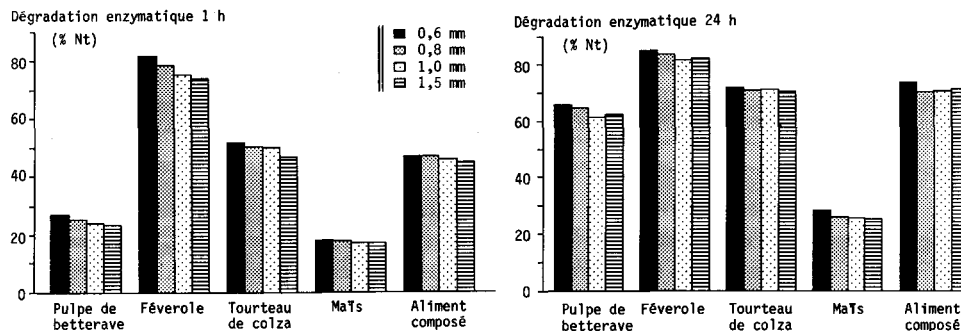


FIGURE 4 : Influence du broyage sur la dégradation enzymatique de l'azote.

FIGURE 4 : Effect of grinding on nitrogen enzymatic degradation.

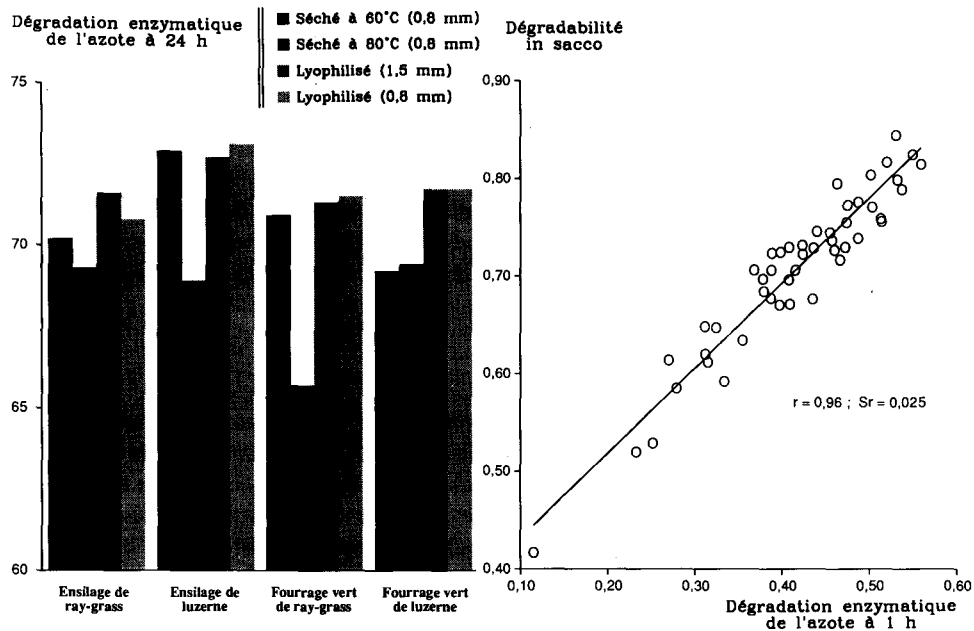


Figure 5

Figure 6

FIGURE 5 : Influence du mode de séchage sur la dégradation enzymatique de l'azote à 24 heures pour des ensilages et des fourrages verts.

FIGURE 5 : Effect of processing on nitrogen enzymatic degradation at 24 hours on silages and fresh forages.

FIGURE 6 : Liaison entre la dégradabilité in sacco et la dégradation enzymatique de l'azote au temps 1 heure pour 49 aliments composés.

FIGURE 6 : Relation between in sacco degradability and enzymatic nitrogen degradation at 1 hour for 49 feed mixtures.

à 80°C une forte diminution de la dégradation de l'azote ; la diminution est plus importante pour la luzerne que pour le ray-grass.

Les méthodes enzymatiques de dégradation de l'azote publiées jusqu'à maintenant ont été mises en œuvre sur un petit nombre d'échantillons et il est difficile de les comparer. Pour les foin, la dégradabilité théorique mesurée in sacco (DT) est étroitement liée à la teneur en matières azotées totales. L'introduction de la dégradation enzymatique apporte, cependant, une amélioration de la prévision pour des foin récoltés humides et ayant subi un échauffement (AUFÈRE et al., 1989). En

revanche, les résultats obtenus pour 49 aliments composés (AUFRÈRE et al., 1989) indiquent qu'il existe une bonne précision de la prévision de la valeur azotée en utilisant des enzymes du commerce (figure 6).

En résumé, les méthodes enzymatiques permettent de prévoir avec une bonne précision la dégradabilité de l'azote des aliments. Peu onéreuses par rapport aux méthodes de référence (mesures in sacco), elles présentent en outre certains avantages par rapport à ces dernières : il n'y a pas de contamination microbienne des résidus de sachets, ni de pertes de particules à travers les mailles du sachet.

Conclusion

Les méthodes enzymatiques peuvent trouver des applications très importantes au niveau des laboratoires pour la prévision de la valeur nutritive des aliments. Peu onéreuses par rapport aux méthodes in vivo de référence, elles sont également beaucoup plus rapides et plus faciles à mettre en œuvre dans les laboratoires d'analyse en série. Elles sont en général précises, répétables et reproductibles, mais il est impératif de suivre scrupuleusement le protocole de la méthode, de mettre des témoins dans chaque série d'analyses, de mesurer l'activité de l'enzyme à chaque nouvel approvisionnement.

Le conditionnement de l'échantillon (finesse de broyage, mais aussi température et mode de séchage de l'échantillon) doit impérativement être respecté.

Accepté pour publication, le 13 avril 1990

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABE A., HORII S. et KAEMEOKA K. (1972) : "Development and application of cellulase hydrolysis for predicting digestibility of roughage. 2- Influence of pretreatment of samples on cellulase hydrolysis", *Jpn. J. Zoot. Sci.*, 43, 146-154.
- ADAMSON A.H. et TERRY G.R. (1980) : "The relationship between the in vivo digestibility of hay and its solubility in pepsin-hydrochloric acid and fungal cellulase solutions", *J. Sci. Food Agric.*, 31, 854-856.
- ADEGBOLA A. A. et PALADINES O. (1977) : "Prediction of the digestibility of the dry matter of tropical forages from their solubility in fungal cellulase solutions", *J. Sci. Food Agric.*, 28, 775-785.
- AUFRÈRE J. (1982) : " Etude de la prévision de la digestibilité des fourrages par une méthode enzymatique ", *Ann. Zootechn.*, 31, 111-130.
- AUFRÈRE J. et CARTAILLER D. (1988) : "Mise au point d'une méthode de laboratoire de prévision de la dégradabilité des protéines alimentaires dans le rumen", *Ann. Zoot.*, 37, 255-270.

- AUFRÈRE J. et MICHALET-DOREAU B. (1988) : "Comparison of methods for predicting digestibility of feeds", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 20, 203-218.
- AUFRÈRE J. et DEMARQUILLY C. (1989) : "Predicting organic matter digestibility of forage by two pepsin-cellulase methods", *XVIIth Int. Grassl. Congr.*, Nice, France, vol 2, 877-878.
- AUFRÈRE J., GRAVIOU D., DEMARQUILLY C., VÉRITÉ R., MICHALET-DOREAU B. et CHAPOUTOT P. (1989) : "Aliments concentrés pour ruminants : prévision de la valeur azotée PDI à partir d'une méthode enzymatique standardisée", *I.N.R.A. Prod. Anim.*, 2, 249-254.
- AUFRÈRE J., MICHALET-DOREAU B., GRAVIOU D. et VÉRITÉ R. (1989) : "Predicting in sacco degradability of hay protein by chemical or enzymatic methods", *XVIIth Int. Grassl. Congr.*, Nice, France, vol 2, p 887-888.
- BARTHIAUX-THILL N., FABRY J., BISTON R., BOUKHARTA M. (1980) : "Estimation in vitro de la digestibilité de l'herbe de prairie permanente par la cellulase. 2. Corrélations avec la digestibilité mesurée in vitro ou estimée in vitro selon Tilley et Terry", *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 15, 297-307.
- BEEVER D.E., THOMSON D. J. et CAMEL S.B. (1976) : "The digestion of frozen and dried grass by sheep", *J. Agric. Sci. Camb.*, 86, 443-452.
- CARLIER L. A., VAN HEE L. P. et ANDRIES A. P. (1979) : "Estimation de la digestibilité des fourrages grossiers par le traitement à la pepsine-cellulase ou au jus de rumen-pepsine", *Rev. Agric.*, 1, 32, 147-157.
- CASTAGNA A., SAUVANT D., DORLEANS M. et GIGER S. (1984) : "Etude de la dégradabilité enzymatique des aliments concentrés et sous-produits", *Ann. Zootech.*, 33, 265-290.
- CLARK J. et BEARD J. (1977) : "Prediction of the digestibility of ruminant feeds from their solubility in enzyme solutions", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2, 153-159.
- CLARKE T., FLINN P.C. et MCGOWAN A.A. (1982) : "Low-cost pepsin-cellulase assays for prediction of digestibility of herbage", *Grass and Forage Science*, 37, 147-150.
- COELHO M., HEMBRY F.G., BARTON F.E., SAXTON A.M. (1988) : "A comparison of microbial, enzymatic, chemical and near-infrared reflectance spectroscopy methods in forage evaluation", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 20, 219-231.
- CROOKER B.A., SNIFFEN C.J., HOOVER W.H. et JOHNSON L.L. (1978) : "Solvents for soluble nitrogen measurements in feedstuffs", *J. Dairy Sci.*, 61, 437-447.
- DE BOEVER J.L., COTTYN B.G., ANDRIES J.I., BUYSSE F.X. et VANACKER J.M. (1988) : "The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of forages", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 19, 247-260.
- DONEFER E., NIEMANN P.J., CRAMPTON E.W. et LLOYD L.E. (1963) : "Dry matter disappearance by enzyme and aqueous solutions to predict nutritive value of forages", *J. Dairy Sci.*, 46, 965-970.
- DOWMAN M.G. et COLLINS F.C. (1977) : "The prediction of the digestibility of silages using cellulase", *J. Sci. Food Agric.*, 28, 1071-1074.
- DOWMAN M.G. et COLLINS F.C. (1982) : "The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds", *J. Sci. Food Agric.*, 33, 689-696.
- GABRIELSEN B.C. (1986) : "Evaluation of marketed cellulases for activity and capacity to degrade forage", *Agron. J.*, 78, 838-842.

- GENEST C. (1982) : *Mise au point d'une méthode d'estimation in vitro de la dégradation des protéines dans le rumen et sa relation avec la détermination in vivo du flux d'azote alimentaire à l'entrée de l'intestin grêle*, thèse présentée à l'Université de Clermont II (U.E.R. de Recherche), 113 pages.
- GIVENS D.I., EVERINGTON J.M. et ADAMSON A.H. (1989) : "The digestibility and metabolisable energy content of grass silage and their prediction from laboratory measurements", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 24, 27-43.
- GOTO I. et MINSON D. J. (1977) : "Prediction of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulase assay", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 2, 247-253.
- HARTLEY R.D., JONES E.L. et FENLON J.S. (1974) : "Prediction of the digestibility of forages by treatment of their cell walls with cellulolytic enzymes", *J. Sci. Food Agric.*, 25, 947-954.
- HENDERICKX H. et MARTIN J. (1963) : "In vivo study of the nitrogen metabolism in the rumen", *Comptes-rendus de Recherches, Sci. Ind. Agr.*, Bruxelles, 31, 1.
- HUNGATE R.E., STACK R.J., GREVE L.C. et LABAVITCH J.L. (1983) : "An enzymatic approach to cell wall structure", *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 13, 51.
- JANICKI F.J. et STALLINGS C.C. (1988) : "Degradation of crude protein in forages determined by in vitro and in situ procedures", *J. Dairy Sci.*, 71, 2440-2448.
- JARRIGE R., THIVEND P. et DEMARQUILLY C. (1970) : "Development of cellulolytic enzyme digestion for predicting the nutritive value of forages", *Proc. 11th Intern. Grassld Congr.*, Paradise, Australia, 762-768.
- JONES D.I.H. et HAYWARD M.V. (1973) : "A cellulase digestion technique for predicting the dry matter digestibility of grasses", *J. Sci. Food Agric.*, 24, 1419-1426.
- JONES D.I.H. et HAYWARD M.V. (1975) : "The effect of pepsin pre-treatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulase solutions", *J. Sci. Food Agric.*, 26, 711-718.
- KELLNER R.J. et KIRCHGESSNER M. (1977) : "Estimation of forage digestibility by a cellulase method", *Z. Tierphysiol. Tierernährg. Futtermittelkde*, 39, 9-16.
- KRISHNAMOORTHY U. (1982) : *Development of an vitro technique to estimate rumen escape nitrogen in feedstuff*, Ph. D. thesis, Cornell University U.S.A., pp 169.
- KRISHNAMOORTHY U., MUSCATO T.V., SNIFFEN C.J. et VAN SOEST P.J. (1982) : "Nitrogen fractions in selected feedstuffs", *J. Dairy Sci.*, 65, 217-225.
- KRISHNAMOORTHY U., SNIFFEN C.J. et VAN SOEST P.J. (1982) : "Nitrogen fractionation in ruminant feedstuffs for feed evaluation", *Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, p. 95-101.
- LAYCOCK K.A., HAZLEWOOD G. P. et MILLER E.L. (1985) : "Potential use of proteolytic rumen for bacteria for assessing feed protein degradability in vitro", *Proc. Nutr. Soc.*, 44, 54A.
- LILA M. BARRIERE Y. et TRAINÉAU R. (1986) : "Mise au point et étude d'un test enzymatique de la digestibilité de fourrages pauvres ou riches en amidon", *Agronomie*, 6, 285-291.
- MAHEDEVAN S., ERFLE J. D. et SAUER F.D. (1980) : "Degradation of soluble and insoluble proteins by Bacteriodes amylophilus protease and by rumen microorganisms", *J. Anim. Sci.*, 50, 723-728.

- MAHADEVAN S., SAUER F.D. et ERFLE J.D. (1987) : "Preparation of protease from mixed rumen microorganisms and its use for the in vitro determination of the degradability of true protein in feedstuffs", *Can. J. Anim. Sci.*, 67, 55-64.
- MC LEOD M.N. et MINSON D.J. (1978) : "The accuracy of the pepsin cellulase technique for estimating the dry matter digestibility in vivo of grasses and legumes", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 3, 277-287.
- MC LEOD M.N. et MINSON D.J. (1980) : "A note on Onozuka 3S cellulase as a replacement for Onozuka SS (P1500) cellulase when estimating forage digestibility in vitro", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 5, 347-350.
- MCQUEEN R. et VAN SOEST P.J. (1975) : "Fungal cellulase and hemicellulase prediction of forage digestibility", *J. Dairy Sci.*, 58, 1482-1491.
- MEHREZ A.Z., ORSKOV E.R. et OPSTVEDT J. (1980) : "Processing factors affecting degradability of fishmeal in the rumen", *J. Anim. Sci.*, 50, 737-744.
- NOCEK J. E., HERBEIN J.A. et POLAN C.E. (1983) : "Total amino acid release rates of soluble and insoluble protein fractions of concentrate feedstuffs by *Streptomyces Griseus*", *J. Dairy Sci.*, 66, 1663-1667.
- NOCEK J.E. et HALL M.B. (1984) : "Characterization of soyhull fiber digestion by in situ and in vitro enzymatic procedures", *J. Dairy Sci.*, 67, 2599-2607.
- NOCEK J. E. (1988) : "In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. A review", *J. Dairy Sci.*, 71, 2051-2069.
- OMED H.M., AXFORD F.E., CHAMBERLAIN A.G. et GIVENS D.I. (1989) : "A comparison of three laboratory techniques for the estimation of the digestibility of feedstuffs for ruminants", *J. Agric. Sci.*, 113, 35-39.
- OSBOURN D.F. et SIDONS R.C. (1980) : "Enzymatic methods to predict the value of the energy and protein in feedingstuffs", *Ann. Zootech.*, 29 No. h.s., 325-336.
- PACE V., BARGE M.T., SETTINERI D. et MALLOSINI F. (1984) : "Comparison of forage digestibility in vivo with enzymic solubility", *Anim. Feed Sci. Technol.*, 11, 125-136.
- PICHARD G. R. et VAN SOEST P.J. (1977) : "Protein solubility of ruminants feeds", *Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, 91-98.
- POOS M., KLOPFENSTEIN T., BRITTON R.A. et OLSON D.G. (1980) : "An enzymatic technique for determining ruminal protein degradation", *J. Dairy Sci.*, 63 (suppl. 1) 141 (abstr).
- POOS-FLOYD M., KLOPFENSTEIN T. et BRITTON R.A. (1985) : "Evaluation of laboratory techniques for predicting ruminal protein degradation", *J. Dairy Sci.*, 68, 829-839.
- RIVEROS V.E. et ARGAMENTERIA A. (1988) : "Enzymatic predictive method of forage organic matter digestibility using Hcl-Protease-Cellulase", *In Vitro News Letter*, 4, 13-14.
- ROUGHAN P. G. et HOLLAND R. (1977) : "Predicting in vivo digestibilities of herbages by exhaustive enzymic of cell walls", *J. Sci. Food Agric.*, 28, 1057-1064.
- RUSSEL J.B., BOTTJE W.G. et COTTA M.A. (1981) : "Degradation of protein by mixed cultures of rumen bacteria : identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium", *J. Anim. Sci.*, 53, 242-252.

- SATTER L.D. (1986) : "Symposium : protein and fiber digestion, passage and utilization in lactating cows. Protein supply from undegraded dietary protein", *J. Dairy Sci.*, 69, 2734-2749.
- SIDDONS R. C., BEEVER D. E. (1981) : "Prediction of the protein value of forage- based diets", *The Grassland Research Institute Annual Report*, 83-85.
- SIDDONS R.C., PARADINE J., GALE D.L. et EVANS R.T. (1985) : "Estimation of the degradability of dietary protein in the sheep rumen by in vivo and in vitro procedures", *Brit. J. Nutr.*, 54, 545-561.
- SNIFFEN C.J., HOOVER W.H., JUNKINS L.L., CROOKER B.A. et MACGREGOR C. A. (1979) : "Variation in protein and soluble carbohydrate composition of various feedstuffs", *Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, 119-125.
- STERN M.D. et SATTER L.D. (1982) : "In vivo estimation of protein degradability in the rumen", *Protein requirements for cattle : symposium*, Ed. F. N. Owens, Oklahoma State Univ., Stillwater.
- SUSMELL P., STEFANON B., MILLS C.R. et COLITTI M. (1989) : "A comparison between the in situ rumen degradability and in vitro protein solubility of some feedstuffs", *Ann. Zoot.* (sous-*presse*).
- TAMMINGA S. (1983) : "Recent advances in our knowledge on protein digestion and absorption in ruminants", *IVth Int. Symp. Protein metabolism and nutrition*, Clermont-Ferrand (France), 5-9 septembre 1983, Ed. INRA Publ., 1983, Vol I (Les Colloques de l'INRA, n°16), 263-287.
- TERRY R.A., MUNDELL D.C., OSBOURN D.F. (1978) : "Comparison of two in vitro procedures using rumen liquor-pepsin or pepsin-cellulase for prediction of forage digestibility", *J. Br. Grassl. Soc.*, 33, 13-18.
- TINNIMIT P. et THOMAS J. W. (1976) : "Forage evaluation using various laboratory techniques", *J. anim. Sci.*, 43, 5, 1051-1065.
- TSUTSUMI M., et ABE A. (1977) : "Comparison of results using five methods for prediction of forage digestibility", *J. Japan. Grassl. Sci.*, 23, 252-255.
- VAN DER MEER J.M. (1983) : *European in vitro ring test 1983. Statistical report*, report 155 of the Institute for Livestock Feeding and Nutrition Research, Lelystad, The Netherlands, 36 pp.
- VANDERHAEGHE S. et BISTON R. (1987) : "Estimation in vitro de la digestibilité des herbages. Adaptation de la méthode pepsine-cellulose au système Fibertec Enzymatique", *Bull. Tech. Agron. Gembloux*, 22, 209-219.
- VÉRITÉ R. et DEMARQUILLY C. (1978) : "Qualités des matières azotées des aliments pour ruminants", *La vache laitière*, Ed. INRA. Publ., Route de Saint-Cyr, 78000 Versailles, p. 143-147.
- WALDO D.R. et GOERING H. K. (1979) : "Insolubility of proteins in ruminant feeds by four methods", *J. Anim. Sci.*, 49, 1560-1568.
- WAINMAN F.W., DEWEY P.J.S. et BOYNE A.W. (1981) : *Compound feeding stuffs for ruminants. Feedingstuffs Evaluation Unit*, third report, Rowett Research Institute, Aberdeen, U.K., pp 49.
- WOHLT J.E., SNIFFEN C.J. et HOOVER W.H. (1973) : "Measurements of protein solubility in common feedstuffs", *J. Dairy Sci.*, 56, 1052-1057.

RÉSUMÉ

Les méthodes enzymatiques de prévision de la valeur alimentaire des aliments peuvent trouver des applications très importantes pour les laboratoires qui désirent prévoir la valeur nutritive des fourrages. De nombreuses méthodes enzymatiques de prévision de la valeur énergétique ont été développées pour les fourrages ; en revanche, il en existe très peu pour la prévision de la valeur azotée.

En général plus précises que les méthodes chimiques, ces méthodes nécessitent de respecter certaines conditions pour une bonne utilisation. Il est nécessaire :

- de suivre rigoureusement le protocole,
- d'introduire des témoins dans chaque série d'analyse,
- de mesurer l'activité de l'enzyme à chaque nouveau lot puisque la dégradation de l'aliment est fonction du rapport enzyme/substrat et peut être différente suivant l'aliment.

Le conditionnement de l'échantillon (séchage et broyage) est également très important à prendre en compte.

SUMMARY

New methods for the evaluation of the feeding value of forages. II. Enzymatic methods

There are considerable applications for enzymatic methods in routine laboratory analysis to predict the nutritive value of feeds. In contrast with many enzymatic methods proposed for predicting the energy value of forages, there are few enzymatic methods for predicting the protein value in the laboratory.

They are rapid, reproducible, economical and require no animals ; they are often more precise than the chemical methods but may require conditions that must be taken into account for a satisfactory laboratory use. It is important to :

- follow exactly the rules of procedure ;
- use controls with each series analysed ;
- measure the activity of each batch of enzyme because degradation of feeds varies according to the ratio of enzyme to substrate.

Standard preparations of the feeds (particle size, mode and temperature of drying) must also be respected.