

# Prédiction de la digestibilité iléale azotée par méthodes *in vitro*

A. LLORENTE<sup>1</sup>, A.I. GARCÍA<sup>2</sup>, M.J. VILLAMIDE<sup>1</sup>, S. CHAMORRO<sup>1</sup>, R. CARABAÑO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Politécnica de Madrid. E.T.S. Ingenieros Agrónomos.  
Dpto Producción Animal, 28040. Madrid, Espagne

<sup>2</sup> NUTRECO. Poultry and Rabbit Research Center. Casarrubios del Monte. Toledo. Espagne

**Résumé.** Une méthode enzymatique *in vitro* a été développée pour prédire la digestibilité de la protéine brute (PB) et des acides aminés de 11 matières premières déjà évaluées *in vivo* (protéagineux, céréales et leurs sous produits et luzerne) pour des aliments lapins. La PB et les acides aminés ont été analysés dans les aliments, les matières premières et les résidus. La digestibilité *in vitro* de la protéine brute était supérieure aux valeurs *in vivo* correspondantes (22.5, 11.9 et 5.8 points, en moyenne, pour les digestibilités iléale et fécale apparentes et iléale vraie, respectivement). La différence maximale fut observée pour les matières premières fibreuses et la différence minimale pour les tourteaux d'oléagineux. Le critère prédit avec le plus de précision était la digestibilité iléale vraie pour la PB et les acides aminés limitant (coefficient de variation de 3 à 5.2 %). La digestibilité de la lysine a été prédite avec la même précision que la PB, celle pour la méthionine était plus élevée et plus basse pour la thréonine. Néanmoins, les coefficients de détermination des équations des acides aminés étaient plus faibles. Une précision identique est obtenue quand les digestibilités des acides aminés sont prédites à partir des valeurs *in vitro* de digestibilité de la PB. Ainsi, la méthode *in vitro* de la digestibilité de la protéine semble appropriée pour la prédiction des valeurs *in vivo* de la digestibilité iléale vraie de la protéine et des acides aminés.

**Summary : Prediction of ileal digestibility of nitrogen by *in vitro* method.** An enzymatic *in vitro* method was developed for predicting the crude protein (CP) and amino acids digestibility of 11 *in vivo* evaluated feedstuffs (proteaginous, cereals and their by-products and alfalfa) destined to rabbit diets. Both CP and amino acids were analysed in the feeds, feedstuffs and residues. The *in vitro* digestibility of crude protein was higher than the corresponding *in vivo* values (22.5, 11.9 and 5.8 points as average for apparent ileal, faecal and true ileal digestibility, respectively). The maximum difference was observed for fibrous feedstuffs and the minimum difference for oleaginous meals. The parameter most precisely predicted was the true ileal digestibility both for CP and limiting amino acids (coefficient of variation from 3 to 5.2 %). Lysine digestibility was predicted with a similar accuracy than CP, methionine with higher and threonine with a lower accuracy than protein, however, the coefficients of determination of the amino acids equations were lower. When the amino acids digestibility was predicted from the *in vitro* CP digestibility similar precision was obtained. Therefore, the *in vitro* approach of protein digestibility seems to be appropriated for prediction of *in vivo* protein and amino acids true ileal digestibility.

## Introduction

L'iléum est le dernier segment de l'intestin où les acides aminés peuvent être absorbés. Par conséquent, la digestibilité iléale de la protéine et des acides aminés est une meilleure caractérisation des valeurs nutritionnelles des matières premières afin de mieux répondre aux besoins de croissance des lapins et pour contrôler la disponibilité de ces nutriments pour la prolifération microbienne. En pratique, l'utilisation de ce critère devrait mener à une réduction du niveau de protéines dans les aliments, limitant ainsi les rejets azotés et la mortalité en engraissement (Maertens *et al.*, 1997, Gutiérrez *et al.*, 2003, Chamorro *et al.*, 2007). Différents essais ont été menés pour évaluer plusieurs critères afin de caractériser la valeur nutritionnelle de matières premières classiquement utilisées dans les aliments lapins (Garcia *et al.*, 2004 et 2005). Ces travaux ont démontré que les digestibilités apparentes fécale et iléale amenaient à une sous estimation de la digestibilité iléale vraie. Ainsi, d'autres essais ont été conduits dans le but de déterminer la digestibilité au niveau fécal et iléal (Llorente *et al.*, 2005, 2006 et 2007). Ces méthodes de

travail *in vivo* étant néanmoins très chères et chronophages, il est apparu le besoin d'utiliser des méthodes plus simples, rapides et moins coûteuses, pour une détermination en routine de la digestibilité de la protéine et des acides aminés dans les matières premières.

Une méthode enzymatique *in vitro* a été développée sur les lapins, avec de bons résultats pour la prédiction de la digestibilité fécale de la matière sèche (Ramos *et al.*, 1992, Ramos and Carabaño, 1996). Cependant, cette méthode a conduit à une mauvaise estimation de la digestibilité fécale apparente de la protéine. Les pertes azotées endogènes au niveau iléal et fécal ont une grande influence sur la digestibilité *in vivo*, alors que la digestibilité *in vitro* reflète la digestibilité "réelle" de la protéine et des acides aminés. Ainsi, les digestibilités *in vitro* pourraient mieux estimer les digestibilités *in vivo*, si on les corrige pour ces pertes endogènes.

L'objectif de ce travail est de prédire la digestibilité iléale et fécale *in vivo* de l'azote et des acides aminés de onze matières premières en utilisant une méthode *in vitro*.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Aliments

Onze matières premières (tourteau de soja 47, graine de soja toastée, tourteaux de tournesol 28 et 38, pois, blé, son de blé, maïs, gluten de maïs, luzerne déshydratée 16, et cosses de soja) auparavant évaluées *in vivo* (Llorente *et al.*, 2005, 2006 et 2007) ont été utilisées pour tester la méthode *in vitro*. Ces matières premières ont été sélectionnées et introduites dans les aliments comme unique fournisseur de protéines et d'acides aminés. Leur composition chimique et les digestibilités (fécale et iléale apparentes et iléale vraie) *in vivo* de la protéine et des trois acides aminés les plus limitants sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Composition chimique et valeurs de digestibilité des 11 matières premières évaluées par Llorente *et al.* (2005, 2006 et 2007)

|                                      | Moyenne | std  | max  | min  |
|--------------------------------------|---------|------|------|------|
| <i>Composition chimique (% MS)</i>   |         |      |      |      |
| Protéine brute (PB)                  | 27,3    | 13,9 | 54,0 | 11,9 |
| Lysine                               | 1,39    | 0,86 | 3,2  | 0,42 |
| Méthionine                           | 0,37    | 0,21 | 0,80 | 0,18 |
| Thréonine                            | 1,01    | 0,55 | 2,02 | 0,39 |
| <i>Digestibilité in vivo PB (%)</i>  |         |      |      |      |
| Iléale vraie                         | 81,7    | 14   | 97,6 | 68,1 |
| Iléale apparente                     | 65,0    | 19,1 | 93,6 | 43,7 |
| Fécale apparente                     | 75,6    | 11,9 | 95,2 | 59,9 |
| <i>Digestibilité in vivo Lys (%)</i> |         |      |      |      |
| Iléale vraie                         | 91,3    | 8,4  | 97,6 | 68,1 |
| Iléale apparente                     | 78,6    | 12,1 | 92,5 | 56,9 |
| Fécale apparente                     | 80,4    | 10,8 | 95,5 | 58,2 |
| <i>Digestibilité in vivo Met (%)</i> |         |      |      |      |
| Iléale vraie                         | 88,5    | 10,6 | 94,8 | 58,8 |
| Iléale apparente                     | 81,6    | 12,2 | 91,2 | 48,3 |
| Fécale apparente                     | 86,1    | 7,73 | 97,8 | 74,5 |
| <i>Digestibilité in vivo Thr (%)</i> |         |      |      |      |
| Iléale vraie                         | 76,1    | 16,0 | 91,3 | 38,3 |
| Iléale apparente                     | 51,7    | 25,1 | 81,4 | 8,65 |
| Fécale apparente                     | 65,8    | 17,4 | 90,8 | 35,3 |

### 1.2. In vitro et analyses chimiques

La technique *in vitro* utilise 3 enzymes appliquées en 3 étapes consécutives sur 1 g de chaque aliment : pepsine/CIH, pancréatine et Viscozyme) correspondant aux principaux sites de digestion des protéines. Dans la troisième étape, nous utilisons un complexe multienzymatique contenant plusieurs carbohydrases (cellulases, hemicellulases, xylanases, pectinases et glucanases). Ce mélange ne contient aucune protéase et a été utilisé pour améliorer la filtration. La procédure est décrite par Ramos *et al.* (1992). Les analyses de protéine brute (méthode Dumas par combustion) et acides aminés (hydrolyse acide pour la lysine et la thréonine, hydrolyse acide + performique pour la méthionine) ont été réalisées sur les matières premières et les résidus correspondants de la méthode *in vitro*.

### 1.3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus *in vitro* ont été mis en relation avec les données correspondantes obtenues *in vivo* par régression linéale avec la procédure REG du programme SAS.

## 2. Résultats et discussion

Les résultats obtenus pour la digestibilité *in vitro* sont présentés dans le tableau 2. La digestibilité *in vitro* de la protéine brute a été supérieure aux valeurs *in vivo* correspondantes (22,5, 11,9 et 5,8 points en moyenne pour respectivement la digestibilité iléale et fécale apparentes et la digestibilité iléale vraie). La différence maximale (de 14,23 à 55,6) a été observée pour les cosses de soja tandis que les tourteaux d'oléagineux (de 1,4 à 10,7 points) ont obtenus les plus petits écarts.

**Tableau 2.** Digestibilité *in vitro* de la protéine brute et des acides aminés pour les 11 matières premières évaluées.

|                                   | moyenne | std | max  | min  |
|-----------------------------------|---------|-----|------|------|
| <i>Composition chimique (%MS)</i> |         |     |      |      |
| PB                                | 87,5    | 6,2 | 94,5 | 80,3 |
| Lysine                            | 90,4    | 4,6 | 95,7 | 86,3 |
| Méthionine                        | 90,6    | 4,7 | 95,6 | 83,2 |
| Thréonine                         | 87,8    | 5,5 | 94,7 | 78,1 |

Ces résultats confirment ceux obtenus par Ramos *et al.* (1992) qui a observé des différences de 12,2 points entre les digestibilités fécales apparentes *in vitro* et *in vivo* mesurées sur des aliments complets. Les différences observées sont partiellement expliquées par les pertes endogènes importantes de protéines au niveau iléal et fécal dans les essais *in vivo* (García *et al.*, 2004, Llorente *et al.*, 2005). La digestibilité *in vivo* iléale vraie, corrigée par les pertes endogènes, présente les plus petits écarts avec les valeurs *in vitro*. Les cosses de soja ont été écartées pour les différences *in vivo* – *in vitro* mentionnées auparavant. Celles-ci ont diminué de 3 points, ce qui montre les plus hautes valeurs des matières premières fibreuses (8, 5,8 et 5,8 points pour la luzerne, son de blé et gluten de blé, respectivement). Le niveau de fibre est l'un des facteurs augmentant les pertes endogènes au niveau iléal chez le porc (Boisen *et al.*, 1996). Pour les acides aminés les plus limitants, les différences entre les valeurs *in vivo* et *in vitro* suivent la même tendance. Cependant, elles sont moindres pour la lysine et la méthionine, supérieures pour la thréonine par rapport à celles observées pour la protéine. Ces résultats sont cohérents avec les niveaux élevés de thréonine des pertes endogènes iléales.

Les équations de prédictions des digestibilités *in vivo* de la protéine et des principaux acides aminés limitant des matières premières étudiées ont été déterminées à partir des valeurs *in vitro* (tableau 3). La digestibilité iléale vraie a été la valeur prédite la plus précisément que ce soit pour la PB ou pour les acides aminés (de 3 à 5,2 % de coefficient de variation (CV)), à cause de

**Tableau 3.** Equations de prédiction des digestibilités *in vivo* iléale vraie (DIV), iléale apparente (DIA) et fécale apparente (DFA) de la protéine et des principaux acides aminés limitants, à partir des digestibilités *in vitro* de la protéine brute (PB) et des acides aminés (n=10).

| y                     | x                      | a <sup>3</sup> | b <sup>4</sup> | R <sup>2</sup> | Rsd  | CV (%) | P       |
|-----------------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|------|--------|---------|
| <i>Protéine brute</i> |                        |                |                |                |      |        |         |
| DIV (%)               | PBin <sup>1</sup> (%)  | -15            | 1,13           | 0,85           | 2,6  | 3,03   | 0,00001 |
| DIA (%)               | PBin <sup>1</sup> (%)  | -123           | 2,17           | 0,77           | 6,5  | 9,4    | 0,0008  |
| DFA (%)               | PBin <sup>1</sup> (%)  | -90            | 1,88           | 0,72           | 6,5  | 8,5    | 0,002   |
| <i>Lysine</i>         |                        |                |                |                |      |        |         |
| DIV (%)               | Lysin <sup>2</sup> (%) | 29             | 0,70           | 0,40           | 3,2  | 3,4    | 0,04    |
| DIA (%)               | Lysin <sup>2</sup> (%) | -111           | 2,1            | 0,52           | 7,4  | 9,2    | 0,02    |
| DFA (%)               | Lysin <sup>2</sup> (%) | -153           | 2,6            | 0,64           | 7,1  | 8,7    | 0,005   |
| <i>Méthionine</i>     |                        |                |                |                |      |        |         |
| DIV (%)               | Metin <sup>2</sup> (%) | 42             | 0,54           | 0,50           | 2,7  | 3,0    | 0,02    |
| DIA (%)               | Metin <sup>2</sup> (%) | -5,1           | 0,99           | 0,71           | 3,16 | 3,7    | 0,002   |
| DFA (%)               | Metin <sup>2</sup> (%) | -35            | 1,33           | 0,81           | 3,3  | 3,8    | 0,0004  |
| <i>Thréonine</i>      |                        |                |                |                |      |        |         |
| DIV (%)               | Thrin <sup>2</sup> (%) | -62            | 1,62           | 0,84           | 4,2  | 5,2    | 0,0002  |
| DIA (%)               | Thrin <sup>2</sup> (%) | -233           | 3,3            | 0,74           | 11,9 | 21,1   | 0,001   |
| DFA (%)               | Thrin <sup>2</sup> (%) | -173           | 2,7            | 0,71           | 10,5 | 15,9   | 0,002   |

<sup>1</sup> BPin<sup>1</sup>: Digestibilité *in vitro* de la PB, <sup>2</sup> Lysin<sup>2</sup>, Metin<sup>2</sup>, Thrin<sup>2</sup>: digestibilités *in vitro* de lys, met et thr, respectivement, <sup>3</sup> a: interception, <sup>4</sup> b : pente

la correction des pertes endogènes, il y a donc moins d'écart entre les valeurs *in vivo* et *in vitro*, comme indiqué plus haut. A l'opposé, la précision la plus faible correspond à l'estimation de la digestibilité iléale apparente (CV de 3,9 à 21,1%) dû à la part importante de protéine endogène au niveau iléal (de 40 à 60 % du flux iléal de protéine Llorente, *et al.*, 2005, 2006, 2007).

Les valeurs des digestibilités *in vitro* de la PB estiment les valeurs *in vivo* avec un CV inférieur à 10% pour tous les critères. La digestibilité *in vivo* de la lysine a été prédite avec la même précision que pour la PB, tandis qu'elle était plus importante pour la méthionine et plus faible pour la thréonine (CV de

7,1, 3,5 et 14,1%, respectivement). Cependant, les coefficients de détermination des équations de prédiction pour les acides aminés sont plus faibles que ceux pour la protéine en raison de la digestibilité plus variable des acides aminés par rapport à la PB. Etant donné que l'analyse chimique des acides aminés est coûteuse, nous avons souhaité déterminer des équations de prédiction de la digestibilité des acides aminés à partir des valeurs *in vitro* de la digestibilité de la PB (tableau 4). Pour ces acides aminés dont la corrélation entre valeurs *in vitro* et *in vivo* était faible (lysine), la corrélation et la précision augmentent quand la digestibilité est déterminée à partir des valeurs *in vitro* de la digestibilité de la PB, excepté pour la thréonine.

**Tableau 4.** Equations de prédiction de la digestibilité iléale vraie *in vivo*, et des digestibilités iléale et fécale apparentes *in vivo* des principaux acides aminés limitants, à partir des digestibilités *in vitro* de la protéine brute (PB) (n=10)

| y                 | x                     | a <sup>3</sup> | b <sup>4</sup> | R <sup>2</sup> | Rsd  | CV (%) | P      |
|-------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|------|--------|--------|
| <i>Lysine</i>     |                       |                |                |                |      |        |        |
| DIV (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | 45             | 0,55           | 0,55           | 2,7  | 2,9    | 0,01   |
| DIA (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | -57            | 1,56           | 0,63           | 6,5  | 8,0    | 0,005  |
| DFA (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | -76            | 1,77           | 0,68           | 6,6  | 8,2    | 0,003  |
| <i>Méthionine</i> |                       |                |                |                |      |        |        |
| DIV (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | 45             | 0,51           | 0,54           | 2,6  | 2,9    | 0,02   |
| DIA (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | 8,6            | 0,86           | 0,66           | 3,4  | 4,0    | 0,004  |
| DFA (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | -18,4          | 1,19           | 0,77           | 3,6  | 4,1    | 0,0008 |
| <i>Thréonine</i>  |                       |                |                |                |      |        |        |
| DIV (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | -74            | 1,75           | 0,82           | 4,5  | 5,7    | 0,0003 |
| DIA (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | -230           | 3,2            | 0,60           | 14,6 | 26,1   | 0,009  |
| DFA (%)           | PBin <sup>1</sup> (%) | -163           | 2,6            | 0,54           | 13,2 | 20     | 0,02   |

<sup>1</sup> PBin<sup>1</sup>: digestibilité *in vitro* de la PB, <sup>3</sup> a: interception, <sup>4</sup> b : pente

### Conclusion

La méthode de la digestibilité *in vitro* de la protéine semble être appropriée pour la prédiction de la digestibilité iléale vraie de la protéine et des acides aminés. Ceci pourrait trouver des applications utiles en formulation d'aliment.

### Remerciements

à Etienne Corrent par son aide dans la traduction de ce travail. Ce travail a eu le soutien d'un projet PETRI 95-0689-OP.

### Références

- BOISEN, S., MOUGHAN, P.J., 1996. Dietary influences on endogenous ileal protein and amino acid loss in the pig. A review. *Acta Agric. Scand. Sect. A. Animal Sci.* 46:154-164
- CHAMORRO S., GOMEZ CONDE M.S., PEREZ DE ROZAS A.M., BADIOLA I., CARABAÑO R., DE BLAS J.C., 2007. Effect on digestion and performance of dietary protein content and of increased substitution of lucerne hay with soya-bean protein concentrate in starter diets for young rabbits. *Animal* 1, 651-659.
- GARCIA, A. I., DE BLAS, J. C. DE AND CARABAÑO, R. 2004. Effect of type of diet (casein-based or protein-free diet, and caecotrophy on ileal endogenous nitrogen and amino acid flow in rabbits. *Animal Science* 79:231-240.
- GARCÍA, A.I., DE BLAS, J.C. AND CARABAÑO, R. 2005. Comparison of different methods for nitrogen and amino acid evaluation in rabbit diets. *Animal Science*, 80: 169-178.
- GUTIERREZ, I., ESPINOSA A., GARCIA, J., CARABAÑO, R., DE BLAS, C. 2003. Effect of source of protein on digestion and growth performance of early-weaned rabbits. *Anim. Research* 52: 461- 472.
- LLORENTE, A., GARCÍA, A.I., NICODEMUS N., VILLAMIDE M.J., CARABAÑO R. 2005. Utilización de una nueva metodología para la determinación de la digestibilidad ileal aparente y real en la valoración nitrogenada de la harina de girasol en conejos. XI Jornadas sobre Producción Animal ITEA, Zaragoza, 26: 497-499.
- LLORENTE, A., GARCÍA, A.I., NICODEMUS N., VILLAMIDE M.J. Y CARABAÑO R. 2006. Digestibilidad ileal aparente y verdadera de aminoácidos de harinas de girasol, productos de soja y guisante en conejos. XXXI Symposium de Cunicultura de Asescu, Lorca, pp 117-124
- LLORENTE, A., VILLAMIDE M.J, GARCÍA, A.I., CARABAÑO R. 2007. Digestibilidad de la proteína de los aminoácidos de cereales y sus subproductos en conejos. XXXII Symposium de Cunicultura de Asescu, Vila-Real pp 87-90
- MAERTENS, L. LUZZI, F., DE GROOTE, G. 1997. Effect of dietary protein and amino acids on the performance, carcass composition and N-excretion of growing rabbits. *Ann. Zootech.* 46:255-268.
- RAMOS, M.A., CARABAÑO, R., BOISEN, S. 1992. An *in vitro* method for estimating digestibility in rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.* 15: 938-946
- RAMOS, M., CARABAÑO, R. 1996. Nutritive evaluation of rabbit diets by an *in vitro* method. Proc. 6th World Rabbit Congress. Toulouse, France. Vol. 1. pp: 277-282.