



HAL
open science

Détermination des parois végétales et cartes de contrôle

Loïs Regalade

► **To cite this version:**

| Loïs Regalade. Détermination des parois végétales et cartes de contrôle. Chimie. 2013. hal-02961754

HAL Id: hal-02961754

<https://hal.inrae.fr/hal-02961754>

Submitted on 8 Oct 2020

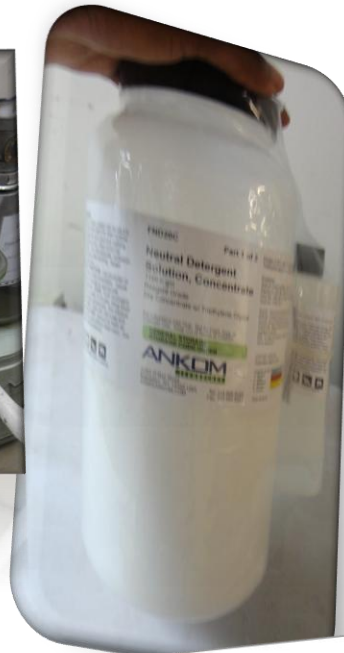
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

RAPPORT DE STAGE



Année 2012-2013



BTS Chimiste



Lycée CHARLES COEFFIN

TRIONCELLE 97122 BAIE-MAHAULT

Unité de Recherche
Zootechnique

Centre Antilles Guyane

Domaine Duclos- Prise d'Eau-
97170 PETIT-BOURG



De REGALADE Loïs,

Sous la direction de
Madame CHEVRY MARIE-
MAGDELEINE Carine,
responsable de laboratoire.



Tables des matières

| | |
|---------------------------------------------------------|----|
| Tables des matières | 1 |
| Table des illustrations..... | 3 |
| I .Remerciements..... | 4 |
| II. Introduction générale..... | 6 |
| II.1. L’Institut National de Recherche Agronomique..... | 6 |
| II.1.1Le centre Antilles-Guyane..... | 6 |
| II.1.1.a) Missions et objectifs | 7 |
| II.2. Unité de Recherche Zootechnique..... | 7 |
| II.2.1. Le laboratoire d’analyses..... | 8 |
| IV. Mon stage..... | 9 |
| IV.1. Présentation de la mission..... | 9 |
| IV.2. Matériels et méthodes | 10 |
| IV.2.1.Composition chimique des aliments analysés..... | 10 |
| IV.2.2. Matière minérale | 11 |
| IV.2.2.a) Méthode analytique..... | 11 |
| IV.2.2.b) Matériel utilisé | 13 |
| IV.2.3.Parois végétales..... | 14 |
| IV.2.3.a) Cellulose..... | 15 |
| IV.2.3.b) Hémicellulose | 16 |
| IV.2.3.c) Lignine | 16 |
| IV.2.3.d) Méthode analytique..... | 17 |
| i). NeutralDetergentFiber | 18 |
| ii) AcidDetergentFiber | 19 |
| iii) AcidDetergentLignin | 19 |
| IV.2.3.e) Matériel utilisé : Fonctionnement | 21 |
| IV.3.Calculs, vérifications de données..... | 23 |
| IV.3.1.Détermination de la matière minérale | 23 |
| IV.3.1.a) Cartes de contrôle..... | 24 |
| IV.3.2.Détermination des parois végétales..... | 26 |



| | |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| IV.3.2.a) Vérification des données | 26 |
| IV.3.2.b) Carte de contrôle..... | 26 |
| V. Résultats et exploitation | 27 |
| V.1.Résultats en matière minérale..... | 27 |
| V.1.a) Validation de données | 27 |
| V.1.b)carte de contrôle | 28 |
| V.1.c) Discussion des résultats en matière minérale | 30 |
| V.2.Résultats en parois végétales..... | 31 |
| V.2.a) Validation de données | 31 |
| V.2.b) cartes de contrôle | 32 |
| V.2.c) Discussion sur la méthode..... | 38 |
| V.Conclusion..... | Erreur ! Signet non défini. |
| VI. Annexes | 40 |
| VI.1. Lexique | 40 |
| IV.2. Modes opératoires..... | 41 |
| IV.2.1. Mode opératoire pour la détermination des fibres..... | 41 |
| VII.Bibliographie et sitographie..... | 62 |



TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURE 1: FAÇADE EXTERIEURE DU LABORATOIRE | 8 |
| FIGURE 2: SCHEMA RECAPITULATIF DE LA COMPOSITION DES ALIMENTS VEGETAUX | 11 |
| FIGURE 3: RECAPITULATIF DU PROCESSUS DE DETERMINATION DE LA MATIERE MINERALE | 12 |
| FIGURE 4: TABLEAU RECAPITULATIF DU MATERIEL UTILISE POUR LA DETERMINATION DE LA MATIERE MINERALE | 14 |
| FIGURE 5: STRUCTURE ET COMPOSITION D'UNE PAROI VEGETALE..... | 14 |
| FIGURE 6: LIAISON B 1,4 GLUCOSIDIQUE, CELLOBIOSE ET CELLULOSE..... | 15 |
| FIGURE 7: XYLOSE ET MANNOSE ENTRANT DANS LA COMPOSITION DES HEMICELLULOSES | 16 |
| FIGURE 8: MODELE DE LA STRUCTURE DE LA LIGNINE..... | 17 |
| FIGURE 9: COMPOSITION TYPIQUE DE LA CELLULE..... | 17 |
| FIGURE 10: STRUCTURE DU SDS | 18 |
| FIGURE 11: HYDROLYSE POUR LA DETERMINATION DE LA LIGNINE | 19 |
| FIGURE 12: SCHEMA DES COMPOSES DOSES DANS LA METHODE DE VAN SOEST | 20 |
| FIGURE 13: ANKOM 2000 FIBER ANALYSER ANKOM 200 MANUELS | 21 |
| FIGURE 14: SACS EN TEFLONS ET PORTOIR..... | 21 |



I. Remerciements

Avant de procéder à la présentation de ce rapport, je tiens à remercier MARIE-MAGDELEINE Carine d'avoir bien voulu m'accueillir dans le laboratoire de l'URZ dont elle est la responsable, merci pour ta patience, ton écoute et ta disponibilité.

Merci à SILOU Tatiana qui a accepté de m'encadrer durant ces semaines de stage. Je lui suis reconnaissante pour toutes les techniques qu'elle m'a enseignées, pour sa patience et sa gentillesse.

Je remercie PHILIBERT Lucien pour sa sympathie et sa disponibilité

Enfin, merci à toute l'équipe du laboratoire d'analyses de l'URZ :

FELICITE Yoann pour ta volonté à aider,

BARDE Jesse, merci pour ta bonne humeur,

CALIF Suzitte, qui m'a appris à faire des longues séries de pesées un moment de joie,

GREDOIRE Marine, merci de m'avoir enseigné le « travail en condition de stress »,

Et aussi merci aux autres stagiaires :

GLANDIER Mélanie merci pour l'aide les deux premières semaines avant que je n'ai mon permis (je n'oublie pas les chouquettes de ton papa...)

Merci CALABRE Romuald, BOLIVAR Allan...

Je suis reconnaissante de l'aide informatique que GOURDINE Jean-Luc a bien voulu m'apporter.

Je tiens également à remercier Madame OLIVE, mon professeur référent, pour ses conseils.



Je terminerais en remerciant mon oncle BOISNE Christian, et sa famille pour l'hébergement qu'ils m'ont offert.

Merci Maman, pour tes encouragements, les courses et surtout l'essence !!!!!
Papa, merci de te faire autant de soucis pour ta fille et de toujours t'assurer qu'elle rentre bien.

Merci à ma petite sœur Kyky qui a toujours su m'accueillir à sa manière le week-end !

Enfin, Merci Serge, merci Toto.... Et merci Seigneur.



II. Introduction générale

Dans le cadre de la formation au Brevet de Technicien Supérieur Chimiste, les étudiants de Première Année sont appelés à effectuer un stage en entreprise afin de mettre en pratique les connaissances acquises en enseignement théorique. Ils acquièrent également des compétences techniques qui leur permettent d'avoir une connaissance du métier de technicien supérieur. Ce stage se déroule durant sept semaines où les étudiants sont accueillis en laboratoire ou sur un terrain industriel (distillerie, cimenterie...) par des techniciens, ingénieurs et chercheurs qui leur enseignent les façons de travailler en industrie.

Le Centre Antilles-Guyane de l'Institut National de la Recherche Agronomique fait donc partie des entreprises d'accueil. Organisme de recherche finalisée, il axe ses investigations sur l'agriculture, le développement durable, l'environnement et l'alimentation. Seul site en zone tropicale, le centre INRA Antilles-Guyane travaille en collaboration avec les laboratoires de la métropole et ses partenaires. Le stagiaire travaille au laboratoire où il doit, durant la durée de sa formation professionnelle, répondre à un sujet en rapport avec les protocoles de recherche en cours en utilisant des modes opératoires adaptés.

II.1. L'Institut National de Recherche Agronomique

Organisme public français, l'Institut National de la Recherche Agronomique est réparti en dix-neuf centres. Fondé en 1946, l'Institut cherche à répondre essentiellement aux problématiques de l'alimentation, de l'agriculture et de l'environnement, et ce, afin d'améliorer l'utilisation des ressources nécessaires à nourrir la France, en tenant compte des enjeux mondiaux à l'échelle économique, territoriale et écologique.¹

II.1.1 Le centre Antilles-Guyane

Le centre Antilles-Guyane fait donc partie des dix-neuf centres de recherche. Créé en 1949, il est installé sur deux territoires (Guadeloupe et Guyane) et est divisé en quatre unités de recherche sur deux domaines expérimentaux :



- L'Unité de Recherche Agrosystèmes tropicaux (URASTRO)
- L'Unité Mixte de Recherche Qualité des Fruits et Légumes Tropicaux (UMR QUALITROP)
- L'Unité Mixte de Recherche Ecologiques des Forêts de Guyane (ECOFOG)
- L'Unité de Recherche Zootechnique (URZ)

Le site de Guadeloupe se situe au Domaine de Duclos, sur 12 hectares dans un cadre naturel (cf. Figure 1).²

II.1.1.a) Missions et objectifs

Installé en zone tropicale, le centre INRA Antilles-Guyane cherche à valoriser les ressources naturelles des Antilles tout en promouvant une agriculture durable et économique. Il lui faut donc élaborer des techniques innovantes, des nouvelles technologies adaptées à l'environnement tropical, qui accompagneront l'évolution des exploitations agricoles. Des programmes de recherches sont donc mis en place, concernant le fonctionnement des écosystèmes et agrosystèmes terrestres ainsi que les systèmes de culture et d'élevage prohibant l'utilisation de pesticides et d'engrais. Ces programmes sont en adéquation avec la valorisation de la biodiversité tropicale. Ces missions sont donc réparties dans les différentes unités qui composent le centre INRA Antilles-Guyane.

II.2. Unité de Recherche Zootechnique

L'URZ est composée d'une Unité de recherche et d'une Unité Expérimentale et a pour mission principale de mener des études sur les contraintes rencontrées dans les zones tropicales en production animale (bovins, caprins, ovins, porcins).

Les programmes de recherches sont tout d'abord centrés sur la façon d'adapter les animaux aux contraintes des systèmes d'élevage tropicaux (chaleur, croissance, strongles gastro-intestinaux ...). La valeur nutritionnelle des ressources végétales est également étudiée, en prenant en compte le contexte environnemental³. L'Unité de Recherche Zootechnique joue donc un rôle important dans l'objectif de travail de l'INRA et offre des stratégies de production porcine, bovine caprine et ovine en zone tropicale.



II.2.1. Le laboratoire d'analyses

Le laboratoire d'analyses de l'URZ est sous la direction de Madame MARIE-MAGDELEINE Carine. Pour répondre aux questions des programmes de recherches, des analyses physico-chimiques et biologiques sont réalisées. Les manipulations se font sur des aliments du bétail, des contenus digestifs, des excréments mais également sur des prélèvements sanguins. Diverses techniques analytiques sont utilisées telles que l'HPLC, la gravimétrie, la titrimétrie, la distillation, la spectrométrie, la microscopie, la biochimie ... Les dosages physico-chimiques effectués sur les produits analysés (aliments, fourrages, fèces, contenus digestifs, ...) servent entre autres à déterminer les taux en matière organiques et azotées totales, en amidon, acide gras, glucose, ou encore en parois cellulaires. Le laboratoire de l'URZ est donc une plateforme technique qui sert au développement régional et à la recherche agronomique.



Figure 1: Façade extérieure du laboratoire



IV. Mon stage

Dans le cadre du stage au programme de la première année du BTS Chimiste, j'ai été accueillie au Laboratoire d'Analyses de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'Institut National de la Recherche Agronomique. Sous la direction de Madame MARIE-MAGDELEINE Carine, responsable de laboratoire, Madame SILOU Tatiana m'a accompagné durant la période allant du 20 Mai au 6 Juillet 2013 quant à l'exploitation de mon sujet : *Détermination de la composition en parois végétales et en matière minérale des aliments, et réalisation de cartes de contrôle.*

IV.1. Présentation de la mission

Dans l'alimentation humaine, on retrouve une grande portion de viande. Ce sont majoritairement des petits ruminants, des bovins et des porcins. L'INRA, consciente de leur utilisation dans l'alimentation, travaille pour optimiser les aliments de ces animaux d'élevage en utilisant nos ressources tropicales. Ainsi, pour répondre aux besoins nutritionnels des animaux, et par la même occasion aux besoins de la société, le laboratoire tente de déterminer la composition de ces aliments. Pour cela, il est donc nécessaire d'effectuer plusieurs analyses sur les différents aliments proposés aux animaux, afin de déterminer les critères permettant de prévoir leurs valeurs nutritives et de composer des rations équilibrées répondant à leurs besoins.

C'est dans ce cadre que j'ai analysé divers aliments afin de déterminer leur quantité en matière minérale et en parois cellulaires. Durant la période où j'ai été présente à l'URZ, nous avons dû nous affaier à la réalisation des analyses pour plusieurs protocoles, notamment le protocole CMM 1301. Il concernait la caractérisation chimique de ressources végétales pour la fabrication d'*aliments* pour les petits ruminants. Ainsi, le protocole CMM 1301 nécessitait des dosages en matière minérale et parois végétales pour des feuilles de K manioc, de manioc amère, de leuceana et de pois d'angole. Ces feuilles avaient été soumises à trois types de séchages : la lyophilisation, le séchage au soleil et le séchage à l'étuve.



Nous étudierons les méthodes analytiques, leur fonctionnement et contraintes. Une attention sera portée sur la vérification de données et les cartes de contrôle de témoins d'analyses. Par la suite je présenterai et discuterai les résultats trouvés durant ce mois de stage.

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.1. Composition chimique des aliments analysés.

Un aliment est essentiellement constitué d'eau et de matière sèche (cf Figure 2). Comme son nom l'indique, la matière sèche correspond à tout ce qui reste dans « l'aliment » quand on l'a dépouillé de toute l'eau qu'il possédait. Cette matière sèche est elle-même composée de matières minérales et de matières organiques.

Dans la matière organique, on retrouve trois principales catégories de substances : les glucides, les protéines et les lipides. La matière minérale correspond aux autres éléments chimiques trouvés dans les aliments (calcium Ca, phosphore P, sodium Na, fer Fe, potassium K...).

Les aliments analysés durant le stage sont d'origine végétale. Les constituants de ces végétaux se présentent sous deux structures : les constituants intracellulaires, c'est-à-dire les composés qui se trouvent à l'intérieur de la cellule végétale, et les constituants pariétaux ou parois cellulaires, plus connus sous le nom de « fibres ».

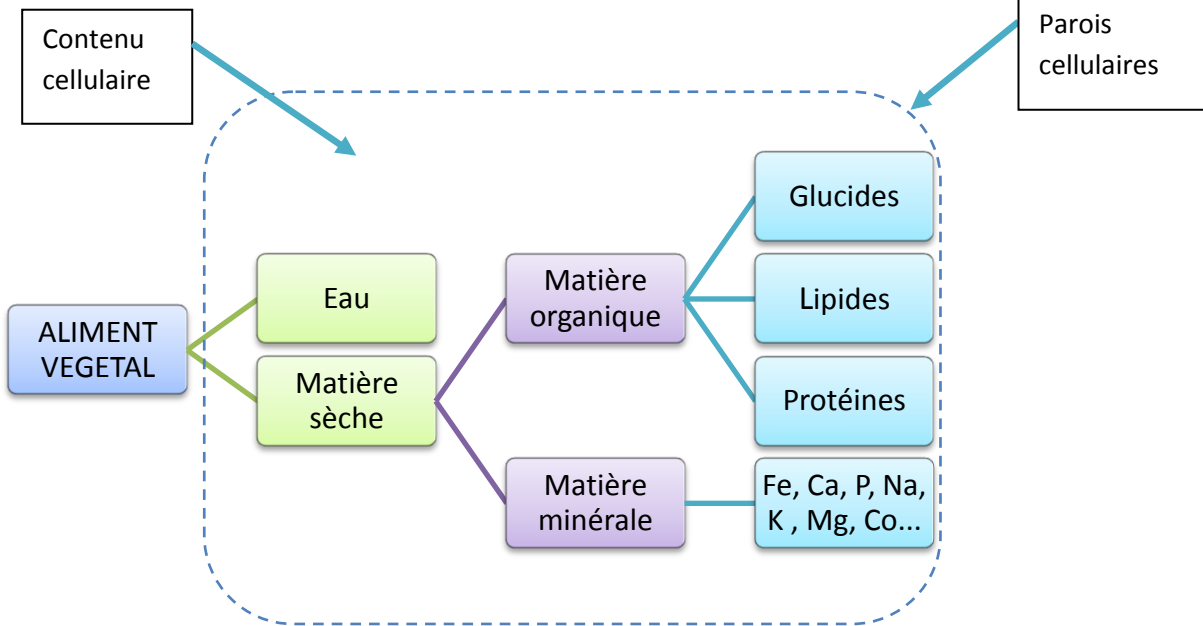


Figure 2:Schéma récapitulatif de la composition des aliments végétaux

Les animaux ont besoin de tous ces éléments plus ou moins nutritifs afin de subvenir à leurs besoins. Ces éléments nutritifs servant au maintien, à la croissance, à la production, à la reproduction et à la santé de l'animal, il est donc nécessaire de connaître leur teneur dans l'aliment afin de composer la ration de l'animal.

IV.2.2. Matière minérale

Comme cité précédemment, la matière minérale est l'ensemble des minéraux contenus dans l'aliment. Le contenu minéral varie d'un végétal à l'autre. Certains minéraux, telle que la silice, ont un effet négatif sur la digestibilité des aliments. L'URZ se charge donc de déterminer la quantité de minéraux contenus dans diverses plantes tropicales. Par exemple, les feuilles de manioc, de fruit à pain, de banane verte ...

IV.2.2.a) Méthode analytique

La matière minérale est déterminée selon la *méthode AOAC 923.03*. La matière minérale fait partie de la matière sèche de l'échantillon. On l'exprime donc sur la base de



cettedernière. L'échantillon est séché à l'étuve pendant 24 heures, à 103° C. Son poids sec est déterminé par *gravimétrie* puis mis à *calcination* à 550°C pendant 6 heures (Détermination matière sèche méthode AOAC 950.46). Le poids en matière minérale peut alors être établi par la même méthode de pesée.

La gravimétrie est une détermination quantitative qui s'effectue par pesée. Le produit est pesé à chaque variation de sa masse. Ici, trois pesées sont nécessaires :

-le poids brut, avant que l'échantillon n'ait subi aucune transformation

C'est le poids de l'aliment composé de tous ces constituants pariétaux et intracellulaires.

-le poids sec, après le séchage à l'étuve

L'aliment ne possède plus que la matière sèche, il a été dépourvu de son eau.

-le poids « matière minérale », après que la matière organique ait été consommée à 550°C.

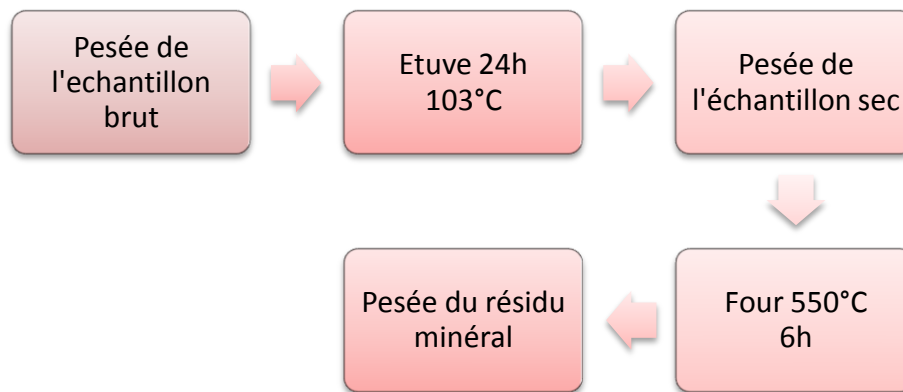
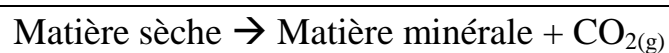


Figure 3: Récapitulatif du processus de détermination de la matière minérale

La calcination consiste à chauffer l'échantillon à très haute température : la matière organique brûle, les résidus minéraux sont alors libérés, il y a formation de $\text{CO}_2(\text{g})$ tel que :



La réaction de la calcination entraîne une décomposition des carbonates selon l'équation suivante : $\text{CaCO}_3 = \text{CaO} + \text{CO}_2(\text{g})$. Elle est endothermique. Après la calcination, on connaît






une perte de masse de l'échantillon car la matière organique s'est volatilisée : c'est la « perte au feu ».

Pour un gain de temps et d'énergie, les analyses de plusieurs échantillons se font simultanément. On procède aux analyses par séries de 24 échantillons.

IV.2.2.b) Matériel utilisé

La détermination de la composition en matière minérale des aliments requiert peu de matériel. Cependant, la précision est indispensable si l'on veut obtenir des résultats représentatifs de la réalité. Voici un tableau (cf. Figure 4) récapitulant l'utilité des principaux acteurs de la méthode.

| Matériel utilisé | Fonction |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  Dessiccateur | Equipement en verre à joint rodé ou graissé qui sert à protéger les substances contre l'humidité. Il est utilisé pendant le refroidissement des échantillons après passage au four et à l'étuve. On y insère le gel de silice car les échantillons sont souvent hygroscopiques. |
|  Gel de silice Si(OH)_4 | C'est un dessiccant mais il sert aussi d'indicateur coloré : quand il se décolore, cela veut dire que son taux d'humidité est maximum. Il faut donc le régénérer ou le remplacer quand nécessaire afin de conserver le milieu anhydre. |
|  Etuve de laboratoire | Appareil de chauffage qui permet d'effectuer les analyses à température régulée, ici 103°C . Thermostatique. C'est lui qui permet d'obtenir la matière sèche : Après 24h, on considère que toute l'eau contenue dans l'aliment a été absorbée. |



| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Four</p>  | <p>Permet la calcination de la matière organique à 550° C. Les cendres récoltées permettent de déterminer la teneur en matière minérale de l'aliment.</p> |
| <p>Balance de précision METTLER</p>  | <p>Outil indispensable à la gravimétrie, la balance permet d'avoir les poids brut, sec et en matière minérale. Elle doit être bien réglée pour éviter les erreurs de mesure.</p> |

Figure 4: tableau récapitulatif du matériel utilisé pour la détermination de la matière minérale

IV.2.3.Parois végétales

Les constituants pariétaux ou encore parois végétales sont des éléments essentiels à la cellule végétale. Elles sont constituées de fibres résistantes réparties en deux groupes : les fibres insolubles et les fibres solubles. Nous nous pencherons uniquement sur les fibres insolubles : cellulose, hémicellulose et lignine (cf. Figure 5).

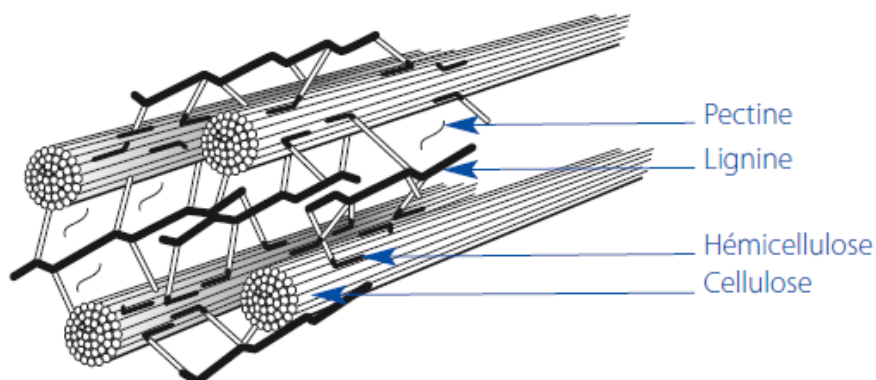


Figure 5: Structure et composition d'une paroi végétale



IV.2.3.a) Cellulose

La cellulose, principal constituant pariétal, est un glucide composé d'une chaîne linéaire de molécules de D-Glucose. C'est donc un homopolymère (polymère obtenu à partir d'un seul type de monomères, ici le D-glucose.). Les monomères de glucose sont reliés les un aux autres par des liaisons β -1,4-glycosidiques et forment un motif, une unité de répétition, appelée cellobiose (cf. Figure 6). Les groupements hydroxyles $-OH$ se trouvent en position équatoriale par rapport au plan du cycle, tandis que les hydrogènes sont en position axiale, Ce qui assure une cohésion à l'ensemble de la cellulose.

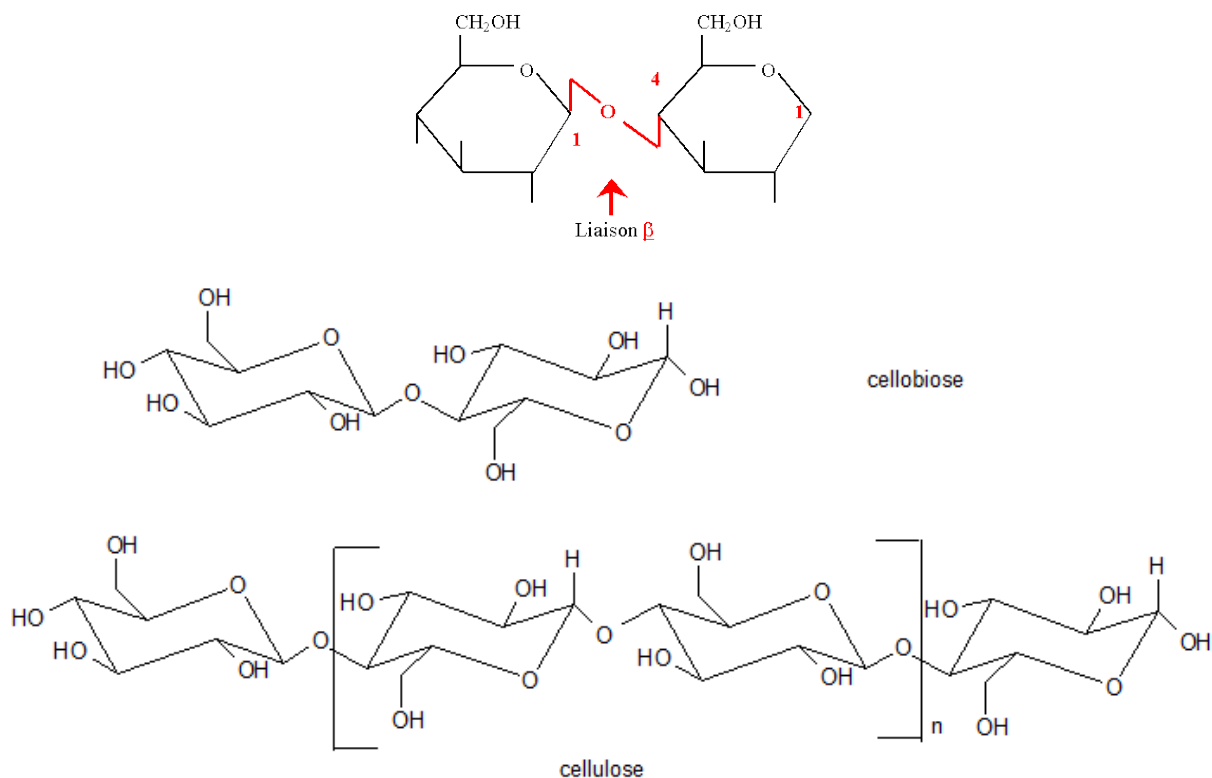


Figure 6: Liaison β 1,4 glycosidique, cellobiose et cellulose

C'est une molécule insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques. Sa formule brute est de $(C_6H_{10}O_5)_n$. Les animaux herbivores digèrent la cellulose grâce à des enzymes fournis par des bactéries de leur flore intestinale, qui parviennent à diviser les macromolécules.



IV.2.3.b) Hémicellulose

L'hémicellulose est également un polysaccharide (ou polyoside : sucre complexe constitué par la polymérisation d'oses) formé à partir de pentoses. C'est le deuxième composant des parois cellulaires végétales. Cependant il existe plusieurs types d'hémicelluloses : leur structure et leur composition varie selon leur provenance, soit des feuilles ou des racines. Les hémicelluloses sont également insolubles dans l'eau. Les hémicelluloses sont composés de β -(1,4)-D-pyranoses, ces pyranoses pouvant être du glucose, mannose ou xylose (cf. Figure 7). Ainsi, les hémicelluloses sont respectivement appelées xyloglucanes, mannanes ou xylanes.⁴ Les hémicelluloses sont également insolubles dans l'eau mais solubles dans les solutions alcalines. Les hémicelluloses contribuent à renforcer les parois cellulaires en interagissant avec la cellulose, voire la lignine.

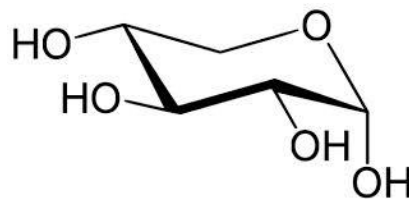
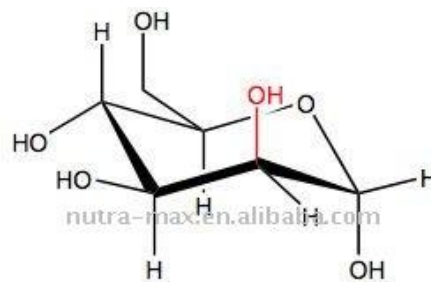


Figure 7: xylose et mannose entrant dans la composition des hémicelluloses



IV.2.3.c) Lignine

Quant à la lignine, c'est une substance non glucidique, c'est à dire sans glucose. Cette macromolécule complexe formée à partir de monomères (cf. Figure 7) s'associe aux autres

polysaccharides du végétal. Sa structure varie également en fonction de l'espèce et des conditions climatiques. La lignine entrave au bon déroulement de la digestion des parois.

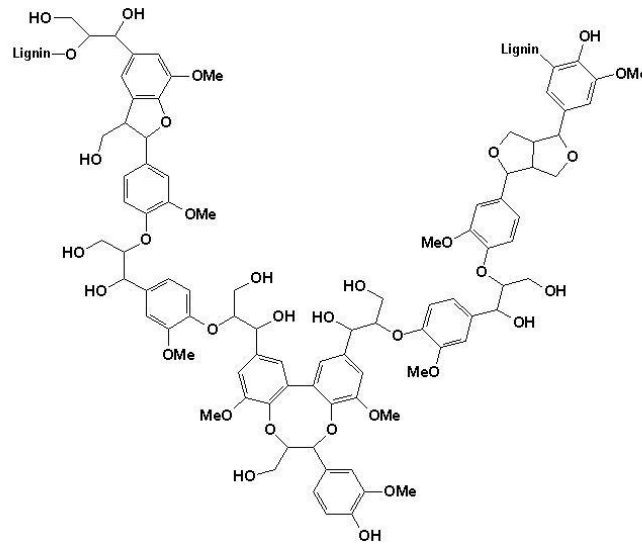


Figure 8: Modèle de la structure de la lignine

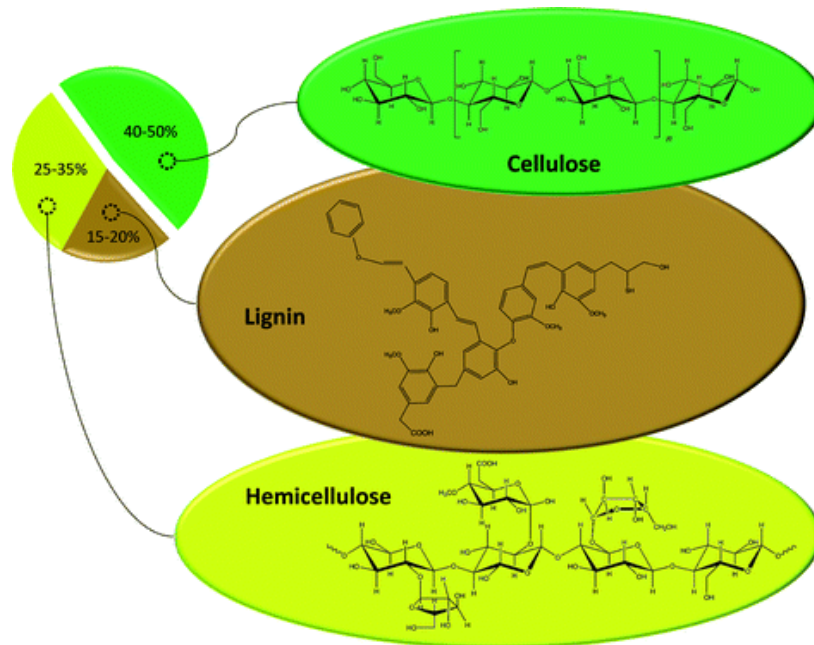


Figure 9: Composition typique de la cellule

IV.2.3.d) Méthode analytique

L'évaluation du contenu des parois cellulaires des aliments est importante, parce qu'il est fortement lié à leur digestibilité de matière organique ainsi qu'à la valeur nutritive de ces



aliments : les fibres sont plus ou moins digérées par les ruminants selon le tissu végétal, tandis que les constituants intracellulaires sont généralement entièrement digérés.

La méthode analytique utilisée depuis quelques années a été pensée par le chercheur américain Van Soest. Elle est basée sur trois hydrolyses successives qui permettent de quantifier trois résidus, dont la teneur en parois cellulaires décroît après chaque hydrolyse. En réalité, on devrait plutôt parler d'extraction.

i). Neutral Detergent Fiber

La première hydrolyse s'effectue grâce à un détergent neutre. Ce dernier permet la libération du contenu cellulaire tel qu'il ne reste plus que la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. Ces trois constituants pariétaux sont donc qualifiés de Fibres insolubles au détergent Neutre ou NDF. La solution détergente neutre (NDS) est composée du dodecylsulfate de sodium (laurylsulfate de sodium ou SDS) en milieu neutre. C'est un tensioactif ionique fort et un détergent de formule brute $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ (cf. Figure 9)

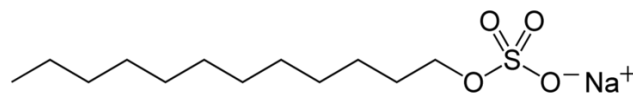


Figure 10: structure du SDS

Le laurylsulfate de sodium sert à solubiliser la matière azotée, que constitue une grande partie de la cellule. Dans la solution NDS, il y a également de l'EDTA, du triéthylène glycol, du sodium borate décahydraté, de l'hydrogénophosphate de sodium Na_2HPO_4 qui sert à maintenir le pH à 7.

Les échantillons sont donc soumis pendant une heure à la solution NDS à haute température (100°C).

Après l'hydrolyse, la gravimétrie intervient à nouveau, on pèse le poids de l'aliment débarrassé de ses constituants intracellulaires. Le résidu « parois cellulaires » contient donc essentiellement les constituants pariétaux de la cellule c'est-à-dire la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.



ii) AcidDetergentFiber

La deuxième hydrolyse est effectuée sur le résidu « parois cellulaires ». Par ébullition, avec une solution acide (en présence d'acide sulfurique H_2SO_4) de détergent cetyltriméthyl ammonium bromide (CTAB), les hémicelluloses sont solubilisées, ce qui permet de déterminer le résidu « lignocellulose », qui est qualifié de Fibre insoluble au Détergent Acide (ADF). cependant, ce résidu peut contenir des traces de tannins et de constituants azotés. Cette hydrolyse dure également une heure. On détermine par gravimétrie la teneur en lignocellulose.

iii) AcidDetergentLignin

La dernière hydrolyse permet d'estimer la teneur en lignine. En effet, après l'ADF, on solubilise la cellulose dans de l'acide sulfurique H_2SO_4 à 72% pendant 3 heures (cf. Figure 11). La lignine n'est pas digestible, elle entrave la digestion des autres polysaccharides. Le résidu « lignine » est donc le résultat de la destruction par H_2SO_4 du résidu « lignocellulose ».



Figure 11: hydrolyse pour la détermination de la lignine



Voici donc un schéma récapitulatif de la méthode de Van Soest :

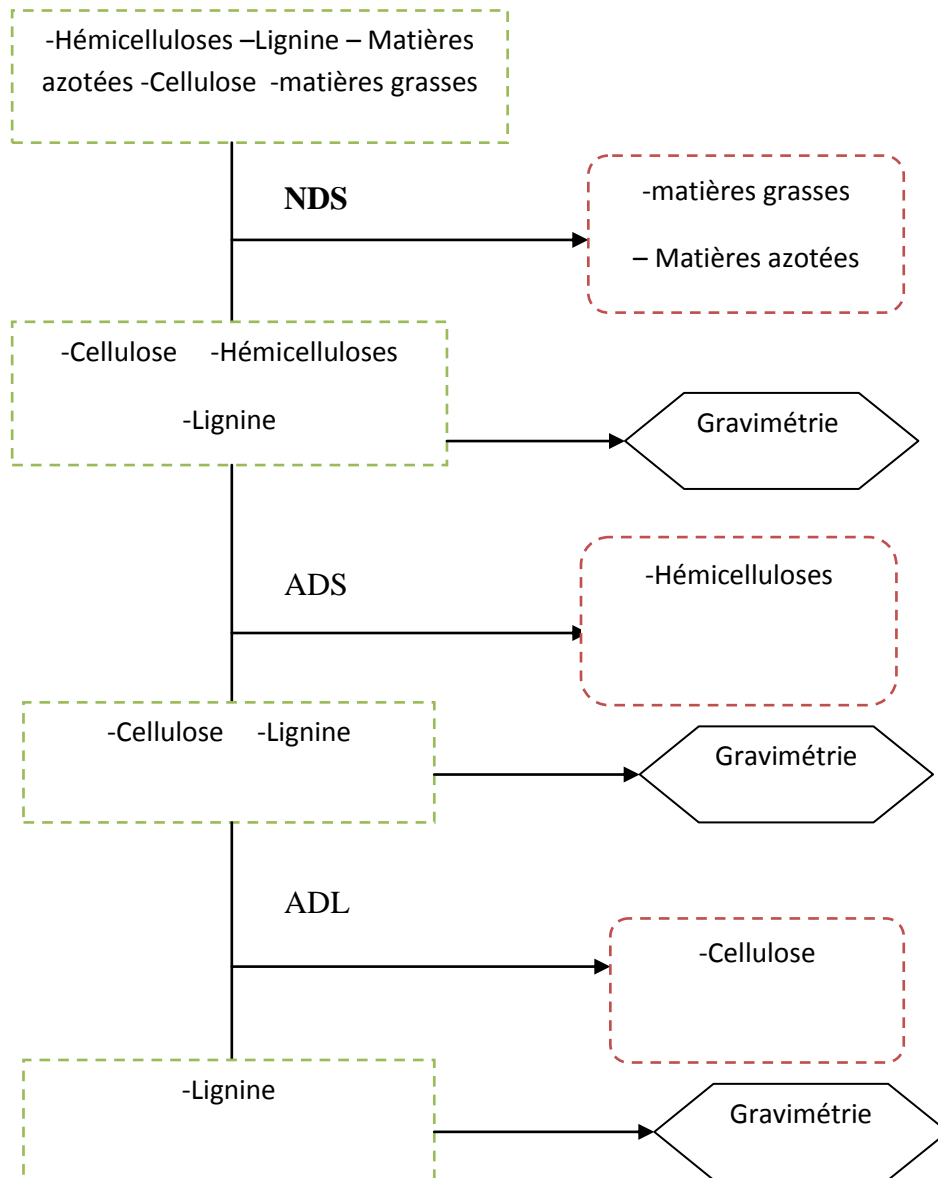


Figure 12:schéma des composés dosés dans la méthode de Van Soest



IV.2.3.e) Matériel utilisé : Fonctionnement

Les deux premières hydrolyses (NDF et ADF) s'effectuent dans un appareil nommé FIBERSAC. Le laboratoire de l'URZ en possède trois : deux semi-automatiques ANKOM 200 (rinçages manuels) et un automatique ANKOM 2000.



Figure 13: ANKOM 2000 Fiber Analyser



ANKOM 200 manuels

Les *fourrages* à analyser sont placés dans des sacs en téflon (matière résistante), entre 0,48 et 0,52 g par sac. Le poids vide des sacs a préalablement été pesé après un séjour de 24 heures à l'étuve. Ces derniers sont ensuite soudés, placés sur des portoirs qui sont introduits dans le vase de digestion du FIBERSAC.



Figure 14: sacs en téflons et portoir



L'appareil peut donc être refermé et démarré pour une heure, avec la solution appropriée (NDS ou ADS), à température d'ébullition de l'eau. Le FIBERSAC possède un système d'agitation intégré qui permet une meilleure solubilisation. Pour les rinçages dans le cadre de l'utilisation de l'appareil semi-automatique ANKOM 200, ils sont au nombre de 4 et s'effectuent en agitation dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes. Après chaque extraction subie par l'échantillon, celui-ci est mis à l'étuve pendant 24 heures et pesé.



IV.3.Calculs, vérifications de données

IV.3.1.Détermination de la matière minérale

Le pourcentage de matière minérale est calculé en fonction de la matière sèche.

Puisque le végétal à analyser est placé dans des capsules en porcelaine, sa masse réelle correspond à la différence entre le poids vide et le poids brut :

$$Poids\ réel = poids\ brut - poids\ vide$$

Le poids sec, après les 24h à l'étuve c'est le poids en matière sèche, c'est-à-dire quand l'aliment ne possède plus d'eau. Pour connaître le pourcentage de matière sèche il faut donc opérer suivant :

$$\%MS = \frac{Poids\ MS}{Poids\ réel} \times 100,$$

$$\text{Ce qui équivaut à : } \%MS = \frac{(poids\ sec - poids\ vide)}{(poids\ brut - poids\ vide)} \times 100$$

La dernière pesée du processus, celle qui est effectuée après calcination permet de déterminer le pourcentage de matière minérale de la matière sèche :

$$\%MM = \frac{Poids\ après\ calcination}{Poids\ MS} \times 100, \text{ soit : } \%MM = \frac{(poids\ MM - poids\ vide)}{(poids\ sec - poids\ vide)} \times 100$$

Ces formules sont enregistrées dans des feuilles Excel et les balances METTLER sont informatisées.



IV.3.1.a) Cartes de contrôle

La méthode de détermination de la matière minérale est reconnue et éprouvée au laboratoire de l'URZ. Cependant dans un souci de démarche qualité il m'a été demandé de réaliser une carte de contrôle.

Les mesures de matière sèche et minérale sont réalisées en simple exemplaire pour chaque échantillon. Afin d'estimer si les résultats sont concordants avant transmission au chercheur, on se réfère à une plante choisie par le laboratoire qui sert de témoin à chaque série d'analyses. Le témoin choisi est le Sorgho (ou S3). Expérimenté et développé depuis 30 ans, le sorgho (cf. Figure 11) possède des atouts qui font de lui une plante fourragère très intéressante tant sur le plan économique qu'écologique.



Figure 11: Sept variétés de Sorgho

Le témoin Sorgho est utilisé à l'URZ depuis 1996 et est reconnu pour la stabilité de ses valeurs nutritionnelles au cours de l'année. Cependant, il faut tout de même vérifier que ce témoin est encore fiable : les conditions de conservation, ou l'âge, peuvent influencer sur les valeurs du S3. C'est dans ce but que j'ai procédé à l'élaboration d'une carte de contrôle.

La carte de contrôle est comme son nom l'indique, un moyen de contrôler certains critères. Ici, il s'agit de la matière minérale sur la base de la matière sèche. Il a été nécessaire



de faire l'inventaire de tous les pourcentages en matière minérale depuis 2010 jusqu'à ce jour et d'effectuer le graphe représentant l'évolution de ces valeurs en fonction du temps. En estimant que les premières valeurs enregistrées sont les plus « vraies », c'est donc grâce à ces dernières que j'ai pu calculer les limites de contrôle et de surveillance.

Tout d'abord, après le recensement de tous les résultats expérimentaux en matière minérale recueillis au laboratoire depuis l'année 2011, j'ai calculé grâce au logiciel Excel les moyennes par jour de ces résultats. En effet, puisque plusieurs séries sont analysées par jour on se retrouve avec beaucoup de valeurs pour le pourcentage de matière minérale du sorgho. Les moyennes par jour permettent d'avoir une meilleure lecture sur le graphe.

Comme cité précédemment, les valeurs les plus anciennes sont plus probables d'être correctes : le témoin n'a pas encore connu les aléas du temps, ni les problèmes de conservation. En prenant en compte de ces conditions, une valeur moyenne a été calculée sur la base des 30 premières valeurs de l'année 2010 (les plus anciennes enregistrées en machine).

A partir des moyennes par jour, l'écart-type a pu être calculé. La détermination des limites de contrôle et de surveillance est donc été possible. On considère une limite de contrôle supérieure (LCS) et une limite de contrôle inférieure (LCI) telle que :

$$LCI = \text{valeur moyenne} - 3 \times \frac{\text{Ecartype}}{\sqrt{\text{nombre de répétitions de la mesure}}}$$

$$LCS = \text{valeur moyenne} + 3 \times \frac{\text{Ecartype}}{\sqrt{\text{nombre de répétitions de la mesure}}}$$

A l'intérieur des limites de contrôle on peut aussi délimiter des limites de surveillances (LSS et LSI), ces dernières établissent l'intervalle où les valeurs sont critiques mais encore acceptables. L'intervalle qui sépare les limites de contrôle supérieur et inférieur doit contenir le maximum des valeurs. Les résultats qui se trouvent en dehors des limites de contrôle témoignent de problèmes rencontrés, soit lors des mesures (lors d'une pesée une partie de l'échantillon a été renversé, ...), ou concernant l'échantillon lui-même (humidité croissante à cause des conditions de conservations, développement de bactéries...)



IV.3.2. Détermination des parois végétales

Les teneurs en NDF, ADF et ADL sont exprimés sur la base de la matière sèche.

Pour les déterminer on utilise les formules suivantes :

$$\%NDF = \frac{\text{poidsrésiduNDF} \times 100}{\frac{\text{Poidsplein} \times \%MS}{100}} = \text{poidsrésiduNDF} \times 100 \times \frac{100}{\text{Poidsplein} \times \%MS}$$

Or, $\text{poidsrésiduNDF} = \text{PoidsNDF} - \text{Poidsvide}$,

D'où $\%NDF = (\text{poidsNDF} - \text{poidsvide}) / \text{poids plein} / \%MS \times 10000$

Par analogie, on a : $\%ADF = (\text{poidsADF} - \text{poidsvide}) / \text{poids plein} / \%MS \times 10000$

Et $\%ADL = (\text{poidsADL} - \text{poidsvide}) / \text{poids plein} / \%MS \times 10000$.

Ces formules sont enregistrées dans des Feuilles Excel, les calculs sont automatisés par le logiciel.

IV.3.2.a) Vérification des données

Les analyses doivent être validées avant transmission au chercheur. Pour cela un témoin est introduit dans chaque série d'échantillons analysés et chaque échantillon (témoin compris) est répété 3 fois.

La valeur connue du témoin doit être retrouvée en fin d'analyse (pour le témoin S3 entre 8,5 et 9,1 %MS). En plus de cette condition, les données obtenues sont soumises au calcul du coefficient de variation (CV) entre répétitions. Il est imposé au laboratoire une valeur limite de 5% du coefficient de variation afin de statuer à la validation du résultat.

La formule suivante est utilisée pour le calcul du coefficient de variation :

$$CV = \frac{\text{écartype}}{\text{moyenne}} \times 100$$

IV.3.2.b) Carte de contrôle.

De même que pour la détermination de la matière minérale, j'ai réalisé une carte de contrôle sur les données d'analyse des parois végétales de 2010 à 2013.



V. Résultats et exploitation

V.1. Résultats en matière minérale

V.1.a) Validation de données

A titre d'illustration, prenons une des plantes analysées dans le protocole CMM1301, le « Ka manioc » ou manioc doux (Kmanioc). C'est un tubercule qui pousse en zone tropicale humide et équatoriale.

Des feuilles de K Manioc ont été lyophilisées et répertoriées au code labo AL00193. Le poids vide enregistré de la capsule référencée m94 est de 26,1395 g et le poids brut après ajout des feuilles est de 28,139 g. On peut donc en déduire le poids réel de l'échantillon :

$$\begin{aligned} \text{Poids réel du K manioc} &= \text{poids brut plein} - \text{poids vide} \\ &= 28,139 - 26,1395 = 1,9995 \text{ g} \end{aligned}$$

Après les 24h à l'étuve, on a obtenu un poids sec de 27,9335 g, soit le poids réellement sec :

$$\text{Poids réellement sec} = 27,9335 - 26,1395 = 1,794 \text{ g.}$$

On peut donc déterminer le pourcentage de matière sèche de cet échantillon :

$$\begin{aligned} \%MS &= \frac{\text{Poids réellement sec}}{\text{Poids réel de K manioc}} \times 100 = \frac{1,794}{1,9995} \times 100 \\ &= 89,72 \% \end{aligned}$$

L'échantillon AL00193 est donc soumis à une dernière transformation, la calcination. Après les 6 heures dans le four, le poids des cendres est pesé et on obtient 26,3582 g.

On peut déterminer alors le pourcentage de matière minérale de la matière sèche :

$$\%MM = \frac{\text{Poids résidu minéral}}{\text{Poids réellement sec}} \times 100 = \frac{\text{Poids des cendres} - \text{Poids vide}}{\text{Poids réellement sec}} \times 100$$



$$= \frac{(26,3582 - 26,1395)}{1,794} \times 100 = 12,19 \% \text{ de la MS.}$$

C'est donc ainsi que sont déterminées les quantités en matière minérale des aliments.

Voici comment est présentée la feuille Excel contenant les formules détaillées ci-dessus :

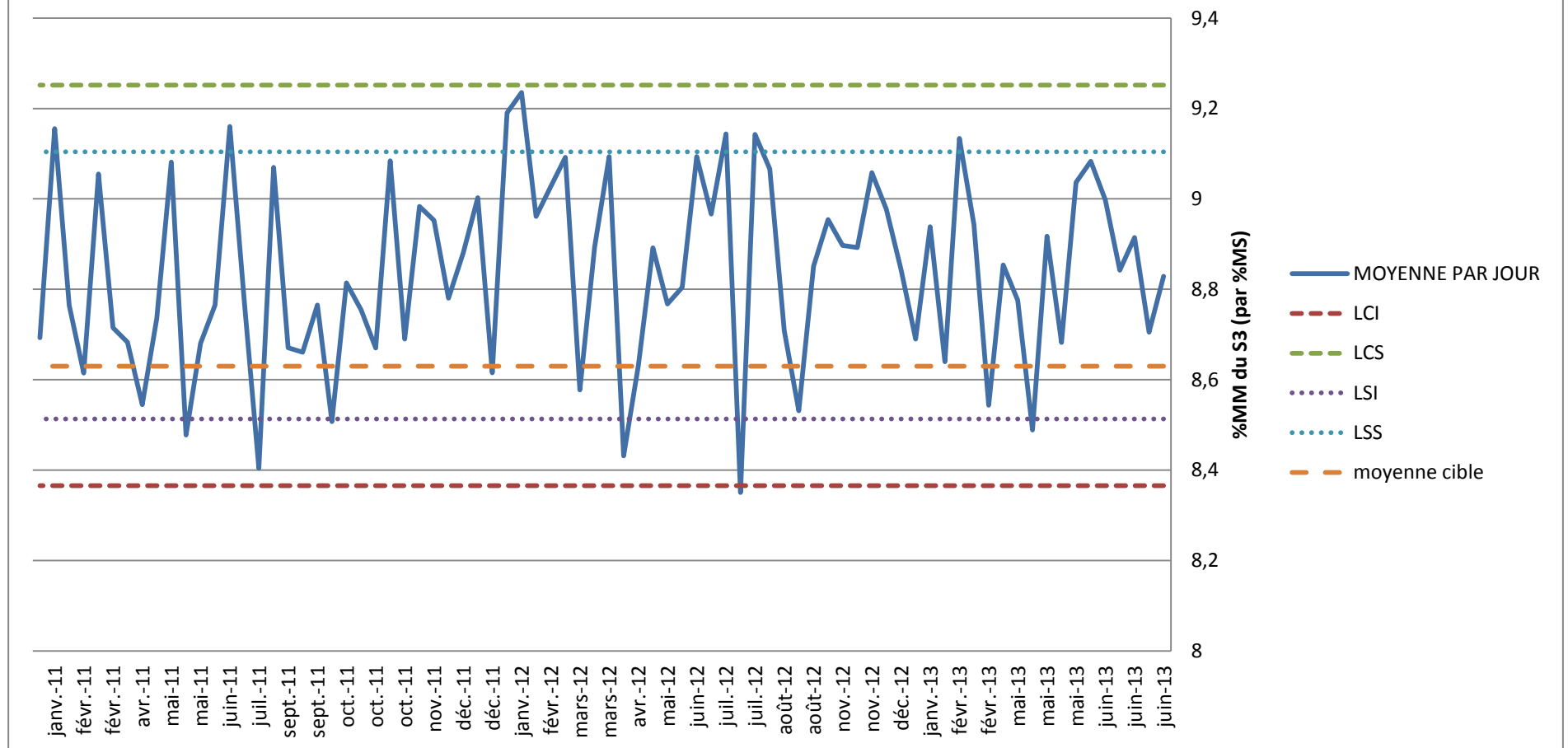
| Protocole : | CMM1301 | | 10/6/13 | | 11/6/13 | 13/6/13 | | | |
|-----------------|---------|---------|-----------|----------|----------|----------|-------|-------|----------------|
| | | | 8h10-8h40 | | 14h06-36 | 10h01-31 | | | |
| Nom de la série | | N° CAPS | PDS VIDE | PDS BRUT | PDS SEC | PDS MM | MS | MM | |
| BA 24 | | | | + TARE | + TARE | + TARE | % MS | % MS | |
| | LABO | | 100 | 200 | 150 | 125 | 50,00 | 50,00 | |
| | CODE | | | | | | | | |
| 1 | A45915 | h10 | 11,3127 | 13,9302 | 13,6764 | 11,6152 | 90,30 | 12,80 | A45915 |
| 2 | A45917 | m51 | 23,3537 | 26,045 | 25,7596 | 23,6412 | 89,40 | 11,95 | A45917 |
| 3 | A45919 | d88 | 15,7878 | 18,0533 | 17,8192 | 16,0467 | 89,67 | 12,74 | A45919 |
| 4 | A45923 | d806 | 15,0238 | 17,6738 | 17,4823 | 15,2541 | 92,77 | 9,37 | A45923 |
| 5 | A45924 | v39 | 17,4666 | 20,3973 | 20,177 | 17,7259 | 92,47 | 9,57 | A45924 |
| 6 | A45927 | d23 | 11,3571 | 12,4142 | 12,308 | 11,4106 | 89,94 | 5,63 | A45927 |
| 7 | A45928 | h43 | 11,5809 | 12,9247 | 12,8151 | 11,6694 | 91,84 | 7,17 | A45928 |
| 8 | A45929 | h37 | 14,3319 | 15,6107 | 15,5081 | 14,4100 | 91,98 | 6,64 | A45929 |
| 9 | A45930 | m148 | 22,0650 | 23,4415 | 23,3467 | 22,1438 | 93,11 | 6,15 | A45930 |
| 10 | A45931 | v7 | 15,3653 | 17,8889 | 17,7095 | 15,6290 | 92,89 | 11,25 | A45931 |
| 11 | A45933 | d4 | 14,6364 | 17,0702 | 16,9205 | 14,9267 | 93,85 | 12,71 | A45933 |
| 12 | A45935 | v11 | 11,1430 | 13,9304 | 13,7592 | 11,4850 | 93,86 | 13,07 | A45935 |
| 13 | A45939 | v53 | 10,4837 | 14,4406 | 14,1446 | 10,8313 | 92,52 | 9,49 | A45939 |
| 14 | A45940 | v76 | 11,2437 | 14,9839 | 14,7013 | 11,5875 | 92,44 | 9,94 | A45940 |
| 15 | A45943 | h20 | 11,3877 | 12,7468 | 12,6473 | 11,4590 | 92,68 | 5,66 | A45943 |
| 16 | A45944 | d76 | 14,5055 | 15,4826 | 15,4152 | 14,5719 | 93,10 | 7,30 | A45944 |
| 17 | A45945 | m11 | 23,3108 | 24,6463 | 24,5538 | 23,3917 | 93,07 | 6,51 | A45945 |
| 18 | A45946 | m92 | 27,0783 | 28,2306 | 28,1552 | 27,1396 | 93,46 | 5,69 | A45946 |
| 19 | AL00193 | m94 | 26,1395 | 28,139 | 27,9335 | 26,3582 | 89,72 | 12,19 | AL00193 |
| 20 | AL00195 | m59 | 19,6448 | 22,07 | 21,9062 | 19,9211 | 93,25 | 12,22 | AL00195 |
| 21 | AL00197 | m49 | 24,7418 | 27,0996 | 26,6708 | 24,9825 | 81,81 | 12,48 | AL00197 |
| 22 | AL00201 | m125 | 24,6733 | 26,6388 | 26,5144 | 24,8430 | 93,67 | 9,22 | AL00201 |
| 23 | AL00202 | m37 | 23,0233 | 24,7882 | 24,6319 | 23,1723 | 91,14 | 9,26 | AL00202 |
| 24 | AL00205 | m20 | 21,9923 | 23,2447 | 23,1756 | 22,0584 | 94,48 | 5,59 | AL00205 |
| 25 | AL00206 | m4 | 25,7408 | 26,9326 | 26,8693 | 25,8217 | 94,69 | 7,17 | AL00206 |
| 26 | AL00207 | m40 | 23,9047 | 24,8307 | 24,7661 | 23,9611 | 93,02 | 6,55 | AL00207 |
| 27 | AL00208 | m22 | 24,3610 | 25,2978 | 25,2564 | 24,4095 | 95,58 | 5,42 | AL00208 |
| 28 | S3 | m60 | 23,1721 | 25,3221 | 25,0743 | 23,3396 | 88,47 | 8,81 | S3 |

V.1.b) carte de contrôle

Voici donc la carte de contrôle que j'ai pu dresser durant cette période de stage :



Evolution de la matière minérale sur la base de la matière sèche du témoin sorgho S3 (2011-2013)





Ici, on remarque que les valeurs sortent peu des limites de contrôle, et de plus, elles sont légèrement croissantes au fil du temps. Or, les valeurs des témoins devraient être stables car ils servent de références. On peut donc conclure que le S3 a connu des modifications au cours du temps. Ces changements sont certainement dus à l'âge. En effet, le S3 est utilisé depuis plus de 10 ans maintenant au laboratoire de l'URZ. Par ailleurs, les conditions de conservations jouent un rôle dans la teneur en matière minérale du Sorgho. L'augmentation progressive de celle-ci trahit les réactions d'oxydoréduction qui s'y produisent. Par ailleurs, on peut supposer que des bactéries se soient progressivement développées au sein du sorgho, ce qui expliquerait l'augmentation de la teneur en matière minérale du témoin.

V.1.c) Discussion des résultats en matière minérale

La méthode d'analyse de la teneur en matière minérale permet d'aboutir à deux conclusions. Premièrement, concernant les analyses faites pour le protocole CMM 1301, les résultats trouvés varient en fonction de la plante mais également de la méthode de séchage.

La méthode de détermination de la matière sèche et de la matière minérale est éprouvée au laboratoire. Les résultats peuvent être considérés bons. Cependant d'après les résultats obtenus avec la carte de contrôle, le sorgho témoin utilisé semble avoir connu des modifications au cours du temps. Il serait donc nécessaire de le renouveler.

La méthode d'analyse de la composition matière minérale des aliments est une méthode simple, effectuée en trois grandes étapes. Si elle semble monotone cette technique d'analyse simple nécessite beaucoup de précision afin d'avoir avec exactitude les résultats gravimétriques, mais elle est aussi primordiale quant à la détermination des différents composants de l'aliment.



V.2.Résultats en parois végétales

V.2.a) Validation de données

Reprenons à titre d'illustration l'échantillon répertorié AL00193 dans le protocole CMM1301. Ce sont des feuilles de kaManioc lyophilisées.

Le poids vide du sac en téflon référencé BF 881 qui a servi à l'analyse de cet échantillon est de 0,5135g. L'échantillon en poids brut pèse 0,5142g. Après la première hydrolyse (NDF), on obtient 0,6754g de résidu NDF. Pour cet échantillon on a 89,72% de matière sèche d'où :

$$\%NDF = \frac{(0,6754 - 0,5135)}{0,5142 \times 89,72} \times 10000 = 35,09 \text{ par } \%MS$$

A la deuxième hydrolyse, on obtient 0,6215g de résidu ADF d'où :

$$\%ADF = \frac{(0,6215 - 0,5135)}{0,5142 \times 89,72} \times 10000 = 23,41 \text{ par } \%MS$$

Enfin, après les 3 heures dans la solution d'acide sulfurique à 72% , on obtient un résidu ADL de 0,5644g d'où :

$$\%ADL = \frac{(0,5644 - 0,5135)}{0,5142 \times 89,72} \times 10000 = 11,03 \text{ par } \%MS$$

C'est donc ainsi que sont déterminés les pourcentages ADL, ADF et NDF des parois végétales.

Voici comment se présente le tableur Excel enregistrant et calculant ces valeurs :



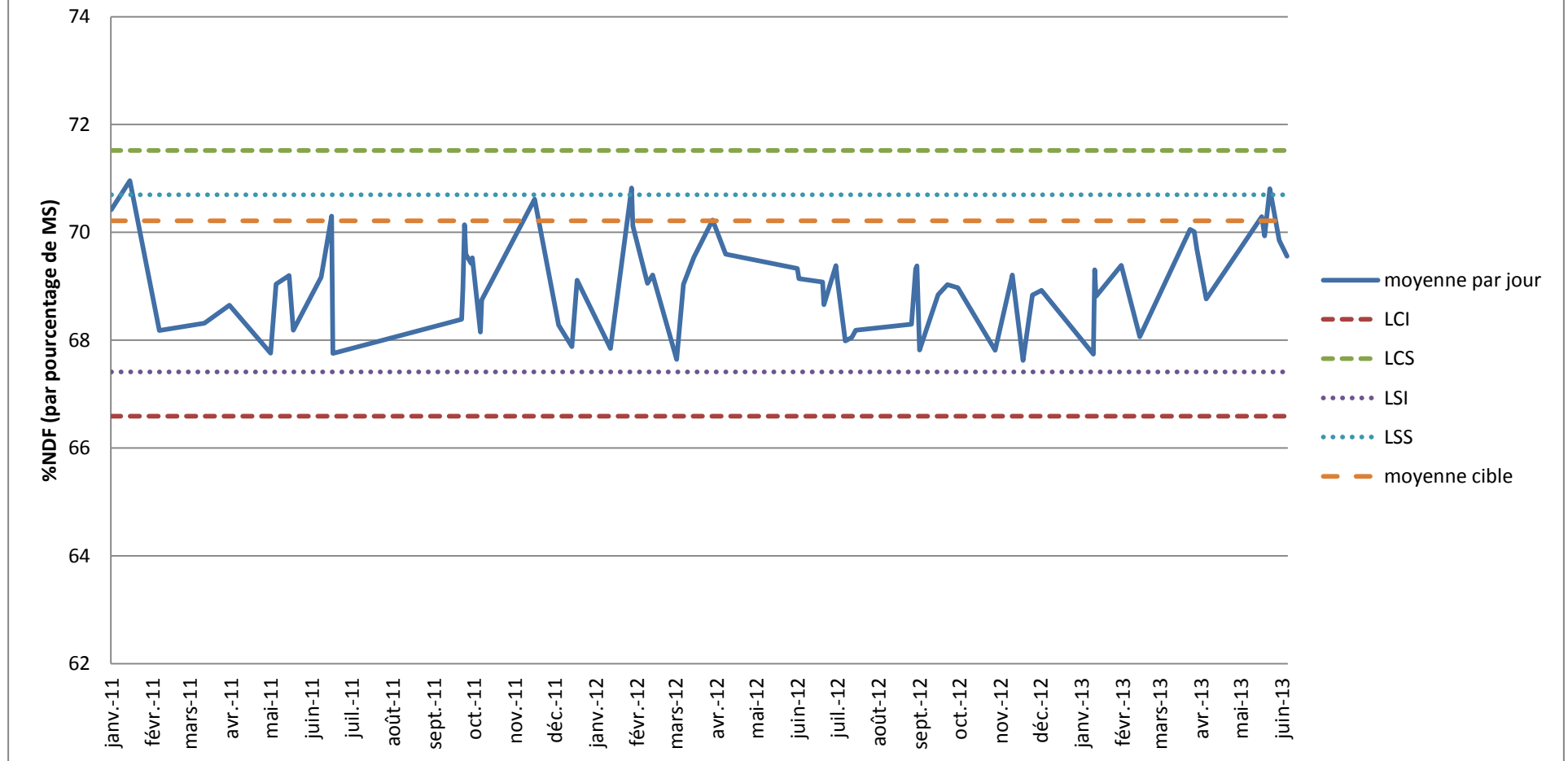
| | | | 03/06/2013 | 06/06/2013 | 07/06/2013 | 11/06/2013 | 12/06/2013 | | | | | |
|-----------|----------------|--------|-------------|------------|------------|------------|------------|----------|-------|-------|-------|-----------|
| CODE LABO | N° SAC | | vide | plein | NDF | ADF | ADL | MS | NDF % | ADF % | ADL % | CODE LABO |
| | | | 11h14-11h44 | | 8h30-9h00 | 7h00-30 | 9h30-10h | | | | | |
| | PESEE NOUVELLE | | 0,5000 | 0,5000 | 0,7000 | 0,6000 | 0,5500 | 100 | 40,00 | 20,00 | 10,00 | |
| 1 | A45915 | BF 865 | 0,5439 | 0,4963 | 0,7049 | 0,6626 | 0,6013 | 90,30 | 35,92 | 26,49 | 12,81 | A45915 |
| 2 | A45917 | BF 866 | 0,5369 | 0,5024 | 0,6991 | 0,6526 | 0,5988 | 89,40 | 36,11 | 25,76 | 13,78 | A45917 |
| 3 | A45919 | BF 867 | 0,541 | 0,5202 | 0,7340 | 0,6697 | 0,5978 | 89,67 | 41,38 | 27,59 | 12,18 | A45919 |
| 4 | A45923 | BF 868 | 0,5415 | 0,5129 | 0,7418 | 0,6589 | 0,5964 | 92,77 | 42,09 | 24,67 | 11,54 | A45923 |
| 5 | A45924 | BF 869 | 0,5482 | 0,5186 | 0,7564 | 0,6601 | 0,5963 | 92,47 | 43,42 | 23,33 | 10,03 | A45924 |
| 6 | A45927 | BF 870 | 0,5297 | 0,5078 | 0,7679 | 0,7127 | 0,6347 | 89,94 | 52,15 | 40,07 | 22,99 | A45927 |
| 7 | A45928 | BF 871 | 0,5188 | 0,4983 | 0,7548 | 0,6961 | 0,6187 | 91,84 | 51,57 | 38,74 | 21,83 | A45928 |
| 8 | A45929 | BF 872 | 0,5328 | 0,5016 | 0,7590 | 0,7012 | 0,6246 | 91,98 | 49,03 | 36,50 | 19,90 | A45929 |
| 9 | A45931 | BF 873 | 0,537 | 0,5003 | 0,6995 | 0,6568 | 0,5998 | 92,89 | 34,97 | 25,78 | 13,51 | A45931 |
| 10 | A45933 | BF 874 | 0,5269 | 0,4967 | 0,7150 | 0,6790 | 0,6169 | 93,85 | 40,35 | 32,63 | 19,31 | A45933 |
| 11 | A45935 | BF 875 | 0,5307 | 0,5018 | 0,7085 | 0,6488 | 0,5865 | 93,86 | 37,75 | 25,08 | 11,85 | A45935 |
| 12 | A45939 | BF 876 | 0,5071 | 0,5144 | 0,7336 | 0,6545 | 0,5882 | 92,52 | 47,59 | 30,97 | 17,04 | A45939 |
| 13 | A45940 | BF 877 | 0,5158 | 0,4959 | 0,7359 | 0,6410 | 0,5823 | 92,44 | 48,01 | 27,31 | 14,51 | A45940 |
| 14 | A45943 | BF 878 | 0,5148 | 0,5022 | 0,7905 | 0,7489 | 0,6678 | 92,68 | 59,24 | 50,30 | 32,87 | A45943 |
| 15 | A45944 | BF 879 | 0,537 | 0,5131 | 0,8117 | 0,7521 | 0,6668 | 93,10 | 57,50 | 45,03 | 27,17 | A45944 |
| 16 | A45945 | BF 880 | 0,521 | 0,5049 | 0,8012 | 0,7576 | 0,6631 | 93,07 | 59,63 | 50,35 | 30,24 | A45945 |
| 17 | AL00193 | BF 881 | 0,5135 | 0,5142 | 0,6754 | 0,6215 | 0,5644 | 89,72 | 35,09 | 23,41 | 11,03 | AL00193 |
| 18 | AL00195 | BF 882 | 0,5401 | 0,495 | 0,7043 | 0,6695 | 0,6076 | 93,25 | 35,57 | 28,03 | 14,62 | AL00195 |
| 19 | AL00197 | BF 883 | 0,518 | 0,4948 | 0,6484 | 0,6152 | 0,5613 | 81,81 | 32,21 | 24,01 | 10,70 | AL00197 |
| 20 | AL00201 | BF 884 | 0,5192 | 0,4915 | 0,7112 | 0,6153 | 0,5645 | 93,67 | 41,70 | 20,87 | 9,84 | AL00201 |
| 21 | S3 | BF 885 | 0,5175 | 0,489 | 0,8188 | 0,7072 | 0,5450 | 88,81 | 69,38 | 43,68 | 6,33 | S3 |
| 22 | S3 | BF 886 | 0,5201 | 0,5043 | 0,8406 | 0,7214 | 0,5490 | 88,81 | 71,56 | 44,95 | 6,45 | S3 |
| 23 | S3 | BF 887 | 0,5201 | 0,5079 | 0,8304 | 0,7151 | 0,5474 | 88,81 | 68,79 | 43,23 | 6,05 | S3 |
| 24 | S3 | BF 888 | 0,5347 | 0,4959 | 0,8430 | 0,7313 | 0,5639 | 88,81 | 70,00 | 44,64 | 6,63 | S3 |
| | | | | | | | | moyenne | 69,93 | 44,27 | 6,38 | |
| | | | | | | | | ecartype | 1,19 | 0,91 | 0,30 | |
| | | | | | | | | CV | 1,70 | 2,07 | 4,64 | |

V.2.b) cartes de contrôle

Comme pour la matière minérale, j'ai également effectué des cartes de contrôle pour les parois végétales de 2011 à 2013.



Evolution du résidu NDF du témoin sorgho S3 de 2011 à 2013

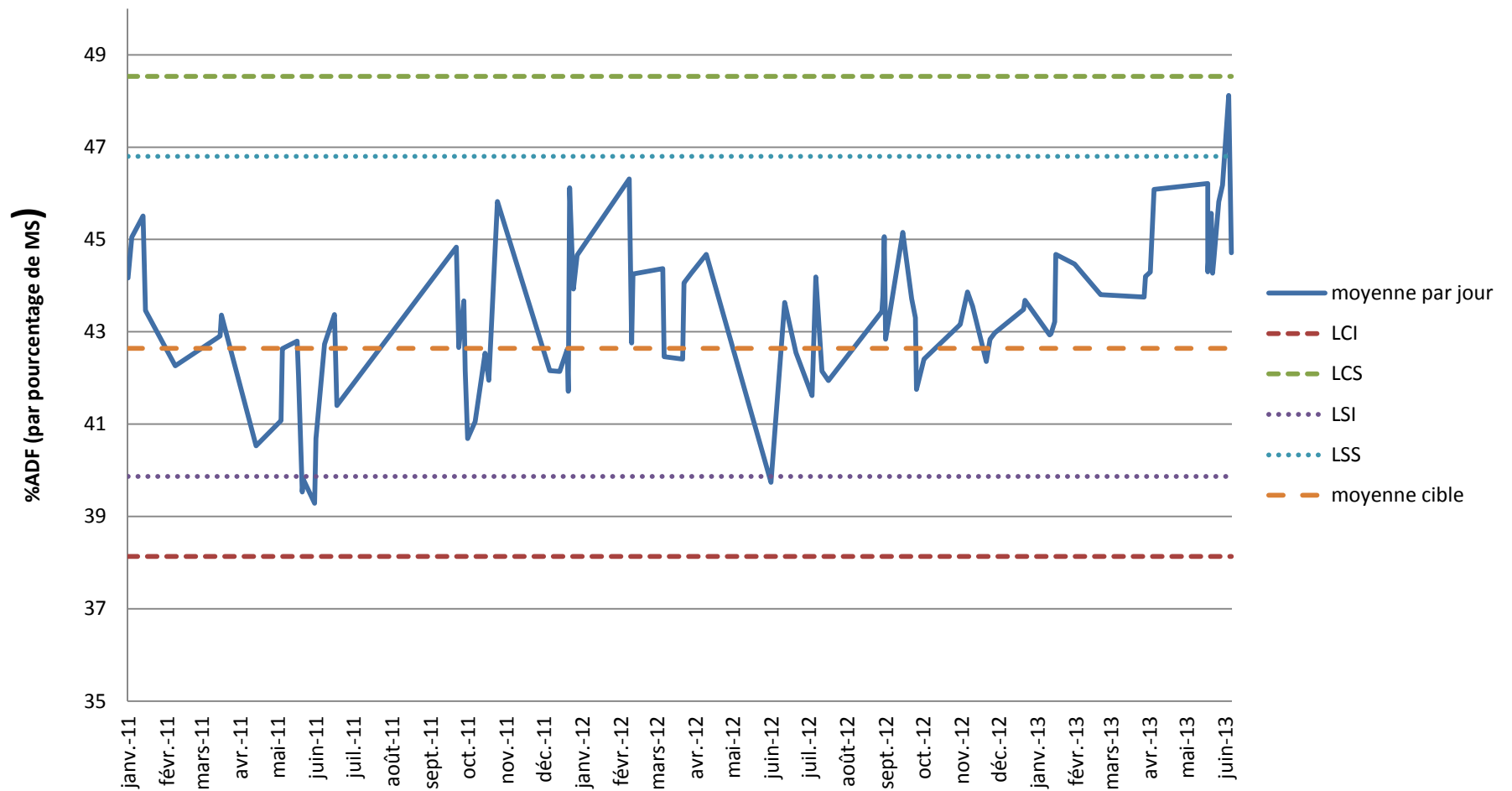




La carte de contrôle en parois végétales (résidu NDF) montre que la teneur en cellulose, hémicelluloses et lignine a connu une légère décroissance entre 2011 et 2013. En effet, la majorité des valeurs se retrouvent en dessous de 70,21 la valeur moyenne cible. Cependant, ces résultats sont très satisfaisants car ils sont tous à l'intérieur des limites de contrôle : Les pourcentages en résidu NDF par % de MS se trouvent tous entre 66,46 et 71,39.



Evolution du résidu ADF du témoin sorgho S3 de 2011 à 2013

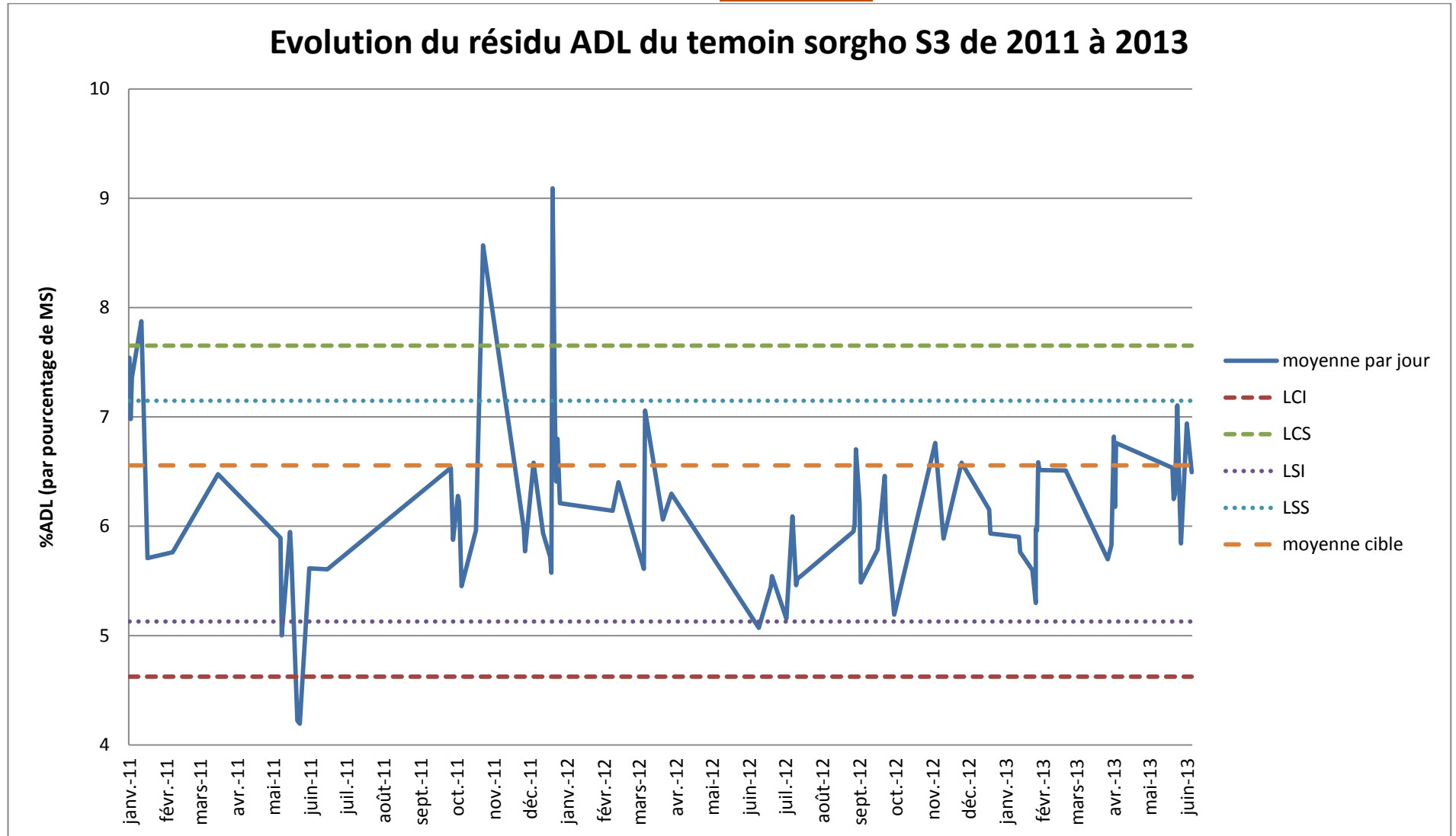




Cette carte de contrôle apporte également entière satisfaction. Les résultats en résidu lignocellulose restent aussi à l'intérieur des limites de contrôle. Même si depuis août 2012 les données sont croissantes, on peut encore accepter le témoin S3 comme étant favorable à la détermination des fibres insolubles au détergent acide.



Evolution du résidu ADL du témoin sorgho S3 de 2011 à 2013





La carte de contrôle révélant l'évolution de la teneur en lignine du témoin sorgho de 2011 à 2013 permet elle aussi d'affirmer que ce témoin est encore valable. Uniquement trois valeurs sortent des limites de contrôle, mais ces dernières ne sont pas successives (juin 2011, octobre 2011, janvier 2012). Le H_2SO_4 étant un acide très fort et très concentrés (72%), j'émet l'hypothèse que ces trois anomalies proviennent d'un problème rencontré lors de l'hydrolyse à l'ADL (temps d'hydrolyse non respecté ou rinçages mal effectués.)

Cependant, dans l'ensemble, la carte de contrôle est approuvée, le témoin sorgho est encore utilisable pour la détermination de la teneur en lignine.

V.2.c) Discussion sur la méthode

Les résultats des hydrolyses varient en fonction de leur nature. En effet, dans l'aliment végétal, on retrouve en moyenne un résidu en parois cellulaires de 70% de la MS, 42% pour le résidu lignocellulose et 7% pour la lignine. La méthode de Van Soest qui est quelque peu longue (elle s'effectue en moyenne sous trois jours) requiert un certain contrôle (durées des hydrolyses et des rinçages à respecter) ainsi que le respect des consignes de sécurité, notamment dans l'utilisation de l'acide sulfurique à 72%. La méthode proposée par Van Soest semble connaître une émergence au niveau international, et ce, parce qu'elle utilise des solutions détergentes qui évitent des extractions qui auraient pu s'effectuer au préalable, mais également par sa possibilité de semi-automatisation.

Les résultats traités grâce aux cartes de contrôle sont entièrement satisfaisants, le témoin S3 est encore utilisable pour la détermination des parois végétales.



V. Conclusion

Le but du stage au laboratoire de L'URZ du centre Antilles-Guyane était d'acquérir des compétences techniques et de contribuer aux projets de recherche de l'INRA. Pour se faire, il m'a été confié la tâche de déterminer la composition en parois végétales et matières minérales des aliments qui composent les rations des animaux d'élevage. C'est ainsi que j'ai utilisé deux principales méthodes d'analyses, la méthode AOAC 923.03 et la méthode de Van Soest. Suivant les modes opératoires de ces méthodes d'analyses, des résultats ont été trouvés, notamment concernant un des témoins utilisés au laboratoire, le sorgho et j'ai dû effectuer des cartes de contrôle dans un souci de suivi qualité des analyses sur le sorgho. Ainsi, Les cartes de contrôle m'ont permis de dégager des pistes quant à la nécessité ou non de changer le témoin car les résultats ont trahi des légères modifications de la nature de ce dernier, modifications qui ont été exposées dans le développement de ce rapport. J'ai noté les résultats de toutes les analyses effectuées dans les cahiers de laboratoire. Cependant, l'aliment végétal a d'autres constituants qui eux aussi, ont leur valeurs nutritionnelles et énergétiques ; les déterminer permettrait d'optimiser les rations des animaux

Le stage au laboratoire de l'URZ m'a apporté de nouvelles connaissances. Tout d'abord, il a été question de travailler en équipe, le travail de recherche nécessitant absolument de concerter ses collègues car toutes les tâches sont étroitement liées, et le partage des résultats est obligatoire pour aboutir à des conclusions. A l'échelle technique, les connaissances n'ont pas été moindres non plus. En effet, les différentes méthodes d'analyse étaient pour la plupart nouvelles pour moi. Ainsi ces quelques semaines passées au laboratoire de l'URZ, bien que n'étant pas directement liée à mon projet d'avenir orienté vers la formulation cosmétique et la pharmacologie, m'ont rapporté beaucoup. J'ai pu, par exemple, découvrir le fonctionnement d'un laboratoire et acquérir diverses notions pratiques sur le métier de chimiste. Ce fut donc une expérience tout à fait enrichissante et entièrement bénéfique pour l'élaboration de mon cursus.



VI. Annexes

Sont joints à cette partie annexe un lexique, les modes opératoires complets des analyses développées dans ce rapport et autres.

VI.I. Lexique

Alicaments : Aliment considéré comme particulièrement bénéfique pour la santé

Gravimétrie : Analyse chimique quantitative effectuée par pesées.

Hygroscopiques. Se dit d'un corps qui a des affinités avec l'eau et favorise la condensation

Anhydre : Qui ne contient pas d'eau.

Thermostatique : Qui sert à maintenir la température dans une enceinte entre des valeurs prescrites.

Pyranose : Un pyranose est un terme désignant les oses dont la structure chimique est composée d'un cycle à 6 atomes : 5 de carbone et un d'oxygène.


Fèces : Matières non absorbables par l'organisme, formées par les résidus de la digestion et excrétées au terme du transit digestif.

Fourrage : Matière végétale constituée par la partie aérienne de certaines plantes, servant d'alimentation aux animaux après avoir été coupée et conservée (foin, ensilage) ou immédiatement après avoir été fauchée (fourrage vert).



IV.2. Modes opératoires

IV.2.1. Mode opératoire pour la détermination des fibres

| | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
|  Centre Antilles-Guyane | Unité : Unité de Recherches Zootechniques Service/équipe : Laboratoire URZ Nature du document : MODE OPERATOIRE | |
| Evaluation des constituants membranaires a partir des techniques <i>Van soestetwine, (1967) FIBERSAC</i> | | |
| Rédigé par : SAMINADIN Georges | Code: E-MO-xx04001 | Nombre de pages : 6 |
| Revu par : SILOU Tatiana et Brigitte CALIF | N° Version : 1 | |
| Validé par : | Emis le : 15/10/98 | |
| Destinataires : tt agent laboratoire | Modifiée le : 23/10/2007 | |

Objet et domaine d'application

Cette technique procède par la succession de trois hydrolyses et l'évaluation du résidu représentatif de la fraction indigestible des aliments.

Technique utilisée pour tous les fourrages et aliments concentrés contenant des constituants membranaires.

Documents de référence

1. VAN SOEST P.J., **1963**. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. of A.O.A.C., 46 (5), p. 825-835.
2. VAN SOEST P.J., WINE R. H. , **1967**. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. J. of A.O.A.C., 50 (1).

Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Tous les agents de laboratoire

Hygiène et sécurité

(Voir fiche de données de sécurité en annexes)

Mettre des gants et un masque pour la préparation des réactifs

Manipulation des réactifs et dosage sous hotte

Ne jamais mettre le chauffage s'il n'y a pas de liquide dans le vase



Toujours ouvrir la vanne de vidange avant d'ouvrir le couvercle du vase de digestion après une hydrolyse.

Principe de la méthode

Les parois végétales sont constituées principalement de polysides et de quantités plus ou moins importantes de protéines et de lignine, constituant non glucidique, mais qui accompagne généralement les polysides de structure (TOLLIER et RIQUET, 1980).

Ces polysides de structure peuvent être divisés en trois catégories : la cellulose, les polysides non cellulosiques ou hémicellulose et les substances pectiques.

La cellulose est l'élément essentiel des parois cellulaires des végétaux supérieurs où elle joue le rôle de substance de soutien. Elle se rencontre rarement à l'état pur mais se trouve associée dans les tissus végétaux avec des substances très diverses telles que lignine, hémicellulose, glucosanes, matières pectiques, matières minérales.

Le terme hémicellulose correspond aux composés glucidiques que l'on rencontre associés à la cellulose. Ils peuvent être divisés en deux groupes : les pentosanes constitués de pentoses et les hexosanes non cellulosiques.

Les substances pectiques, polymères mixtes d'oses et d'acides uroniques, font fonction de ciments intracellulaires.

La lignine, substance non glucidique, de nature aromatique, incruste la cellulose et les hémicellulose de la paroi végétale.

La technique de VAN SOEST est basée sur trois hydrolyses successives. :

- 1- La cellule est gonflée par ébullition avec une solution détergente neutre laurylsulfate de sodium et libère son contenu cellulaire, il n'y reste que l'hémicellulose, la cellulose et la lignine appelées « NDF » Fibre au Détergent Neutre.
- 2- Par ébullition avec une solution sulfurique (H_2SO_4 , N) de bromure de cetyltriméthylammonium, les protéines, les glucides et les hémicelluloses sont solubilisés, permettant ainsi de déterminer l'ensemble : cellulose + lignine encore appelée « Fibre au Détergent Acide » ADF
- 3- A partir de cette Fibre au Détergent Acide la lignine est estimée après solubilisation de la cellulose dans l'acide sulfurique 72 %.

La technique de VAN SOEST est adaptée au FIBERSAC

- 24 sachets contenant chacun environ exactement 0,500 g de fourrage pour un volume de 2000 ml de solution.
- Moins d'échantillons peuvent être traités, mais un minimum de 1,6 Litres de solution est nécessaire dans le vase de digestion, soit 19 sachets maxi.

Matériels nécessaires

- Balance de précision au 1/10 de mg pour la pesée des échantillons.



- Balance de 6000 g pour la préparation des réactifs
- un FIBERSAC, digesteur thermo staté.
- Agitateurs magnétiques
- Eau chaude en grande quantité
- Bouilloire de 1,700 litre
- Thermo soudeuse
- Sac téflon de 25 μ , vide de maille, un par échantillon
- Plaque chauffante
- 02 Béchers à anse de 2000 ml en acier inox
- Densimètres pour $d = 1.634$ et $d = 1.84$
- Thermomètre -10 à +150°C
- pH mètre
- Bécher de 1000 ml, 3000 ml, 5000 ml en verre pyrex épais spécial
- Bécher en plastique de 2000 ml pour la lignine
- Eprouvettes de 100 ml, 250ml
- Plusieurs baguettes en verre de 10 mm de diamètre
- Seau en plastique de 12 litres
- Glace pilée
- Etuve réglée à 103°C
- Essoreuse à salade avec trou d'entrée et de sortie d'eau
- Pissette pour acétone
- Stylo feutre noir résistant aux acides et solvants à chauds pour la numérotation des sachets téflon référence **BIC 1445**.
- Grandes barquettes en alu pour le séchage des sachets à l'étuve.

3. Réactifs (chimiques et biologiques)

Température de préparation de stockage et d'utilisation environ 20-23°C



Préparation pour **8000 ml** de NDS à pH 6.9-7.0

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1 - EAU DISTILLEE | 5000 ml |
| 2 – LAURYL SULFATE DE SODIUM ($C_{12}H_{25}NaO_4S$, 288,38g).120 € / 1000G (2.5g/Ech) 240,0 g | |
| OU SODIUM DODECYLSULFATE($C_{12}H_{25}NaO_4S$, 288,38 g) | |
| 3 – DISSODIUM METHYLENE DIAMINE TETRAACETIQUE (EDTA) cristallisé | |
| OU ACIDE ETHYLENEDIAMINETETRAACETIQUE sel dis sodique($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2, 2H_2O$, 372,24g) | |
| 100€/1000g | 148.88 g |
| 4 – SODIUM BORATE DECAHYDRATE , ($Na_2B_4O_7, 10H_2O$, 381, 37 g)60 € /1000g 54.48 g | |
| OU SODIUM BORATE DECAHYDRATE ANHYDRE, ($Na_2B_4O_7$, 201,22 g)115 € / 1000g 28.72 g | |
| 5 – DISSODIUM HYDROGENE PHOSPHATE , anhydre, (Na_2HPO_4 , 141, 96 g)80 € / 1000g 36.48 g | |
| 6 – 2 - EthoxyETHANOL (ETHYLENE GLYCOL MONOETHYL ETHER), ($C_2H_5O(CH_2)_2OH$ où $CH_3CH_2OCH_2CH_2OH$, 90, 12 g) $C_4H_{10}O_2$ 12 € /1000ml 80, 00 ml | |
| 7 – HYDROXYDE DE SODIUM si pH inférieur à 7 Pas nécessaire avec des réactifs de bonne qualité | |



| | |
|--------------------------------|----------------|
| 8 – EAU DISTILLEE Q S P | 8000 ml |
|--------------------------------|----------------|

Préparation pour **8000 ml** de **ADS1N**

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| 1 - EAU | 5000 ml |
| 2 – CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE (CTAB) 150 € / 1000G (2003) (1,67 g / Ech. | 160g |
| 3 – ACIDE SULFURIQUE PUR (H2SO4) 20 € / 1000 ml | 392g |
| 4 – EAU Q. S. P. | 8000 ml |

Préparation de la solution d'ADL à **d = 1,634** à **20°C** à partir H2SO4 d=1,84 (voir aussi annexe : abaque pour préparation d'ADL à partir d'acide Merck d \cong 1,3)

Mettre de l'eau distillée à congeler pendant au moins deux jours.

Pour une dose d'ADL (380 ml)

- Peser dans un bécher de 2000 ml, 938,21 g d'acide sulfurique pur (d=1,84). *Cet acide pur est conservé en chambre froide à +4°C*
- Dans un autre bécher de 3000ml, peser 303,63 g de glace.
- Mettre le bécher de glace dans un bain thermo staté avec de la glace pilée
- Verser lentement l'acide dans la glace (sous agitation)
- Relever la température qui ne doit jamais excéder les 30°C
- Si après avoir pris la densité à 20°C, la solution mérite un ajustement :
 - Si $d > 1,635$ alors $\Rightarrow [((d-1,634)*1000)*0,0052* \text{volume total du mélange}] *1000 = \text{g H2SO4 à ajouter}$
 - Si $d < 1,633$ alors $\Rightarrow [((1,634-d)*1000)*0,0021* \text{volume total du mélange}] *1000 = \text{g glace à ajouter}$



- Ramener la température du mélange à 20°C puis reprendre la densité

4. Contraintes de la méthode

Echantillons homogènes broyés à **0,75 mm**

Remplissage et pesée des échantillons sans salissure extérieure du sac téflon

Préparation de l'acide sulfurique 72%, d = 1,634 très contraignante

Dosage sur quatre jours minimum

Les échantillons porc sont à peser en double

Les fèces porcs doivent être délipidées obligatoirement

5. Contenu du mode opératoire

Ne pas oublier de créer :

- dans le répertoire FIBERSAC le **sous répertoire** portant le **N° d'Expérience**
- et le **deuxième sous répertoire** portant le **N° de la série** :
- **P 120 avec le premier et le dernier code labo** (P120-A19120-A19142)

Et ce pour toutes les séries.

1. MODE OPERATOIRE pour les fourrages :

Préparation des sachets et des échantillons

- A.** Après séchage des sachets à l'étuve **103°C, 120 mn mini** pré numérotés, avec un feutre fin permanent indélébile aux solvants, (référence **BIC 1445**)
- B.** Peser sur un pré tabulé Excel ayant le logiciel de pesée METLER.
La touche **F2** pour valider le poids.
 - a.** Opérer par série de 24 sachets vides et par pesées simples sans tare; le nom du fichier doit être celui du dernier numéro de la série de 24 sachets ; exemple : n° de sachets de 97 à 120, le fichier s'appellera P 120 VP, VP pour série vide et pleine de 97 à 120.



- C.** Tous les **984 sachets**, on change la lettre qui précède le dernier n° de la série ; soit 41 séries de 24 sachets, on arrive jusqu'à 984 sachets et la lettre change selon l'ordre alphabétique. Ex : après P 984, on passera à Q 24 (1^{ère} série de Q).
- Introduire et peser environ 0,47 g à 0,52 g d'échantillons, directement dans le sachet après tare.
 - Les deux derniers sachets de chaque série sont remplis avec du témoin sorgho S3
 - Puis dans la foulée fermer en soudant les sachets à 3 mm du bord (bord compris) avec la thermo soudeuse HUMEAU en réglant le thermostat sur 5,2 de manière uniforme, polymérisation recto verso en une seule soudure, (toujours respecter le rapport substrat/surface d'échange).
- D.** ! Les sachets doivent rester emprisonnés en permanence dans des sacs plastiques de stockage.

2. Hydrolyse N.D.S. fourrage

A. Etaler uniformément l'échantillon à l'intérieur du sachet pour permettre une meilleure attaque des solutions et une meilleure filtration.

- Placer les **24 sachets** remplis avec échantillon et soudés sur le support plastique en veillant à ce que les sachets ne soient pas superposés mais décalés les uns par rapport aux autres.
- Introduire le support plastique **24 sachets** G dans le vase de digestion S.
- Mettre environ 2.0 litres de solution N.D.S. ou A.D.S. dans le vase de digestion S en ayant vérifié que la vanne F soit fermée.
- Allumer l'appareil avec l'interrupteur D1 ; Le **voyant vert** s'allume.
- Enclencher les 2 boutons Agitation (AGITATE A) et Chauffage (HEAT A), en réglant sur 100°C, attendre la stabilisation à 100°C effectifs, environ 15mn).
- Mettre en route la minuterie manuellement sur 1 heure pour cela :
 - Se placer sur la minuterie en appuyant sur l'un des boutons T1-T2-T3 ou T4
 - La remise à 0 se fait en appuyant sur le bouton C (Clear)



- Appuyer sur le bouton H pour faire avancer les Heures et le bouton M pour les minutes.
- Lorsque la température désirée est atteinte, appuyer sur le bouton START/STOP pour déclencher la minuterie.
- Quand le minuteur atteint « 00 M 00 S », l'alarme se déclenche pendant 1 minute, pour l'éteindre appuyer sur le bouton START/STOP
- Après arrêt de l'alarme, le bouton Marche/Arrêt permet de rappeler le temps pré-réglé de la minuterie.

g. Fermer le couvercle **H** en ayant pris soin d'ajuster le ressort sur le support de sachets.

h. ! Ne pas trop serrer le couvercle pour ne pas endommager le joint.

i. Pendant la digestion, préparer **la bouilloire** de 1.7 litres d'eau distillée.

j. **A la fin de l'hydrolyse.**

Couper l'agitation et le chauffage avec les boutons AGITATE A et HEAT A.

k. Ouvrir lentement la vanne de vidange F et vidanger les solutions avant d'ouvrir le couvercle afin de faire chuter la pression dans le digesteur.

l. Après vidange du vase, ouvrir le couvercle H et rincer les échantillons avec environ 1,7 litres d'eau chaude provenant de la bouilloire. Relevez la température de l'eau de rinçage sur le cahier FIBRES. Refermer le couvercle H et agiter pendant 5 mn.

m. Répéter l'opération 4 fois Rinçages N°1, 2, 3, 4

n. **A la fin de chaque rinçage.**

Couper l'agitation et le chauffage avec les boutons AGITATE A et HEAT A.

Ne jamais laisser le chauffage sans liquide dans le vase

o. Enlever les sachets du support

p. Placer les sachets dans le panier à salade et faire 20 tours sous courant eau chaude.

q. Essorer les sacs en comptant 20 tours pour enlever l'excès d'eau

r. Puis arroser copieusement avec de l'acétone

s. Afin d'accélérer le séchage après dans l'étuve, essorer rapidement à nouveau 30 tours

t. Ranger les sachets dans l'ordre dans une barquette en aluminium

u. Remplir une fiche portant

a. La date et le nom de l'analyse (N.D.F. ou A .D.F),

b. Le n° de la série,

c. Le n° de l'expérience, attribué en donnant les initiales du chercheur, suivies des 2 derniers chiffres de l'année en cours, suivis du n° du protocole HA0001, MB0001...

v. Sécher les sachets à l'étuve à 103°C pendant une nuit.

w. Après l'étuve, les mettre 30 mn dans un dessiccateur pour le refroidissement.

a. Durant ce temps, préparer le fichier comme suit

b. Retourner dans le fichier initial

c. Ajouter après **VP**, (**N** pour une N.D.F.), notre fichier se termine donc par **VPN**.



- d. Ajouter après VPN, (**A** pour une A.D.S.), notre fichier se termine ainsi par **VPNA**
- e. *Ex : après une hydrolyse N.D.F. pour la série P 120 VP, le fichier portera le nom **P 120 VPN**.*
- f. *après une hydrolyse A.D.F. pour la série P 120 **VPN**, le fichier portera le nom **P 120 VPNA***

Pour les échantillons riches en amidon et lipides

1. Elimination des lipides

- Mettre les sachets dans un bécher de **1000 ml** contenant **250 ml** d'acétone.
- Agiter
- Puis retourner les toutes les minutes pendant **5 min**.
- Après les **5 mn** verser le résidu d'acétone dans un flacon de déchet
- Mettre de l'eau chaude dans le bécher.

Les sachets sont ensuite mis dans l'essoreuse (faire **4 tours** maximum).

Répéter l'opération rinçage essorage **4 fois**.

2. Hydrolyse NDF riche en amidon ANKOM 2000

a. Enzymatique avec amylase dans le programme (Cellulose adaptée)

- **75 min** digestion en milieu acide, **remplacée par NDF, couvercle fermé.**
- Placer le panier de sacs dans le Fibersac plus **4 mL Amylase Thermostable.**
Suppression de digestion en milieu basique,
- **3** rinçages de **5 min**, couvercle du vase fermé dont,
 - **2 rinçages en automatique avec ajout de 4mL d'amylase Thermostable par rinçage dans le vase (Le distributeur réservoir de 300 mL sera rempli avec 8mL d'amylase Thermostable QSP 375 mL H2O distillée)**
 - **1 rinçage uniquement avec eau.**

Pas de rinçages basiques

b. Hydrolyse de l'amidon ANKOM 200



- Placer le panier de sacs dans le Fibersac plus **4 mLamylase Thermostable**.
- Effectuer les deux premiers rinçages avec une eau chaude additionnée d'alpha amylase thermostable (4 ml d'alpha amylase pour 2 litres d'eau).
- Le troisième rinçage sera effectué avec de l'eau chaude uniquement.

c. Mode opératoire commun aux deux appareils 2000 et 200

- Les sachets seront essorés (3 ou 4 tours)
- Placer ensuite dans un béccher contenant 250 ml d'acétone (agiter pendant 5 min).
- Jeter l'acétone dans le récipient déchet et mettre les sachets dans l'essoreuse
- Faire 20 tours avec eau chaude directement sous le robinet
- Puis 20 tours sans eau.
- Arroser copieusement avec de l'acétone
- Afin d'accélérer le séchage des sachets, essorer rapidement à nouveau 30 tours
- Ranger les sachets dans une barquette en aluminium remplir une fiche d'identification et placer une nuit dans l'étuve à 103°C.

Hydrolyse A. D. S.

Mode opératoire identique à NDS fourrage

Détermination de la LIGNINE

- x. Mettre pour une série de **24 sachets**, 380 ml d'acide sulfurique à 72% Normalité 24N, $d = 1,634$ à 20°C dans un béccher transparent de 2 litres.
- y. ! Vérifier que la densité est bien de 1,634 à la température obligatoire de 20°C, avant toute manipulation sinon, AJUSTER
- z. Placer les **24 sachets** dans l'acide
- aa. Avec une bouteille de 1,5L remplie d'eau immerger les sachets et les retourner pendant 5 min
- bb. Placer un béccher de 1 L avec 300 ml d'eau dans celui de 2 L pour immerger les sachets dans l'acide.
- cc. Agiter les sachets après 5 mn en agitant le béccher de 1 L de haut en bas, puis, toutes les 20 mn (en tournoyant assez rapidement ce qui entraîne les sachets et force l'acide à pénétrer dans les vides de mailles) durée 3 heures.
- dd. Après les 3 heures, retirer les sachets (le résidu d'acide est versé dans un bidon déchet)
- ee. De l'eau chaude est versée sur les sachets dans le béccher puis les sachets sont renversés dans le panier à salade (opération à répéter 4 fois)
- ff. Les rincer à l'eau chaude sous le robinet pendant environ 1 à 2 mn dans un panier à salade en tournant très lentement. (élimination du surplus d'acide)
- gg. Les sachets sont ensuite rangés dans le portoir du Fibersac



- hh. Les rincer avec de l'eau distillée chaude pendant **3 fois 5 mn** en enclenchant l'agitation. . Relevez la température de l'eau de rinçage sur le cahier FIBRES. Rinçage N° 1, 2, 3
- ii. Puis passer à l'essoreuse pendant 20 tours sous le robinet d'eau chaude.
- jj. Remettre les sachets dans le FIBERSAC pour 2 rinçages supplémentaires avec eau chaude pendant 2 fois 5 mn.
- kk. Enlever les sachets du support.
- ll. Faire 20 tours avec eau chaude directement sous le robinet
- mm. Puis 20 tours sans eau.
- nn. Puis arroser copieusement avec de l'acétone
- oo. Afin d'accélérer le séchage après dans l'étuve, essorer rapidement à nouveau 30 tours
- pp. Ranger les sachets dans une barquette en aluminium remplir une fiche d'identification et placer une nuit dans l'étuve à 103°C.

3. Remplir une fiche portant :

- a. la date et le nom de l'analyse A.D.L.,
- b. le n° de la série,
- c. le n° de l'expérience, attribué en donnant les initiales du chercheur, suivies des 2 derniers chiffres de l'année en cours, suivis du n° du protocole.
- d. Placer le portoir avec les sachets dans la barquette.
- e. Les sécher à l'étuve à 103°C pendant une nuit.
- f. Après l'étuve, les mettre dans un dessiccateur, durée 30 mn.
- g. Durant ce temps, préparer le fichier comme suit :
- h. retourner dans le fichier initial,
- i. ajouter après VPNA la lettre **L**,
- j. *Ex : la série après A.D.F. s'appelant P 120 VPNA, Sera notée P 120 **VPNAL** pour l'A.D.L.*
- k. Procéder à la pesée finale.

4. Calcul

Pour effectuer le calcul, il faut avoir déterminé au préalable la teneur en humidité résiduelle de l'échantillon (MS%)

Les formules utilisées pour la teneur en NDF, ADF, ADL sont les suivantes :

NDF % : $(\text{Poids résidu NDF} - \text{poids sachet vide}) / \text{poids sachet plein} / \text{MS} \times 10\,000$

ADF % : $(\text{Poids résidu ADF} - \text{poids sachet vide}) / \text{poids sachet plein} / \text{MS} \times 10\,000$



ADL % : $(\text{Poids résidu ADL} - \text{poids sachet vide}) / \text{poids sachet plein} / \text{MS} \times 10\,000$

Le pré tabulé Excel utilisé affiche instantanément les valeurs obtenues.

Avant de transmettre les résultats, il faut s'assurer que la moyenne, l'écartype et le coefficient de variation des échantillons témoins S3 est convenable.

(ANNEXE BILAN S3 pour 2004-2005, à répéter pour chaque année).



FIBERSAC 2000

Mise en place de l'appareil

Votre instrument vous est parvenu complet avec :

- un cordon d'alimentation, un tuyau d'évacuation et un portoir pour sachets et son poids.
- placer l'appareil sur une surface solide et à niveau avec une arrivée d'eau et une évacuation.
- Placer l'arrière de l'appareil à plus de 8cm du mur.
- NOTE : Ne pas placer l'appareil à un endroit où il pourrait être soumis à des chocs excessifs, des vibrations, à la poussière, à l'humidité, à l'huile, ou à d'autres fluides.
- Ne pas le placer près de four à micro ondes ou des pièces mécaniques.
- Si des cubitainers sont utilisés, une étagère ou l'étagère cubitainer en option est nécessaire.
- Raccorder le cordon d'alimentation à l'appareil ainsi que dans une prise électrique.
- **Attacher ¼ du tube de cuivre au robinet d'eau chaude (50°C Crudefiber, 80°C ND et AD) ainsi qu'à l'arrivée d'eau au niveau de l'appareil.**
- Connecter le tuyau d'évacuation et s'assurer qu'il ne se détachera pas lorsque le liquide chaud sous pression sera évacué.
- Attacher chaque tuyau de cubitainer aux cubitainers et relier à leur entrée respective.
- La solution remplit le vase de digestion par gravimétrie.
- Le niveau inférieur de la solution doit être au moins à 13 cm de l'entrée.
- Le niveau supérieur de la solution doit se trouver au maximum à 50 cm de chaque entrée sinon la solution s'écoulera à travers le tuyau d'évacuation.

POUR DEMARRER UN CYCLE

1. Remplir le portoir avec les sachets pesés et fermés.
2. Arranger les sachets dans chaque plateau comme indiqué.
3. Installer le plateau du dessus. Ce plateau ne contient pas de sachet et joue le rôle de couvercle. Mettre le poids sur le portoir.
4. Allumer l'appareil. L'écran d'affichage s'allume

NOTE : si vous changez de méthode d'extraction pour une autre, vider le circuit avant de démarrer.

5. Utiliser les flèches up/down pour sélectionner la procédure appropriée.
6. Suivre sur l'écran les suggestions pour chaque détermination.



1. **Cellulose brute**
40 min digestion en milieu acide,

40 min digestion en milieu basique,

2 rinçages acides de 5 min,

3 rinçages basiques de 5 min

2. **ADF :**
60 minutes de digestion,

4 rinçages de 5 min

3. **NDF :**
75 minutes de digestion,

3 rinçages de 5 min

4. **« Flush » :** valves d'évacuation sont ouvertes, les entrées A et B sont ouvertes et l'agitateur tourne.

5. **Cellulose brute adaptée :**

6. **ou NDF Enzymatique avec amylase**

La cellulose brute adaptée

et le « flush » sont les seuls programmes modifiables.

7. **Cellulose brute adaptée**
Digestion acide 1-80 min,

Digestion basique 1-80 min,

1 à 8 rinçages acides de 5 min,

1 à 8 rinçages basiques de 5 min.

8. **NDF Enzymatique avec amylase dans le prog. Cellulose adaptée**
Pour échantillons riches en amidon

- 75 min digestion en milieu acide, **remplacée par NDF amylase, couvercle fermé**

Suppression de digestion en milieu basique,



Ouvrir le vase pour l'ajout de l'amylase manuellement

- 4 rinçages de 5 min, [couvercle du vase mi fermé](#) dont,
 - 3 rinçages avec ajout de 4mL amylase Thermostable dans le vase
 - 1 rinçage uniquement avec eau

Pas de rinçages basiques

Mode opératoire pour tous les programmes

1. Appuyer sur Enter après avoir sélectionné le programme
2. Placer le portoir avec les sachets contenant les échantillons et le poids dans le vase de digestion.
3. NOTE : **Sans cubitainers** :
Si les entrées **A** et **B** ne sont pas utilisées pour approvisionner en solution,

Remplir le vase de digestion jusqu'à ce que le détecteur de niveau soit recouvert avec la solution appropriée.
4. **Avec les cubitainers** :
S'assurer que les tuyaux des cubitainers soient bien reliés.
5. Visser le couvercle, fermer et serrer la manette du vase de digestion. Appuyer sur Enter
6. Vérifier que l'approvisionnement en eau chaude est ouvert et que le tuyau d'évacuation est bien rattaché à l'évacuation.
Appuyer sur START.
7. La solution va s'écouler dans le vase de digestion à travers l'entrée A ou B, en fonction du programme sélectionné.
8. Les digestions et les rinçages se font automatiquement.
9. Le temps restant de process, la température et la pression sont affichés tout au long de l'analyse.
10. Les échantillons peuvent être retirés à la fin du programme lorsque l'affichage « Process Complet » apparaît.
11. Le fait d'appuyer sur STOP à tout moment de l'analyse arrête l'analyse et ouvre l'évacuation pour vidanger la solution.

NDF : Un distributeur est utilisé pour ajouter l'amylase dans le vase de digestion pendant les rinçages :



1 - Rattacher le dispenseur d'amylase sur l'entrée B

2 - Remplir avec 4 ml d'amylase

Remplir le dispenseur avec environ 50mL d'eau pour diluer

3 - Répéter si nécessaire pour le deuxième rinçage

MAINTENANCE

-Après les 10 premières heures d'utilisation, ou si une fuite est observée, regarder à l'arrière de l'appareil le « Maintenance AlertCollector »

Inspecter le « Maintenance AlertCollector ». Si aucun liquide n'est présent dans le collecteur, essayer le résidu du Collector. Ajuster le serrage de l'écrou comme indiqué ci dessous.

Répéter l'opération tous les mois (120h) pour les 3 premiers mois, puis tous les autres mois.

Ajustement du serrage de l'écrou

- Remplir le vase de digestion avec de l'eau jusqu'à ce que le détecteur de niveau soit recouvert. Ne pas insérer de portoir.
- Sélectionner le menu « Flush ». Cela va mettre en marche l'agitateur.
- Lorsque le moteur est en marche, tourner l'écrou vers la droite jusqu'à entendre un changement de son du moteur (le moteur commencera peiner lorsque l'agitateur aura du mal à tourner)
- Desserrer l'écrou légèrement jusqu'à ce que le moteur arrête de peiner
- Eteindre l'appareil et replacer l'arrière de l'appareil la potence du cubitainer (si installé)

Le portoir et l'agitation doivent être vérifiés périodiquement pour une utilisation correcte. Indépendamment du fonctionnement, vérifier tous les trois à six mois si les valeurs de fibres sont plus élevées que la normale ou en contradiction.

Une agitation trop faible entraînera des valeurs plus élevées et une faible répétabilité.

Le portoir doit avoir un espace de 1.25 cm par rapport au bord du vase de digestion. Si l'espace est inférieur à 1.25 cm l'agitateur s'est aplati et un nouvel agitateur est nécessaire.

Placer un morceau de planche droit au dessus du vase de digestion. Mettre en route l'agitation. Le poids ne doit pas toucher le morceau de planche. Si le poids touche le couvercle où se déplace au



dessus du vase de digestion, l'agitateur s'est déplacé et doit être complètement fixé au fond du vase de digestion.

Contrôler que les plateaux ne fondent pas. Ceci est un exemple extrême. Remplacer les plateaux usés ou fondus.

Contrôler le plateau du bas. Il doit être plat. S'il est concave, le portoir touchera le vase de digestion et brûlera.

Prévenir une usure excessive de la pointe, remplacer si elle est usée.

Remplacement d'un fusible

- 1- Utiliser un tournevis pour dévisser la fente du portoir de fusible. Tourner d'un quart de tour dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. Vérifier les deux fusibles.
- 2- Tirer sur le bouchon gris des fusibles et remplacer les fusibles :
 - 120V-15 Amp
 - 220V-10 Amp

Fibre optique du détecteur de niveau

Nettoyer la pointe une fois par mois si l'appareil est utilisé quotidiennement.

Utiliser une serviette en coton imbibée d'alcool pour nettoyer la pointe du détecteur de niveau. La pointe se trouve dans le vase de digestion (page 4).

Système de vidange et stockage

- Si l'appareil ne sera pas utilisé pendant une longue période (plus d'un mois), ou si il y a un changement de méthode pour une autre,
.....
- Rattacher le distributeur d'amylase. Verser 500 ml d'eau chaude dans l'entrée A et aussi à l'entrée B.
- Verser 4L d'eau chaude dans le vase de digestion rincer les parois pendant que l'on verse.
- Si l'instrument doit être stocké, retirer la vitre arrière de l'instrument (page 6) et vérifier le « Maintenance AlertCollector » pour détecter tout signe de fuite. S'il y a une fuite, nettoyer le collecteur et suivre la procédure pour resserrer l'écrou (page 7).
- Pour l'entretien de la vitre extérieure, nettoyer avec un nettoyant pour vitre ou un nettoyant du commerce.
Les résidus acides laissés à l'extérieur risquent d'endommager les composants électriques extérieurs.



PROBLEMES

Problème : L'analyseur de fibres ne s'allume pas.

- Le cordon d'alimentation électrique n'est pas branché à l'appareil ou dans la prise électrique
- Le bouton d'allumage n'est pas allumé
- Un des systèmes de coupe circuit nécessite un reset

Problème : Du réactif se retrouve dans le « Maintenance AlertCollector »

- Une fuite est apparue dans la tige de l'agitateur. L'écrou nécessite une attention particulière. Se référer à la section maintenance de ce manuel pour suivre les instructions.

Problème : L'agitateur ne bouge pas et/ou le bruit du moteur peine

- L'écrou a dû être trop resserré pendant la maintenance périodique. Desserrer l'écrou légèrement jusqu'à ce que le moteur commence à marcher et l'agitateur bouge librement. Si la maintenance périodique n'est pas réalisée et que de la solution acide dans le « packingassembly » la tige va se figer. Si une accumulation corrosive se crée le « packing set » et l'agitateur seront à remplacer.

Problème : La température de l'appareil fluctue ou surchauffe

- Les paramètres de contrôle ont changé. Appeler Ankom pour de l'aide.
- Il y a un manque d'agitation. Peut être dû au fait que le portoir peut être brûlé ou usé ou au mouvement de l'agitateur (page 7)

AFFICHAGE D'ERREUR SUR L'ORDINATEUR



« FillingProblem »-

- Après deux minutes à essayer de remplir, l'Ankom 2000 s'éteint. S'assurer que le flacon de réactif n'est pas vide.
- Si le problème intervient durant un rinçage s'assurer que la vanne d'eau est ouverte. Appuyer sur « Enter » et essayer à nouveau.

« Cold RinseUsed »-

- La température de l'eau de rinçage est inférieure à 50°C. Cela risque d'affecter les résultats de certains échantillons. S'assurer que la température de l'eau est au dessus de 50°C pour la Cellulose Brute, au dessus de 70°C pour la détermination de l'ADF et du NDF. Lorsque cet affichage apparaît, l'appareil continue quand même son analyse.

« Low Pressure Error »-

- L'Ankom 2000 n'a pas atteint un minimum de pression dans les 15 premières minutes d'analyse. S'assurer que le couvercle est solidement fermé. Vérifier le joint du couvercle et le remplacer s'il est endommagé.
- Vérifier s'il y a des fuites dans l'appareil.

« High Pressure Error »-

- La pression interne de l'Ankom2000 a dépassé sa valeur maximum. Voir page 8 pour vérifier le bon fonctionnement du portoir et de l'agitateur et leur état.
- Le vase de digestion est trop rempli avec le réactif.

« VessOvertemp »-

- La température du vase de digestion a dépassé la valeur limite.
- Manque de réactif. Vérifier que la fibre optique envoie les valeurs à l'appareil (voir page 6). La lumière jaune sur l'unité doit être allumée quand le vase de digestion est vide. Ajouter du liquide dans le vase de digestion jusqu'à ce que la pointe du détecteur de niveau soit couverte. La lumière devrait être éteinte. Nettoyer la pointe du détecteur de niveau avec de l'alcool.



« Solution Overtemp »

- La température de la solution a dépassée la limite maximum. Faire un test d'ébullition : remplir le vase de digestion avec de l'eau jusqu'au détecteur de niveau. Démarrer un cycle d'ADF avec le couvercle ouvert. Lorsque l'eau arrive à ébullition, agiter, ensuite comparer la température affichée avec celle d'un thermomètre calibré ($\pm 1.5^{\circ}\text{C}$). Appuyer sur Stop lorsque c'est fait. Contacter Ankom si la température du contrôleur n'est pas de $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ par rapport à la température du thermomètre calibré.

PROBLEMES DE DOSAGE

Pour des problèmes concernant les résultats de vos analyses qui découlent de l'utilisation de l'analyseur de fibres Ankom la première vérification à faire est de s'assurer que les procédures envoyées avec l'appareil sont bien respectées. Quelques paramètres pouvant influencer sur les résultats sont :

Des problèmes généraux

- Les réactifs du ND peuvent se cristalliser. Chauffer et agiter pour avoir une solution homogène.
- La température du four est trop élevée ($102-105 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- Les paramètres du contrôleur ont été modifiés.
- Technique de pesée incorrecte. Voir la technique de pesée dans l'Appendice de ce manuel.
- Usage incorrect ou non utilisation de la poche desséchante. Un dessiccateur normal introduira de l'humidité dans les échantillons lorsqu'il est ouvert et fermé. Cela provoquera une faible précision

Valeurs faibles

- Le broyage est trop fin
- Les sachets ne sont pas complètement soudés
- Un bord de sachet ouvert laisse les fibres s'échapper
- Le temps d'hydrolyse est trop long (ADF et Cellulose brute)

Valeurs élevées

- Le mouvement du portoir est inférieur à 1.25 cm en montant et descendant
- La solution ne chauffe pas suffisamment- faire un test d'ébullition
- ND- Pas d'utilisation d'Alpha Amylase et/ou de sulfite de sodium



- AD/ND- l'échantillon contient trop de lipides (>5%) et n'est pas prétraité par un solvant
- Cellulose brute- toujours



VII. Bibliographie et sitographie

¹<http://institut.inra.fr/>

²[http://www.antilles.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Centre_Antilles_Guyane/implantations/\(key\)/2](http://www.antilles.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/Centre_Antilles_Guyane/implantations/(key)/2)

³[http://www.antilles.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/unites_de_recherche/urz/\(key\)/1](http://www.antilles.inra.fr/Le-centre-Les-recherches/unites_de_recherche/urz/(key)/1)

⁴<http://www.valbiom.be/files/library/Docs/Biopolymeres/leshemicelluloses1323437241.pdf>

Animal feed Science and technologie 168(2011) 206-222, Evaluation of lignin contents in tropical forages using different analytical methods and their correlations with degradation of insoluble fiber.

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (2005) , ANIMAL FEED , chapter 4

Composition et analyse des aliments, D. SAUVANT

Animal feed Science and technologie 55(1995) 295-334, review of the main methods of cell wall estimation : interest and limits for ruminants.

Biotechnol.Agron.Soc.Environ.2011 15(1), 165-182 Revue bibliographique sur les méthodes d'analyse des polysaccharides structuraux des biomasses lignocellulosiques.