INRA
ALIMENTATION
AGRICULTURE
ENVIRONNEMENT

LPO CHARLES COEFFIN

Détermination de la matière azotée et mise au point du dosage des lipides totaux dans l'alimentation animalière

Stagiaire : Maïly MISCHER

Maître de Stage : MARIE-MAGDELEINE CHEVRY Carine

BTS CHIMISTE Années 2012-2014

Sommaire

- **Remerciements 2**
- **Abréviations 3**
- **Introduction 4**
- **Présentation de l'entreprise** 5

Présentation de l'unité de L'URZ et de ses activités.....6

Présentation du laboratoire de L'URZ et de ses activités.....8

- **1. Découverte de l'Entreprise 9**

- **2. Etude globale 10**

2.1 Détermination de la Matière Azotée Totale..... 10
2.1.1 Définition et Intérêt 10
2.1 .2 Matériel et Méthodes.....11
2.1.3 Résultats et Discussion 16

2.2. Dosage des Lipides Totaux 18
2.2.1 Définition et Intérêt.....18
2.2.2 Matériel et Méthode.....21
2.2.2.A Matériels.....21
2.2.2.B Méthodes 22
a) Hydrolyse acide 23
Principe de fonctionnement et mode opératoire de l'appareil ANKOM 23
b) Extraction à l'aide de l' ASE :Accelereted Solvent Extractor 24
Principe de fonctionnement et mode opératoire de l'appareil 24
2.2.3 Calculs et Analyses des résultats 26
a) Calculs.....27
b) Vérification des données 28
2.2.4 Comparaison des méthodes 29
a)Comparaison.....29
b) Précision.....29
2.2.5 Résultats/Discussion 30
A. Validation des données.....30
B. Comparaison des méthodes 32

- **Conclusion, bilan personnel 33**
- **Annexe 1/ Annexe 2/ Annexe 3.....34 à 38**
- **Bibliographie 39**
- **Attestation de stage/ Liste des activités .....40 et 41**

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier MADAME MARIE-MAGDELAINE CHEVRY Carine, ma tutrice et directrice du laboratoire, pour m'avoir reçu dans l'unité de l'URZ (Unité de Recherche Zootechnique). Merci encore pour tous ses enseignements et conseils pour le bon déroulement de ce stage.

En deuxième lieu, je remercie le sous-directeur du laboratoire Monsieur PHILLIPERT Lucien. Merci d'avoir répondu à mes nombreuses questions.

Par ailleurs, je remercie Madame SILOU-ETIENNE Tatiana, qui m'a assistée la plupart du temps pour les différentes expériences réalisées. Merci pour cet accueil et cette aide précieuse.

En troisième lieu, je remercie Madame ALBINA-MONZA Luciana qui s'est bien occupée de moi, dès mon arrivée dans le laboratoire.

Merci à Yohan FELLICITE pour les conseils (et pour son immense et chaleureux bureau).

Une petite pensée pour Marine, Jessie et les deux autres stagiaires, Romuald et Allan.

Je remercie aussi tout le personnel de l'URZ et de la restauration de l'INRA.

Merci aussi à mon professeur encadrant Monsieur MOMIN.

A mon proche entourage qui m'a soutenu, je ne vous oublie pas.

Abréviations

ASE : Accelerated Solvent Extractor
MAT : Matières Azotées Totales
MG : Matières Grasses
MS : Matières Sèches
PTEA : Plateforme Tropical d'Expérimentation sur l'Animal
URZ : Unité de Recherches Zootechniques

Introduction

Je me présente, MISCHER MaÏly, étudiante en BTS CHIMISTE au Lycée Charles Coeffin à Baie-Mahault. Dans le cadre de cette formation j'ai effectué un stage de 8 semaines dans une entreprise. Cette durée de stage fut divisée en deux périodes :

- Une semaine de découverte de l'entreprise (26 au 30 novembre 2012)

- Sept semaines de stage en continu (20 mai au 04 juillet 2013)

Intéressée par le travail en laboratoire de recherche agronomique, le choix de l'entreprise s'est vite porté sur L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA). L'unité de recherches qui m'a accueillie est l'URZ : Unité de Recherches Zootechniques, du centre INRA Antilles-Guyane.

Pour effectuer les différentes expérimentations, les chercheurs ou thésards font appel au laboratoire de l'URZ. Ce laboratoire travaille en étroite collaboration avec les deux unités expérimentales PTEA (l'une sur le site de Duclos à Petit-Bourg et l'autre sur le site de Gardel au Moule) qui effectuent les prélèvements nécessaires aux analyses. Ces analyses ont pour but de caractériser les aliments produits animaux. Les principales composantes qui sont déterminées sont : la matière azotée totale, le taux de matières grasses, les glucides, la matière minérale. Ces données sont importantes pour étudier les besoins des animaux tels que les besoins d'entretien qui sont nécessaires à leur métabolisme de base ou les besoins de production pour améliorer la production et la qualité de la viande.

L'objectif de mon stage était d'une part, de découvrir le mode de fonctionnement d'un laboratoire de recherche et d'autre part, de répondre à la mission proposée lors de la seconde partie du stage qui fut la détermination de la matière azotée totale d'aliments et la mise au point du dosage des lipides totaux dans les aliments.

A. Présentation de l'entreprise

L'INRA est un institut national créé en 1946 qui offre une recherche publique au service des enjeux majeurs de la société. Depuis 1984, L'INRA est un organisme de recherche scientifique publique finalisée, placé sous tutelles du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche.

L'INRA Antilles-Guyane est un établissement Public à caractère Scientifique et Technique (EPST).

Le Centre Antilles-Guyane est l'un des 19 centres de recherche décentralisés de l'institut national. L'INRA Antilles-Guyane compte deux Unités de Recherches et une Unité Mixte de Recherche et en Guyane. De plus, il y a une unité Mixte de Recherche regroupant les dispositifs et en moyens de recherche :

Unité de Recherche Agrosystèmes Tropicaux (UR ASTRO)

Unité De Recherche Zootechnique (URZ)

Unité Mixte De Recherche Sur La Qualité Et La Valorisation Des Plantes Tropicales (UMR QUALITROP)

Unité Mixte De Recherche Ecologie Des Forêts De Guyane (UMR ECOFOG)

Unité Mixte de Recherche Contrôle des Maladies Animales Exotiques et Emergentes (UMR CMAEE)

Deux domaines expérimentaux sont le support et le prolongement des travaux de recherche de tous les secteurs d'activité du Centre :

- Unité Expérimentale de Duclos/ Gardel

- Unité expérimentale plateforme tropicale d'expérimentation sur l'animal (UE PTEA).

Présentation de l'URZ et de ses activités

Les travaux de l'URZ ont pour objectif le développement des systèmes de production techniquement viables valorisant les ressources et végétales locales. Le but est l'acquisition d'une agriculture productive et économe respectant l'environnement. Les trois principales thématiques abordées sont les suivantes :

-l'alimentation animale

-l'adaptation aux contraintes d'élevage

-l'optimisation des systèmes d'élevage

L'essentiel des expérimentations est réalisés sur la Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal (PTEA). Aussi, certaines Thématiques comme l'optimisation des systèmes d'élevage sont transversales et bénéficient de la contribution de tous les chercheurs.

Organigramme de L'URZ

Boval Maryline Directrice

Mandonnet Nathalie Directrice adjointe

Sous-projet 1 **: Adaptation des animaux aux contraintes des systèmes d'élevage tropicaux**

Mandonnet Nathalie** /Bambou Jean-Christophe** :Chercheurs

Renaudeau David** :chercheur/Naves Michel** : ingénieur-chercheur

***Gourdine Jean-Luc :** Ingénieur-chercheur

Gunia Mélanie

Sous-projet 2 : **Evaluation multi critères des ressources végétales**

***Archimède Harry/*Boval Maryline** : Directeurs de Recherche

***Marie-Magdeleine Carine** : Ingénieur- Chercheuse/ ***d'Alexis Séverine** Thésard* **Salah** Nizar Thésards

***Agastin Aurélie** : thésard/ **Cei Willy** : thésard

Sous-projet 3 : **Evaluation Zootechnique, agronomique et environnementale des systèmes d'élevage**

***Alexandre Gisèle/*Mahieu Maurice** : ingénieurs-chercheurs

***Franchone Audrey** : ingénieur chercheur**/*Périacarprin Fred** : technicien

***Cei Willy** : thésard/* **Hiole Abel** : Chercheur associé

Services communs

***Noel-Bevis Marie-josée** : Gestionnaire unité

* **Flainville-Maricel** Maryse : Secrétaire

***Calif Elin** : Documentation

***Romil Nadia** : Documentation

***Tel Luber :** Informatique

***Benoist Christelle** : Secrétariat

Laboratoire d'analyses de l'URZ

Directrice : **Marie-Magdeleine Carine** (ingénieur)

Philippert Lucien : Technicien

Calif Suzitte : Technicienne

Silou Tatiana : Technicienne

Félicité Yohan : Technicien

Albina-Monza Luciana :Technicien

Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal

Duclos et Gardel

B. La période de stage

Dans le cadre de ma formation BTS CHIMISTE, j'ai effectué un stage de 8 semaines : une première période du 26 novembre au 01 décembre 2012 et la deuxième période du 20 mai au 05 juillet 2013. La première période m'a permis de découvrir des activités du laboratoire ainsi que le personnel de l'unité. La deuxième période a été réservée à la réalisation des expériences pour l'étude globale.

1. Découverte du laboratoire de L'URZ et de ses activités :

L'équipe de l'URZ est constitué de 31 agents permanents, administratifs et techniciens, dont 10 scientifiques ou ingénieurs, un professeur d'université associé et 7 thésards et post-doc. Le laboratoire d'analyses de l'URZ compte 6 agents (1 ingénieur et 5 techniciens). Il a pour mission de réaliser des analyses physico-chimiques, biochimiques et biologiques nécessaires à la conduite des expérimentations de l'URZ dans le cadre des recherches.

Le laboratoire de l'URZ travaille en étroite collaboration avec les deux unités expérimentales qui effectuent les prélèvements nécessaires aux analyses. Ces prélèvements sont ensuite référencés et acheminés au laboratoire d'analyses.

Les différents types d'échantillons produits par le laboratoire sont les suivants :

Aliments	- Fourrages (fourrages verts, ensilages, foin) - Concentrés (graines protéagineuses ou oléagineuses) - Racines - Tubercules - Pulpes
Produits animaux	- Sang - Fèces - Urines

Les différentes activités effectuées sont les suivantes :

Valeurs alimentaires	Techniques analytiques	- Spectrométrie infrarouge -Chromatographie en phase gazeuse - Distillation - pH-mètrie - Titrimétrie - Gravimétrie
	Dosages	- Matières minérales - Matières organiques et matières azotées totales - Parois (NDF, ADF, ADL) - Lipides - Protéines - Amidon
Parasitologie	Immunologie	Test ELISA
	Bilans sanguins	-Hématocrite -Eosinophilie
	Diagnostics parasitaires	- Croscopie - Coproculture

Lors de cette première période de stage, j'ai participé aux différentes activités du laboratoire en prêtant main forte aux différents techniciens. Le déroulement général d'une journée fut le suivant : le matin (ou la veille préparation des échantillons pour lancer la manipulation de la journée. L'après-midi, rangement du matériel et analyse des résultats obtenus.

2. Etude globale

La seconde partie du stage a été consacrée plus spécifiquement à deux missions : déterminer la teneur en matière azotée totale d'échantillons d'aliments et la mise au point du dosage des lipides totaux dans les aliments.

2.1. Détermination de la teneur en matière azotée totale

2.1.1. Définition et intérêt

La matière azotée fait partie des composants de l'aliment. La composition chimique d'un aliment est présentée sur le schéma ci-après (schéma 1) :

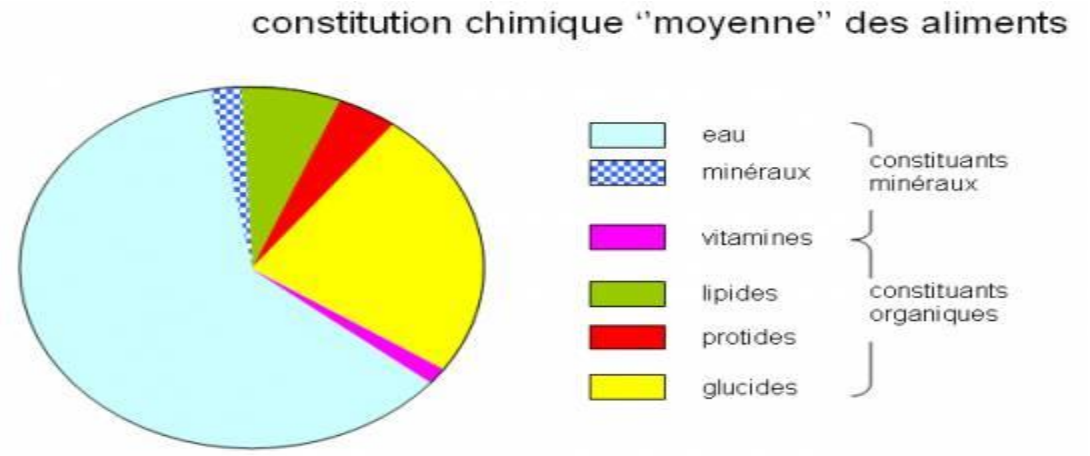


Schéma 1. Composition chimique des aliments

Les protides (acides aminés, polypeptides et protéines) et les matières azotées non protidiques ou non protéiques (amides, urée) sont des composants organiques. On s'occupera des protides.
Les protides ou protéines sont des macromolécules organiques (atomes C, H, O et N) constituées par une chaîne d'acides aminés liés par des liaisons peptidiques (schéma 2). Elles sont des constituants essentiels de la matière vivante végétale. Elles assurent de nombreuses fonctions, notamment celle de nutriment alimentaire pour l'animal.

Les chercheurs de l'URZ mesurent la teneur en MAT des aliments et produits animaux, afin de d'étudier la valeur azotée des aliments et les besoins alimentaires azotés des animaux.

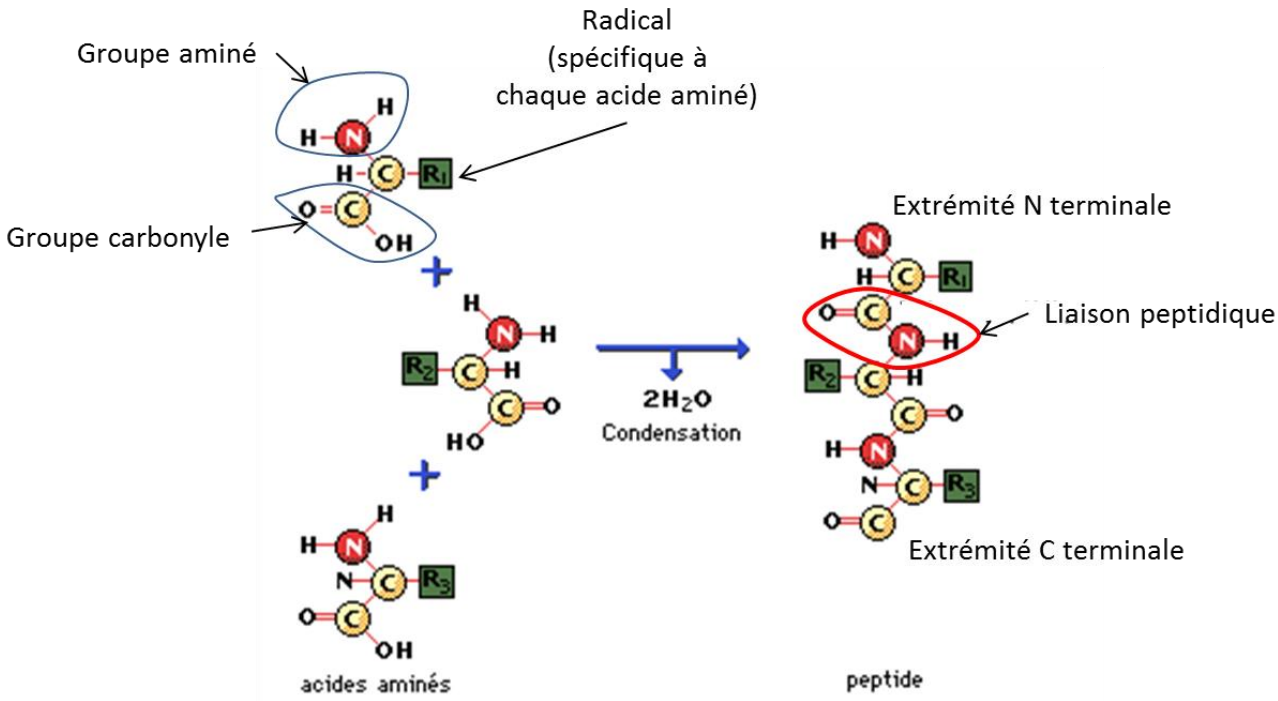


Schéma 2. Structure générique d'un acide aminé et d'un peptide

2.1.2. Matériels et méthodes

a) Matériels

Echantillons

Les échantillons suivants ont été dosés :

Fourrages (proposé et refus foin)

Aliments végétaux non conventionnels : feuilles de pois d'angole, de leucaena, de manioc, canne à sucre.

Aliments concentrés contenant de l'amidon, tels que de la banane Urines

Appareil

La détermination de la teneur en protéines au laboratoire de l'URZ est réalisée en utilisant l'analyseur Rapid NCube de la marque Elementar (Figure 1).



Figure 1. Analyseur Rapid N Cube Elementar.

b) Méthodes

Pour doser le taux de protéines, l'appareil utilise l'un des principes de la méthode de DUMAS.

Principe de la méthode de DUMAS :

Le principe de la méthode de DUMAS repose sur la combustion de l'échantillon dans un four à haute température et un milieu riche en oxygène. Les gaz issus de la combustion sont alors séparés, piégés chimiquement et purifiés. Les oxydes d'azote No_x sont réduits en diazote N_2 sur du tungstène métallique et le flux gazeux azoté est dirigé vers le détecteur. Dans le cas de l'appareil Rapid Ncube il s'agit d'un détecteur thermo-conductif.

Principe de fonctionnement de l'appareil Rapid Ncube et mode opératoire (schéma 3) :

L'échantillon préalablement pesé conditionné en capsule d'étain (après pression pour les échantillons solides et injection d'un flux de CO_2 pour les échantillons liquides) est positionné sur le plateau de l'appareil sur une position donnée. La masse de l'échantillon ainsi que sa position, son nom et la méthode employée sont entrés sur le tableau de bord du logiciel. L'analyse peut alors commencer.

L'analyseur effectue ensuite une remise à zéro de sa ligne de base. Pour cela, il mesure la valeur absolue du signal et vérifie l'absence d'oscillation. Il réajuste alors la valeur de l'offset pour ramener le signal à zéro.

Les pressions chutent, l'orifice d'injection s'ouvre. Le plateau tourne jusqu'à la position 1 et le premier échantillon est introduit dans le sas du four à combustion, c'est l'étape d'oxydation. L'échantillon est introduit dans un milieu pauvre en O_2. Grâce à cela, la température de l'échantillon augmente rapidement. Lorsque cette température est stable, la vanne injecte de l'O_2, par la suite l'échantillon s'enflamme et s'oxyde. La quantité d'oxygène est adaptée selon l'échantillon que l'on veut analyser.

Les gaz de combustion sont ensuite séparés. En effet, le détecteur thermo-conductif ne pouvant différencier les gaz qui le traversent, tout gaz traversant le détecteur, autre que celui de référence (le CO_2) provoque une variation de conductivité thermique. Dans notre cas, on doit mesurer l'azote uniquement, les autres composés gazeux doivent donc être éliminés. La séparation chimique des gaz implique de nombreuses réactions d'oxydo-réduction :
Les halogènes sont piégés sur de la laine d'argent située dans le tube post combustion et dans le tube de réduction. La vapeur d'eau est piégée dans les deux tubes de desséchants successifs. Les gaz sulfureux sont piégés au contact avec le tungstène métallique dans le tube de réduction. Les NOx sont réduits au contact du tungstène métallique dans le tube de réduction.

La réaction qui réduit les NOx au contact du tungstène en N_2 suit l'équation suivante :
$W+2NO_x \longrightarrow N_2+WO_{2x}$

Remarque : des interférences peuvent se produire dans le tube à réduction. En effet, le CO_2 peut être réduit en CO au contact du tungstène (mais en très faible quantité). Pour pallier cette réduction, de l'oxyde de cuivre CuO est positionné en sortie du tube de réduction afin de ré-oxyder le CO en CO_2.

Par la suite, l'azote (N_2) est détecté. Le détecteur thermo-conductif fonctionne sur le principe d'une différence de conductivité thermique entre deux flux gazeux. Dans une première chambre s'écoule le flux gazeux de référence (CO2). Dans la seconde ; d'écoule le mélange gazeux CO_2+N_2. La différence de conductivité entre les deux gaz est alors intégrée et quantifiée, déterminant la quantité de protéines.

Après mesure, les cendres des échantillons sont recueillies dans des collecteurs (collecteur de cendre en céramique, en quartz ou en acier réutilisable selon la nature des échantillons).

*Important : calculer le daily factor à partir des étalons standards :
Il est recommandé d'analyser régulièrement des étalons en tant que contrôle et des étalons en tant que « Daily factor ». Le daily factor est un facteur de correction. Il a pour fonction d'adapter la réponse du détecteur par rapport à la courbe d'étalonnage. Pour le calculer, analyser trois échantillons d'acides aspartiques en tant que « factor sample » avec une prise d'essai de 250 mg des étalons standards (comme le précise le manuel d'utilisation de l'appareil de mesure).

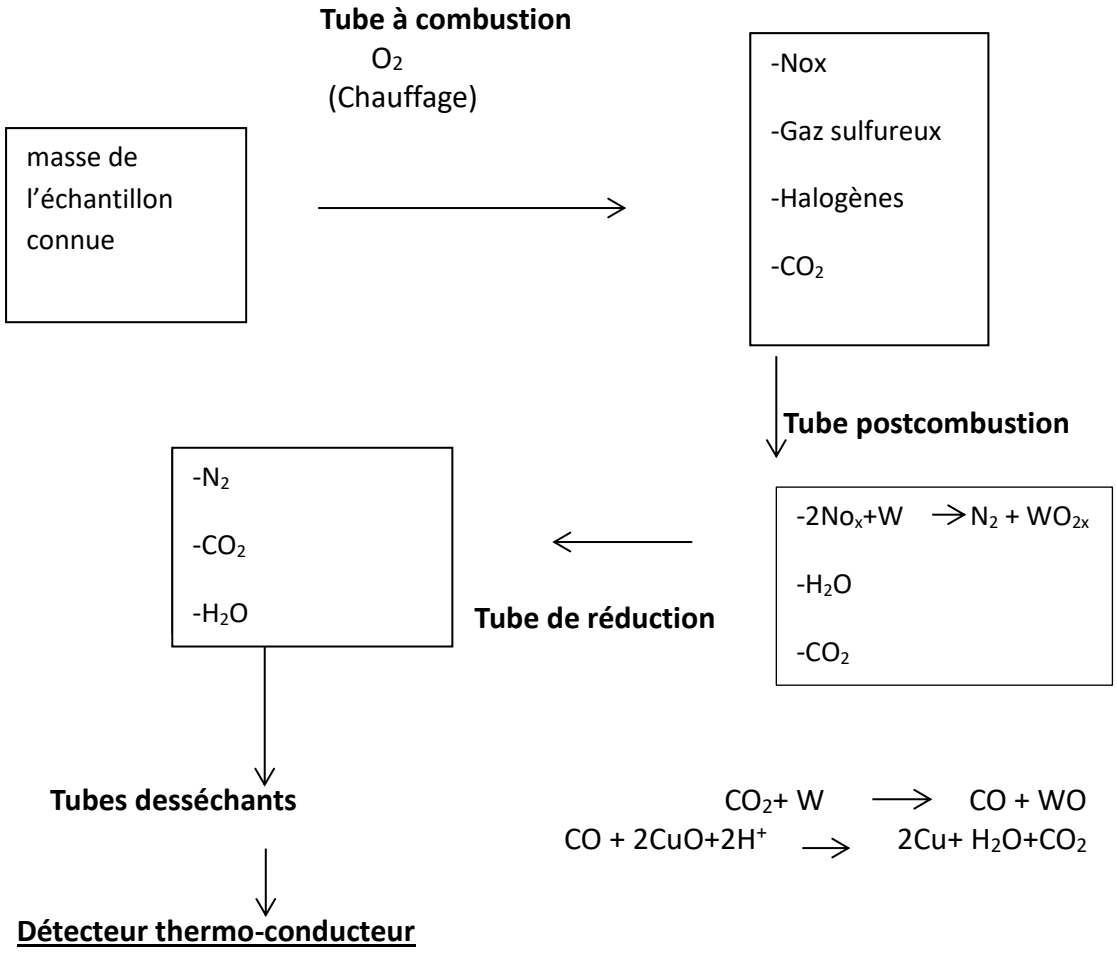


Schéma 3. Process de l'analyse de l'azote protéique par la méthode de DUMAS par l'appareil Rapid NCube.

c) Calculs

L'analyseur donne la teneur globale en azote mesurée pour l'échantillon. Cependant, c'est la teneur en matière azotée totale (MAT) protéique (exprimée en % de matière sèche), qui doit être délivrée au chercheur. Après la détermination du pourcentage d'azote avec l'appareil de mesure, on calcule donc le pourcentage de matière azotée protides. Le calcul de la teneur en protéines brutes se fait par multiplication de la teneur en azote trouvée par un facteur de conversion (qui correspond à l'inverse de la teneur en azote dans la protéine, tableau 1).

Comme la teneur en azote est variable (15 à 18% en fonction des acides aminés présents et de leurs proportions), un facteur de conversion différent devrait être utilisé pour chaque sorte de protéine.
Toutefois, lorsque la nature exacte de la protéine n'est pas connue ou si l'on a affaire à une denrée alimentaire contenant plusieurs sortes de protéines, on adopte le facteur conventionnel de 6,25 (correspondant à un taux moyen d'azote de 16 %).

Dans tous les cas, il faut indiquer dans le rapport d'analyse le facteur utilisé pour le calcul.

La formule utilisée est donc la suivante dans notre cas:

%protéines ou % MAT =%N*6,25

NB : Les valeurs obtenues sont validées en vérifiant que la moyenne, et le coefficient de variation du témoin T22-0.5-Pg (il s'agit du fourrage type Pangola), introduit dans la série d'analyse, sont cohérents.

Tableau 1. Exemples de facteurs de conversion conventionnels pour la détermination de la teneur en protéines ou MAT.

Aliments	**Facteurs conventionnels**
Albumine du lait (lait et produits laitiers)	6,38
Gélatine	5,55
Céréales (blé)	5,70
Graines oléagineuses	5,30
Protéines de viandes	6,25
Œufs	6,25
Légumineuses, denrées complexes	6,25

*Les résultats finaux sont exprimés en % de matière sèche de l'échantillon, pour cela les échantillons pesés sont passés à l'étuve à 103°C durant une nuit puis pesés à nouveau.

%Matière Sèche = poids sec de l'échantillon/poids brut de l'échantillon

Le résultat final sera exprimé par :
% MAT sec = %MAT brut/%MS*100

2.1.3. Résultats et discussion

Les résultats obtenus suite au traitement des données issues de l'analyseur, à l'aide du logiciel Excel sont présentés dans le Tableau 2 suivant :

Tableau 2 : résultats de l'analyse pour la détermination du % de MAT

Numéro de l'échantillon	Facteur	% N en masse	% protéines en masse	masse (en g) échantillon
1	6 ,25	2,79	17,44	102,2
2	6,25	2,81	17,56	151,2
3	6,25	2,86	17,89	152,2
4	6,25	2,76	17,24	101,1
5	6,25	2,95	18,42	100,9
6	6,25	2,94	18,37	100,6
7	6,25	3,01	18,81	101,7
8	6,25	2,93	18,29	100,6

Résultats statistiques pour le témoin T22-0.5-Pg :

MOYENNE : m= $\frac{\Sigma\ (\%\ prot\acute{e}ines}{8}$= 18,00%

VARIANCE : V= $\frac{\Sigma(\%prot\acute{e}ines^2 - moyenne^2)}{8}$=5,25%

ECART-TYPE : σ=$\sqrt{V}$ = 0,5571%

COEFFICIENT DE VARIATION : CF= $\frac{\acute{e}cart-type}{moyenne}$*100=3,082%

COMMENTAIRES : on remarque que le coefficient de variation du témoin est faible (inférieur à 10%). On en déduit que les résultats sont cohérents.

2.2 Mise au point du dosage des lipides totaux

2.2.1 Définition/Intérêt

Un lipide est un composé organique dont la molécule comprend un alcool et d'un radical d'acide gras unis par estérification (schéma 4). Les lipides non gras font parties aussi de la grande famille des lipides.

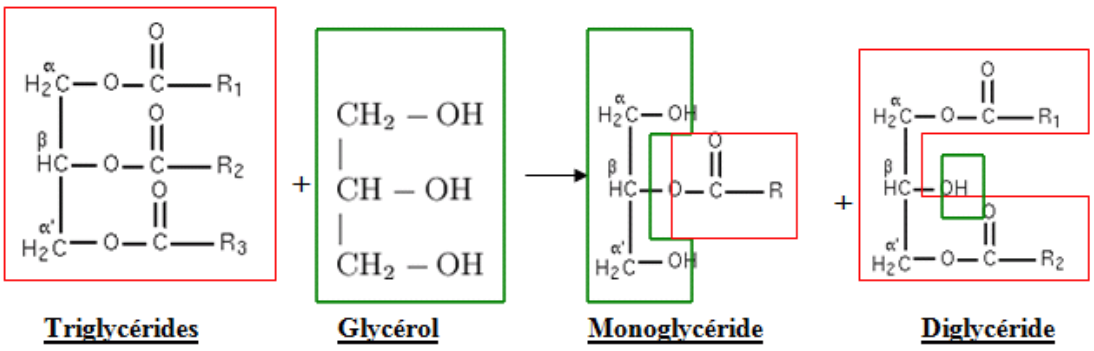


Schéma 4. Exemple de l'estérification d'un lipide

Les lipides sont insolubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques (éther, alcool, benzène, etc.) et ont un caractère graisseux. Leur métabolisme est complexe. La réaction d'estérification est réversible. Les lipides (matières grasses) sont aussi utilisés comme sources énergétiques quand ils sont abondants dans l'aliment. Par contre, quand l'animal ne dispose pas suffisamment de nutriments énergétiques dans son alimentation, il mobilise les lipides et les protéines des réserves corporelles comme des sources d'énergie, d'où un amaigrissement et une forte baisse de la masse musculaire.

A l'URZ, les chercheurs déterminent la teneur en matières grasses des aliments et produits animaux afin de déterminer la valeur alimentaire pour l'animal, et aussi la qualité de la viande.

Problématique et but de l'étude

La quantité de lipides totaux trouvée dans une denrée diffère selon le procédé utilisé. Ce dosage est le plus généralement effectué soit :

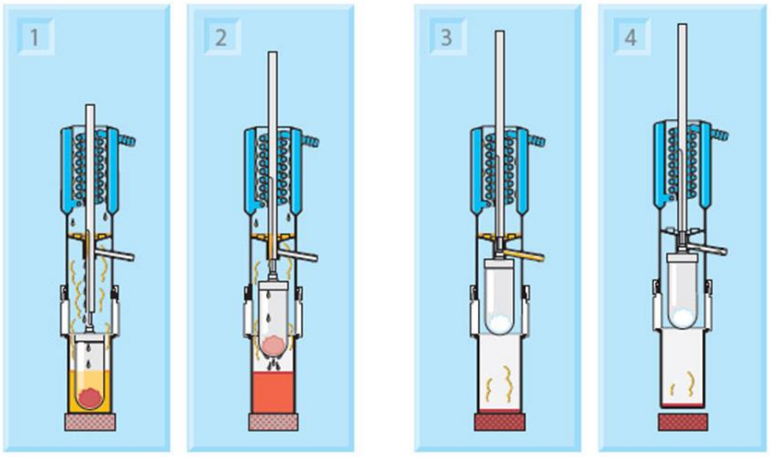
-Par extraction directe à l'éther (ou éther de pétrole) par malaxage (produits solides) en ampoule à décanter, (liquides) ou en continu (soxhlet, Schéma 5), après évaporation du solvant d'extraction ; le résidu est séché et pesé.
D'autres solvants d'extraction peuvent être utilisés directement ou après séchage de l'échantillon à l'étuve ou sur sulfate de sodium (par hexane ou mélanges éthanol-benzène, dioxane-éther de pétrole..). Cette extraction n'est pas totale lorsque des lipides sont retenus mécaniquement (par les parois cellulaires) ou par absorption ou liés chimiquement d'autres composés (protéines) dans ce cas, une désagrégation est nécessaire avant l'extraction.

-ou par extraction après désagrégation au moyen d'acide chlorhydrique 25% (méthode Internationale).
La désagrégation par l'acide à chaud casse toutes les liaisons des lipides avec les autres constituants, après quoi les lipides sont séparés du mélange par filtration et extraits au soxhlet au moyen d'éther de pétrole par exemple.

Au départ le laboratoire de l'URZ utilisait la méthode du Soxtec (schéma 5) pour extraire les lipides totaux avec l'éther de pétrole comme solvant.

Mais cette méthode ne permet d'obtenir que les lipides libres de l'aliment, il s'agit d'une extraction directe.
Le laboratoire souhaite améliorer sa technique et doser les lipides totaux, en procédant à la désagrégation, servant à libérer les lipides complexes, avant extraction.
Un nouvel appareil, l'unité d'hydrolyse, a donc été acquis au laboratoire pour réaliser l'hydrolyse acide à chaud préalable à l'extraction. L'extraction des lipides se fera ensuite par solvant sous pression.

L'objet du stage est donc de travailler à la mise au point de cette nouvelle méthode.



1: Ebullition (solubilisation rapide dans le solvant en ébullition)
2: Rinçage (lavage pour épuiser les matières solubles restantes)
3: Renouvellement (régénération automatique de solvant distillé pour réutilisation)
4: coupure automatique (le système ferme les vannes et les nacelles sont soulevées au dessus de la plaque chauffante

Schéma 5. Principe du Soxtec (extraction au soxhlet)

2.2.2 Matériels et Méthodes

2.2.2. A. Matériels

Echantillons

Pour la mise au point de la méthode de dosage des matières grasses totales, l'échantillon utilisé est un composé concentré de maïs industriel (dénommé : TE 906 C) en réalisant 6 à 8 répétitions de la mesure.

Afin de passer à l'étape d'extraction sur l'ASE, un agent inerte dispersant est utilisé : la terre de diatomée.

Appareils

- L'appareil utilisé au laboratoire afin de réaliser l'hydrolyse acide pré- extraction est l'unité d'hydrolyse : « **ANKOM HYDROLYSIS SYSTEM »** (Figure 2.)



Unité d'hydrolyse



Etuve



Sachets à échantillons

Figure 2. Equipement **ANKOM HYDROLYSIS SYSTEM** Unité d'hydrolyse et ses accessoires (Etuve et sachets à échantillons)

- L'équipement utilisé pour l'extraction des matières grasses totales est l'automate Accelerated Solvent Extractor (ASE), de la marque DIONEX (Figure 3.).



Figure 3. Extracteur à solvants sous pression Accelareated Solvent Extractor, DIONEX (ASE), avec ses accessoires (bouteilles de solvants, bouteilles de récolte, cellules contenant les échantillons)

2.2.2. B Méthodes

Les échantillons sont pesés au préalable dans les sachets en téflon identifiés :
1g d'échantillon plus 0,5g de terre de diatomée sont introduits dans le sachet, qui est ensuite scellé à l'aide d'un soude sac.

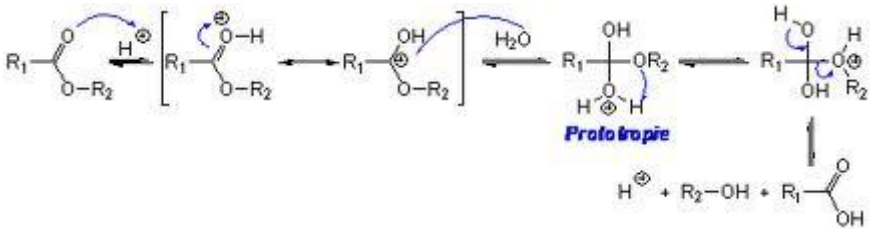
a) Hydrolyse acide

Le principe est de chauffer l'échantillon en présence d'acide chlorhydrique. Ce chauffage provoque la rupture des liaisons des lipides complexes, et permet leur libération.

La réaction chimique qui se produit lors de l'hydrolyse suit l'équation :

Ester + eau acidifiée=> acide carboxylique + alcool

Le mécanisme de la réaction d'hydrolyse est le suivant :



<u>Mode opératoire de l'hydrolyse par l'appareil ANKOM HYDROLYSIS SYSTEM</u>

Les échantillons pesés en sachets de téflon, sont plongés dans un bain d'acide chlorhydrique (500 mL à 3 mol/L), puis soumis à l'hydrolyse (60 min à 90°C).

Un rinçage est ensuite lancé (le temps de rinçage varie entre 20 et 30 min).

Après rinçage, les sachets sont retirés de l'unité d'hydrolyse et mis à sécher dans l'étuve (à 100°C pendant 2-3h), après quoi les sachets sont placés dans un sachet dessiccateur avec du papier indicateur pH (pour vérifier la neutralité). Les échantillons sont ensuite pesés.

b) Extraction des matières grasses par Accelereted Solvent Extractor

Deux méthodes d'extraction ont été testées :

- L'extraction à l'éther de pétrole

- L'extraction avec un mélange d'hexane et d'isopropanol 3:2 (v/v) (mélange préconisé par le fabriquant de l'ASE)

La méthode éther de pétrole est réalisée avec et sans hydrolyse. Deux modes de mesure ont ensuite été évalués : la mesure des matières grasses au niveau des tubes contenant le produit extrait et la mesure au niveau des sachets contenant l'échantillon hydrolysé.

L'hydrolyse effectuée, les sachets séchés à l'étuve sont pesés et soumis à une extraction par l'Accelerated Solvant Extractor (ASE).

Principe de fonctionnement de l'appareil Accelerated Solvent Extractor, et mode opératoire

L'ASE est un automate qui permet d'extraire des composés organiques présents dans des échantillons. Il utilise l'effet combiné d'une température élevée et de la pression (soit supérieure à la pression atmosphérique) pour permettre à l'utilisateur d'isoler les composés d'intérêt, tout en conservant l'intégrité de l'échantillon (schéma 6.).

L'ASE réduit la consommation de solvant et augmente la vitesse d'extraction pendant le traitement des échantillons.

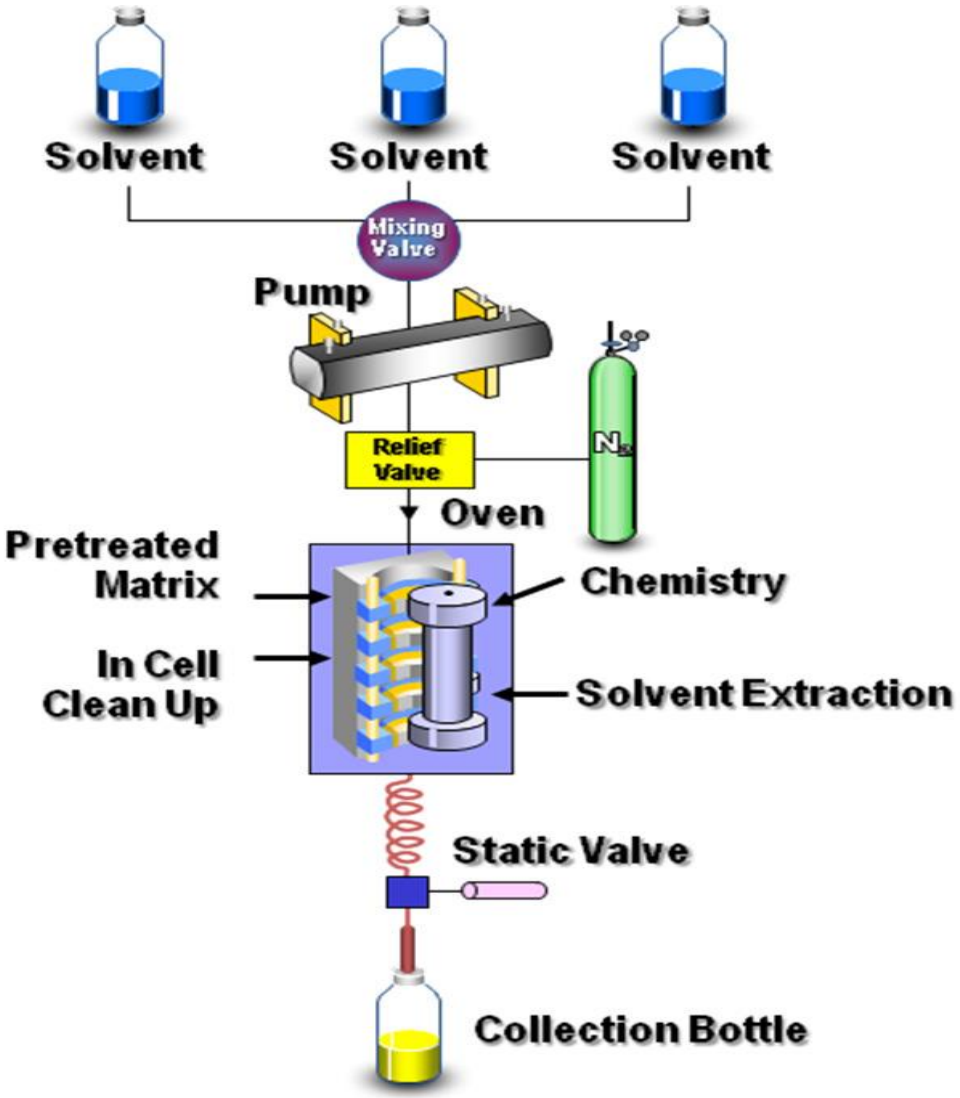


Schéma 6. Principe de fonctionnement de l'ASE.

Le mode opératoire a été le suivant :

Les échantillons hydrolysés sont placés dans les cellules d'extraction de l'ASE (type SST capacité 22 mL) munies d'un filtre, puis la cellule est comblée par de la terre de diatomée. Les cellules remplies sont ensuite placées dans le carousselle.

Selon le solvant utilisé, différentes méthodes d'extraction sont appliquées.

Les méthodes d'extraction utilisées sont résumées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Méthode d'extraction utilisée pour chaque solvant

Solvant	Ether de pétrole	Mélange hexane-isopropanol
N°méthode (dans programmation)	4	4
T°C d'extraction	100°C	130°C
Temps de préchauffage	5 min	7 min
Durée de statique	10 min	3 min
Nbre de cycles	3	5
Rinse volume (volume de purge)	30%	50%
Temps de purge	30 min	60 s
Type de cellule	SST	SST
Taille de cellule	22 mL	22 mL

Suite à l'extraction, les extraits de lipides (dissouts dans les solvants) sont récupérés en flacons dans l'ASE. En fin d'extraction, le solvant est évaporé avant pesée de la matière grasse.

Suite à une panne de l'évaporateur, j'ai finalement utilisé une étuve à 100°C pour éliminer les traces de solvants avant pesée.

2.2.3. Calculs et Analyse des résultats

Les résultats ont été traités avec le logiciel EXCEL. Après calculs, les données ont été vérifiées, puis les méthodes comparées. Les deux dernières étapes ont été réalisées en utilisant des tests statistiques, avec le **risque d'erreur α=5%** (donc avec la probabilité de ne pas se tromper, ou niveau de confiance : **P= 1-α =95%**).

a) Calculs

- formule pour l'obtention du taux de matières grasses à partir des tubes :

% MG BRUTES= ((masse tubes plein-masse tubes vides)/masse échantillon)*100

La masse des lipides obtenus est donnée par la relation suivante :

masse lipides= masse tubes plein-masse tubes vides

L'échantillon séché contient un taux d'humidité résiduelle. Le pourcentage obtenu précédemment est calculé en fonction de la masse totale de l'échantillon, eau comprise.

Pour exprimer le pourcentage de matières grasses sèches, il faut mesurer le pourcentage de matières sèches contenues dans l'aliment (cf partie 2.1.2. c).

Par la suite, on calcule le pourcentage de matières grasses sèches obtenues par la formule suivante :

%MG SEC= (%MG brutes / %MS échantillon)*100

-formule pour l'obtention le taux de matières grasses à partir des sachets hydrolysés :

On applique la formule donnée par le fabriquant de l'appareil à hydrolyse qui est la suivante :

%MG BRUTES = (100*(W2-(W3+ (C1-C2))))/W1

W1: masse échantillon initial

W2: masse échantillon, sachet et terre diatomée après hydrolyse/séchage

W3 : masse échantillon, sachet et terre diatomée après extraction

C1 : masse sachet avec terre diatomée après hydrolyse/séchage

C2 : masse sachet avec terre diatomée après extraction

C1-C2 : représente la différence de lipides perdus lors des deux manipulations

W2-(W3+ (C1-C2)) : représente la différence de lipides obtenus lors de la manipulation

On obtient un résultat brut auquel on applique également le pourcentage de matière sèche de l'échantillon au calcul, afin d'obtenir le résultat en % MS

b) Vérification des données

Après l'obtention des résultats, on calcule la moyenne.

La vérification consiste à repérer s'il y a des valeurs aberrantes dans les séries de calculs.
Pour cela nous avons utilisé le **test de Dixon**.
Après avoir ordonné les valeurs par ordre croissant, on applique le test à la valeur douteuse (selon le cas, la plus faible ou la plus élevée), on compare alors l'écart entre cette valeur et la valeur la plus proche, à l'écart entre les valeurs extrêmes.
L'échantillon statistique comprend n valeurs ordonnées : x1, x2, ..., xn
Le test permet alors de tester si la première valeur x1 ou la dernière valeur xn est aberrante.
Pour ce faire, suivant le nombre d'observations, on calcule les rapports suivants :

3 ≤n ≤7	r10 = $\frac{(Y2-Y1)}{(Yn-Y1)}$	r10 = $\frac{(Yn-Y(n-1))}{(Yn-Y1)}$
8 ≤n ≤10	r11 = $\frac{(Y2-Y1)}{(Y(n-1)-Y1)}$	r11 = $\frac{(Yn-Y(n-1))}{(Yn-Y2)}$
11 ≤n ≤13	r21 = $\frac{(Y3-Y1)}{(Y(n-1)-Y1)}$	r21 =$\frac{(Yn-Y(n-2))}{(Yn-Y2)}$
14 ≤n ≤30	r22 = $\frac{(Y3-Y1)}{(Y(n-2)-Y1)}$	r22 = $\frac{(Yn-Y(n-2))}{(Yn-Y3)}$

On entre alors dans la table de Dixon qui donne les valeurs critiques Q de ces rapports au niveau de risque 10 %, 5 % et 1 %. Nous choisissons 5%.
La règle à adopter est la suivante : si la valeur du rapport est inférieure à la valeur critique Q, il n'est pas justifié, au risque donné (pour nous 5%), d'éliminer l'observation.
Si l'observation est éliminée, alors le calcul de la moyenne est refait et c'est ce résultat qui sera transmis au chercheur.

2.2.4. Comparaison des méthodes

Il s'agit là de comparer les méthodes de dosage en tube et en sachets et de déterminer laquelle est la plus précise. Pour cela nous utiliserons les données de la méthode d'extraction dans le système hexane-isopropanol.

a) Comparaison

Afin de comparer les méthodes, nous allons **tester l'égalité les variances** (s^2) des données.

Le test consiste à calculer l'intervalle de confiance du rapport des variances, avec un niveau de confiance global ne dépassant pas $P=1-\alpha=1-5\%=95\%$.

$$\frac{1}{F(1-\frac{\alpha}{2}, \nu_2, \nu_1)} \frac{s_2^2}{s_1^2} < \frac{\sigma_2^2}{\sigma_1^2} < F(1-\frac{\alpha}{2}, \nu_1, \nu_2) \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

$F(1-\alpha/2, \nu_1,\nu_2)$ est lue dans la table de Fisher-Snedecor (voir annexes). ν_1 et ν_2 sont les degrés de liberté des valeurs n mesurées dans chaque série : $\nu_1=n_1-1$ et $\nu_2=n_2-1$.

Si la valeur 1 n'est pas dans l'intervalle de confiance, l'hypothèse « variances égales » est rejetée avec le risque d'erreur global **α,** et le niveau de confiance global est P = 1 –**α.**

*NB : Pour un niveau de confiance global de 95% (P = 0,95), on lira les valeurs dans la table de Fisher-Snedecor correspondant au **risque unilatéral=0.050/2= 0,025** soit un niveau de confiance unilatéral P = 0,975 (voir annexe 3 table2).*

b) Précision

Afin de mesurer quelle est la méthode la plus précise entre la mesure en tube ou en sachet, nous allons **comparer les variances.** On cherche à savoir si la variance qui a l'estimation la plus élevée est la plus précise selon la méthode de Dixon.

Pour cela le test consiste à comparer le rapport des variances F= var1/var2 (tel que F > 1), à la valeur critique $F(1-\alpha/2, \nu_1,\nu_2)$. Cette valeur critique est lue dans la table de Fisher-Snedecor (voir annexe 3 table 1).

ν_1 et ν_2 sont les degrés de liberté des valeurs **n** mesurées dans chaque série : $\nu_1=n_1-1$ et $\nu_2=n_2-1$.

Si F > Fcritique, on déclarera que var1 est supérieure à var2 avec le risque d'erreur global **α=5%** et le niveau de confiance globale est P = 1 –**α=1-5%=95%.**

2.2.5. Résultats / Discussion

A. Validation des données

Les résultats préalables obtenus pour la mesure de la matière sèche des échantillons sont dans le tableau n°4 suivant:

			17/06/2013	17/06/2013	18/06/2013	
			15h-15h30		15h05-15h35	
		N° CAPS	PDS VIDE	PDS BRUT	PDS SEC	MS
				+ TARE	**+ TARE**	% MS
	CODE LABO		100	200	150	50,00
1	TE 906 C	M40	23,9048	4,3559	27,9747	93,43
2	ANKOM	M11	23,3111	2,8977	25,9318	90,44
3	S3	M20	21,9924	1,6087	23,4303	89,38
			20/06/2013	20/06/2013	21/06/2013	
			14h20-14h50		9h15-9h45	
4	K5013	M95	22,8944	1,7742	24,4649	88,52

Tableau n°4 : résultats en pourcentage des matières sèches

Les données obtenues en lipides %MS, sont présentées dans le tableau (n°5) suivant :

Tableau n°5 : Résultats des expériences

méthode	moy départ	% lipMS	EVP	EVE	Q	Q(P; n)	moy finale
ether non hydrolys tube	2,88	2,63	1,04	1,22	0,85	0,56	2,68
ether non hydrolys tube		2,64					
ether non hydrolys tube		2,64					
ether non hydrolys tube		2,71					
ether non hydrolys tube		2,81					
ether non hydrolys tube		3,85					
ether hydrolys tube	9,17	6,68	0,81	5,29	0,15	0,56	9,17
ether hydrolys tube		7,49					
ether hydrolys tube		8,27					
ether hydrolys tube		10,09					
ether hydrolys tube		10,54					
ether hydrolys tube		11,97					
hexane-isop hydrol sachet	3,71	3,16	0,36	0,95	0,37	0,56	3,71
hexane-isop hydrol sachet		3,51					
hexane-isop hydrol sachet		3,66					
hexane-isop hydrol sachet		3,89					
hexane-isop hydrol sachet		3,91					
hexane-isop hydrol sachet		4,11					
hexane-isop hydrol tubes	3,83	3,39	0,07	0,80	0,09	0,554	3,83
hexane-isop hydrol tubes		3,47					
hexane-isop hydrol tubes		3,56					
hexane-isop hydrol tubes		3,82					
hexane-isop hydrol tubes		3,91					
hexane-isop hydrol tubes		4,13					
hexane-isop hydrol tubes		4,19					
hexane-isop hydrol tubes		4,21					

EVP : écart entre valeurs proches. **EVE** : écart entre valeurs extrêmes. **Q=EVP/EVE**

Les valeurs aberrantes sont représentées en rouge. Pour la méthode « éther non hydrolysé tube », on obtient Q>Q (P, n), la valeur 3,85 est considérée comme aberrante. Une fois éliminée, on obtient alors une nouvelle moyenne de 2.86%MS.

Pour les autres méthodes le test montre que les valeurs ne sont pas considérées comme aberrantes (Q<Q (P, n)). Les valeurs moyennes restent donc inchangées.

D'autre part, si on observe les données de l'extraction à l'éther de pétrole, les résultats montrent que les teneurs en lipides sont supérieures pour l'échantillon hydrolysé. Ce résultat montre que l'hydrolyse fonctionne.

B. Comparaison des méthodes de dosage

a)Comparaison

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (n°5) :

	Variance	F	v1	v2	F (1-0,05/2; 5; 7)	P	borne INF IC	borne SUP IC
hexane-isop hydrol sachet	0,57	5,20	5	7	5,29	0,975	0,98	27,50
hexane-isop hydrol tubes	0,11							

IC : Intervalle de confiance ; **INF** : Inférieure ; **SUP** : supérieure

La valeur 1 est comprise dans l'intervalle de confiance. On peut donc conclure que les variances sont égales avec le risque d'erreur global 5% et au niveau de confiance global : P= 1-5%=95%.

Les méthodes de dosage en tube et en sachets ne sont donc pas différentes, elles sont comparables, au niveau de confiance unilatéral P=1-2.5%= 97,5%

b) Précision

Après calculs, on obtient :

F=5,20 et la valeur critique F (1-0,05; 5 ; 7) =4,88.

D'après les résultats précédents, la variance la plus élevée semblait être celle de la méthode de dosage par les sachets. Après application du test statistique de comparaison des variances, on peut voir que F calculé est supérieur à la valeur critique.

Ce qui signifie que la variance de la méthode des sachets est supérieure à la variance de la méthode de mesure en tubes, avec le risque d'erreur global de 5% et le niveau de confiance global est P = 0,95 soit 95%.

La méthode de mesure en sachets est donc plus précise que celle en tubes, au niveau de confiance 0,95.

Conclusion et bilan personnel

Mon étude globale était :

- De déterminer les Matières Azotées Totales contenus dans les aliments

- De mettre au point une méthode de dosage des lipides totaux.

Au cours du stage, la méthode de dosage des matières azotées totale a permis de compléter la base de données du laboratoire et a été transmise aux chercheurs concernés.

Concernant le dosage des matières grasses totales, mon étude a permis de débuter une mise au point qu'il reste à finaliser. En effet une première étape a été menée : l'hydrolyse fonctionne bien La comparaison des méthodes de mesures (sachet ou tube) a montré que celle des sachets était la plus précise. Il va maintenant falloir poursuivre en comparant les méthodes d'extraction. Cela passera aussi par des calculs statistiques.

Malgré les difficultés rencontrées (la panne de l'évaporateur, coupure d'eau, différentes manipulations de méthodes pour l'ASE) lors des expérimentations, j'ai réussi à atteindre mon objectif. Ce stage m'a apporté beaucoup de choses. J'ai appris à être plus créative, à prendre des initiatives, à travailler en équipe mais aussi indépendante.

Par ailleurs, ce stage à l'INRA m'a donné une idée précise sur le mode de fonctionnement de travail dans un laboratoire de recherche.

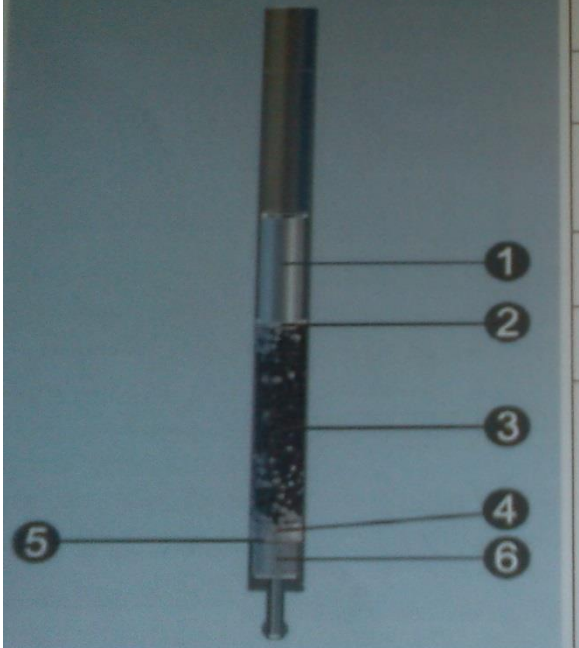
Cette expérience a été très enrichissante pour moi tant sur le plan professionnel et sur le plan privé.

ANNEXES

Annexe 1

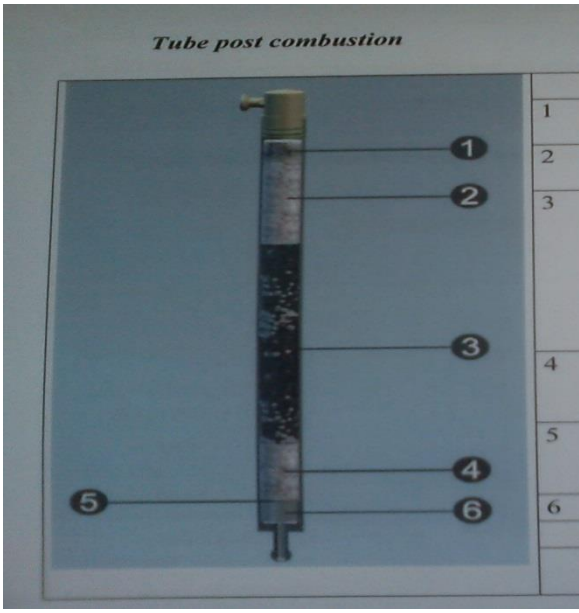
Conditionnement des tubes (pour l'appareil Rapid N Cube)

Tube à combustion



1	Collecteur de cendres (acier ou céramique ou quartz)	
2	Billes d'alumine 3mm ≅ 1 g	
3	CuO + Billes d'alumine 110 mm ≅ 80 g CuO + 20 g de billes d'alumine	
4	Billes d'alumine 10 mm ≅ 3 g	
5	Mèche ronde diamètre 22 mm	
6	Entretoise	

Tube post combustion



1	Laine d'argent 20 mm ≅ 13 g	
2	Billes d'alumine 76 mm ≅20 g	
3	CuO + catalyseur platine 180 mm ≅200 g CuO + 15 g de catalyseur platine. Homogénéiser les deux composés.	
4	Billes d'alumine 50 mm ≅ 16 g	
5	Mèche ronde diamètre 22 mm	
6	Entretoise	
	Tube post combustion	

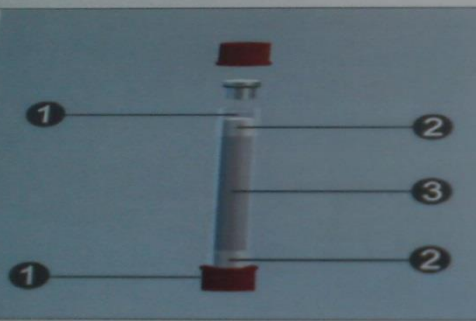
Tube de réduction



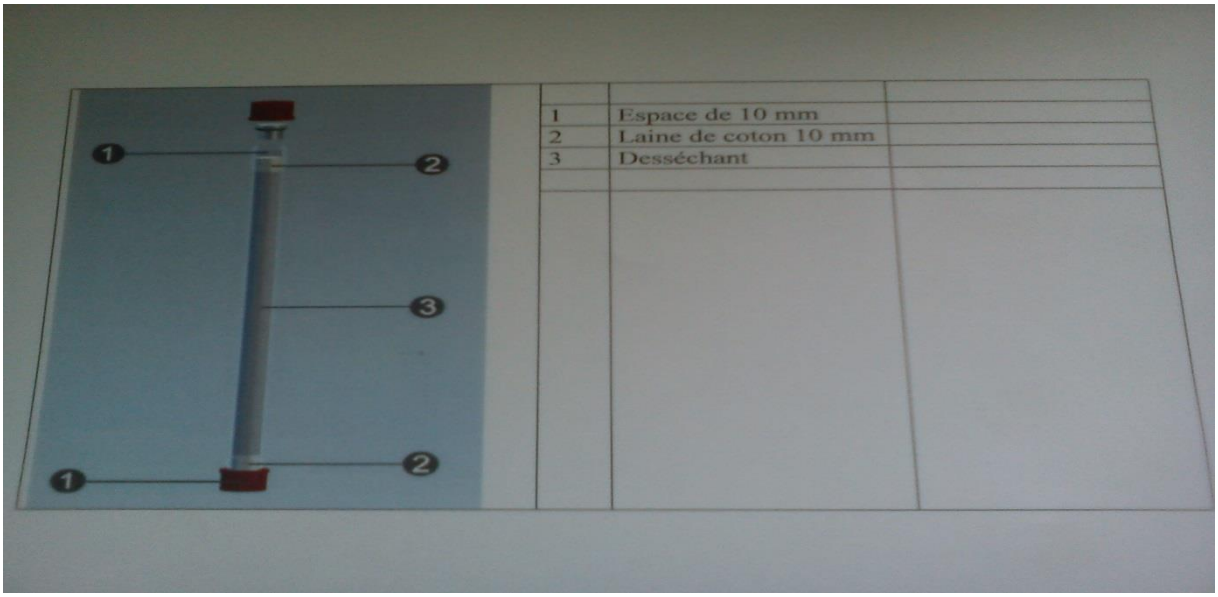
1	Laine d'argent	
2	Cuivre 20 mm	
3	CuO 50 mm	
4	10 étages successifs de tungstène. Masse de tungstène par étage entre 18.5 et 19.5 g.	
5	Billes d'alumine 55 mm ≅17 g	
6	Mèche ronde diamètre 22 mm	
7	Bouchon. Ne pas oublier de disposer les deux joints ref 03 654 627 et de les graisser.	
	Tube en quartz	

Remarque :
Lors de l'oxydation du tube, le tungstène se dilate. Du respect des consignes de pesée dépend la durée de vie du système.

Tube desséchant



1	Espace de 10 mm	
2	Laine de coton 10 mm	
3	Desséchant	



ANNEXE 2 :Tables de Dixon utilisées

I. Pour

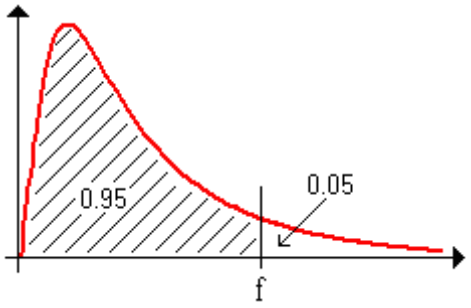
$$r_{10} = \frac{y_2 - y_1}{y_n - y_1} \text{ Ou } r_{10} = \frac{y_n - y_{n-1}}{y_n - y_1}$$

n			10%	5%	1%
3			0,886	0,941	0,988
4			0,679	0,765	0,889
5			0,557	0,642	0,780
6			0,482	0,560	0,698
7			0,434	0,507	0,637

ANNEXE 3

Table 1 : Loi de Fisher-Snedecor (extraits utilisés)

Valeur f de la variable de Fisher-Snedecor F ($\nu 1$; $\nu 2$) ayant la probabilité 0 ,05 d'être dépassée

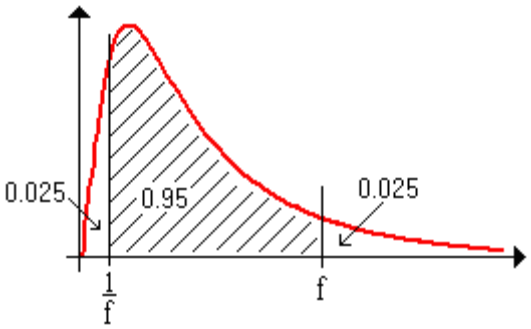


$\nu 1$: degrés de liberté du numérateur
$\nu 2$: degrés de liberté du dénominateur

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	161,45	199,50	215,71	224,58	230,16	233,99	236,77	238,88
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,88	4,82

Table 2 : Loi de Fisher-Snedecor (extrait utilisé)

Valeur f de la variable de Fisher-Snedecor $F(\nu 1 ; \nu 2)$ ayant la probabilité 0,025 d'être dépassée



$\nu 1$: degrés de liberté du numérateur
$\nu 2$: degrés de liberté du dénominateur

	1	2	3	4	5
1	647,79	799,48	864,15	899,60	921,83
2	38,51	39,00	39,17	39,25	39,30
3	17,44	16,04	1,44	15,10	14,88
4	12,22	10,65	9,98	9,60	9,36
5	10,01	8,43	7,76	7,39	7,15
6	8,81	7,26	6,60	6,23	5,99
7	8,07	6,54	5,89	5,52	5,29

BIBLIOGRAPHIE

- Documentation INRA

- Banque des schémas SVT Académie DIJION. Disponible et accès sur : svt.ac-dijion.fr
  Publié le samedi 6 décembre 2008 par Alain Gallien
  Dernière mise à jour le samedi 6 décembre 2008

- Principe Soxtec disponible et accès sur www.foss.dk

- ANKOM TECHNOLOGY disponible et accès sur : www.ankom.com
  Publié par Atomic Design 2010

- Rapid N Cube disponible et accès sur : granat-e.ru

- Site : extpdf.com/dosage-des-lipides-pdf.html#pdf#a6
  http://horizon.documentation.ird.fr

- Site : Wiki.epfl.ch/ball/documents/chimie_denrées/03_lipides.pdt
- Cirad disponible et accès sur : http://dico-sciences-animales.cirad.fr
- Meyer C., Ed. sc., 2013, Dictionnaire des Sciences Animales. [On line]. Montpellier, France, Cirad. [16/10/2013]. < URL : http://dico-sciences-animales.cirad.fr/ >

- Wikipédia

ATTESTATION DE STAGE EN ENTREPRISE

Année scolaire : 2012 / 2013

Je soussigné Laure CHEVRY MARIE-MAGDELEINE

Fonction Responsable de laboratoire, Chercheur

Certifie que Melle MISCHER Maïly

a effectué une séquence de formation en entreprise du 26/11/12 au 01/12/12
et du 20/05/13 au 06/07/13.

Fait à Petit-Bourg le 29/08/2013

Signature du responsable
du stage en entreprise

Cachet de l'entreprise

INRAA
Unité de
Recherches
Zootechniques
Domaine de
Petit-Bourg

LISTE DES ACTIVITES

NOM et Prénom de l'élève : HISCHER Maily Classe : 1TSCH

DATES	TACHES REALISEES
du 26/11/12 au 01/12/12	- Prise en main des activités de routine.
du 20/05/13 au 06/07/13	- Recherche bibliographique. - Préparation de réactifs. - Extraction et dosage de lipides - Détermination de la matière azotée totale - Détermination de la matière sèche. - Etude des données - Rédaction.

L'étudiant devra souligner les connaissances nouvelles acquises