



République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique
Université de Ghardaïa



Faculté des sciences de la nature et de la vie et sciences de la terre
Département des sciences agronomiques

TP Formulation et technologie de la fabrication des aliments

‘analyse fourragère’

Spécialité : Production animale

Niveau : 3^{ème} année licence

Réalisé par : Dr. DJOUZA Loubna

Année académique : 2021/2022

Informations sur le TP ‘Fiche contact’

Université de Ghardaïa

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre

Département des sciences agronomiques

Public cible : 3ème année Licence, Spécialité : Production animale.

Il est recommandé pour les étudiants d'avoir des connaissances préalables en zootechnie et en physiologie animales

Semestre : 5

Intitulé du cours : TP Formulation et technologie de la fabrication des aliments

Unité d'enseignement Méthodologique (UEM3.1.1)

Crédits : 7

Coefficient : 4

Volume horaire de travail requis/semaine : TP 1h30/semaine

***Modalité d'évaluation** : Contrôle continu (40%), Examen final (60%).

Enseignante de TP : Dr. Loubna Djouza

Contact : par mail au : djzlb@gmail.com ; Je m'engage à répondre sur toute question en relation avec les TP par mail dans 48 heures qui suivent la réception du message, sauf en cas des imprévus.

Disponibilité :

Au bureau : Dimanche de 08h00 -10h00

Introduction

L'intérêt d'analyser le fourrage est double. Il permet de qualifier la conduite de la culture et de déterminer le potentiel nutritif des fourrages. Ceux-ci étant destinés à l'alimentation des animaux, il est important de bien connaître leur valeur alimentaire pour répondre aux besoins des animaux et ainsi concilier santé, productivité et rentabilité économique.

La valeur nutritive d'un fourrage n'est pas constante, elle varie selon le sol, le climat, la nature des espèces fourragères, le stade, la gestion de la prairie par exemple, mais elle évolue également au cours de la saison et également en fonction des conditions de récolte et les modalités de conservation.

L'analyse des fourrages est donc aussi un outil précieux d'aide à la gestion de la production fourragère. La connaissance de la valeur alimentaire des fourrages produits à la ferme permet par exemple d'évaluer avec précision les stocks disponibles pour l'hiver et d'établir des plans d'affouragement adaptés.

La qualité des résultats d'analyse est étroitement liée à la méthode d'échantillonnage. La prise d'échantillon est la source d'erreur la plus importante dans l'estimation de la valeur d'un fourrage. Pour obtenir des résultats fiables, il faut avoir en tête quelques techniques de prélèvement. Le tableau suivant représente les types d'échantillonnage possibles selon le type de fourrage :

	Type d'échantillons ⁽¹⁾		
	Vert à la fauche	Préfané	Conservé
Pâturage	prélèvement juste avant l'utilisation par les animaux		
Ensilage	prélèvement en vert juste avant ou juste après la fauche	prélèvement après préfanage lors de la mise en silo	prélèvement avant l'ouverture du silo (via carottages) ou sur le front d'attaque
Enrubannage	prélèvement en vert juste avant ou juste après la fauche	prélèvement sur l'andain avant pressage	prélèvement sur plusieurs balles
Foin	prélèvement en vert juste avant ou juste après la fauche	prélèvement sur l'andain avant pressage	prélèvement sur plusieurs balles

⁽¹⁾ En vert, l'échantillonnage à privilégier. En jaune, échantillonnage possible.

Pour les fourrages conservés, l'échantillonnage peut se faire sur le fourrage vert à la récolte ou lors de l'utilisation du fourrage

Comment prélever un échantillon de fourrage ?

- **Échantillonnage en vert à la fauche (échantillon global : 1 à 2 kg frais) :**

- Méthode des quadrats : prélever 4 quadrats de 50 x 50 cm pour 1 ha à différents endroits de la parcelle puis 1 quadrat supplémentaire par ha supplémentaire.

- Méthode des poignées : prélever 25 grosses poignées de fourrage à la mini-tondeuse ou aux ciseaux sur une diagonale de la parcelle.

- Lors de la fauche : prélever plusieurs échantillons simples à différents endroits derrière la faucheuse (minimum 4 prélèvements).

La hauteur de coupe est à adapter en fonction de la destination de l'échantillon : 7 cm pour les parcelles destinées à faire du **foin** ou de l'ensilage, 5-6 cm minimum pour les parcelles pâturées par des bovins et 3-4 cm minimum pour les parcelles pâturées par des ovins ou des équins. Éviter de souiller le prélèvement avec de la terre.

- **Échantillonnage après préfanage (sur l'andain ou à la mise en silo)**

- Sur l'andain (min 1 kg frais pour l'échantillon) : confectionner une pince de prélèvement avec deux lattes de bois de 1,5 m de long. Passer une latte sous l'andain, l'autre au-dessus et en serrant les deux, **prélever le fourrage**. Effectuer au minimum 4 prélèvements sur une parcelle d'1 ha puis un prélèvement par ha supplémentaire.

- À la mise en silo : lors du déchargement des remorques, prélever au moins 5 échantillons à intervalles réguliers sur chaque remorque. Si les fourrages constituant le silo sont très différents (ex : luzerne et graminée), les faire analyser séparément.

- **Échantillonnage des ensilages**

- Avant l'ouverture du silo (attendre au minimum 4 semaines après l'ensilage) : réaliser des carottages verticaux à au moins 3 endroits du silo à l'aide d'une sonde spécifique.

- Sur le **front d'attaque** : prélever tous les 50 cm sur différentes verticales à raison d'une verticale tous les 2 m. Faire un minimum de 9 prélèvements sur une profondeur similaire d'au moins 20 cm sur la surface fraîche.

Pour les silos sandwich, mieux vaut faire une analyse/couche.

Échantillonnage de foin et des fourrages enrubannés :

Réaliser les prélèvements sur plusieurs balles d'un même lot (au moins 5) pour un échantillon d'environ 500 g frais.

- Sur balle ouverte : prélever au moins 10 poignées à différents endroits dans toutes les couches.
- Sur balle fermée : faire un prélèvement unique au travers de toutes les couches grâce à une sonde. Penser à bien reboucher le trou et recoller le plastique.
- Foin en vrai (séchage en grange) : difficile de prélever un échantillon représentatif dans les cellules de ventilation du foin. Mieux vaut réaliser l'échantillon sur le fourrage vert à la récolte.

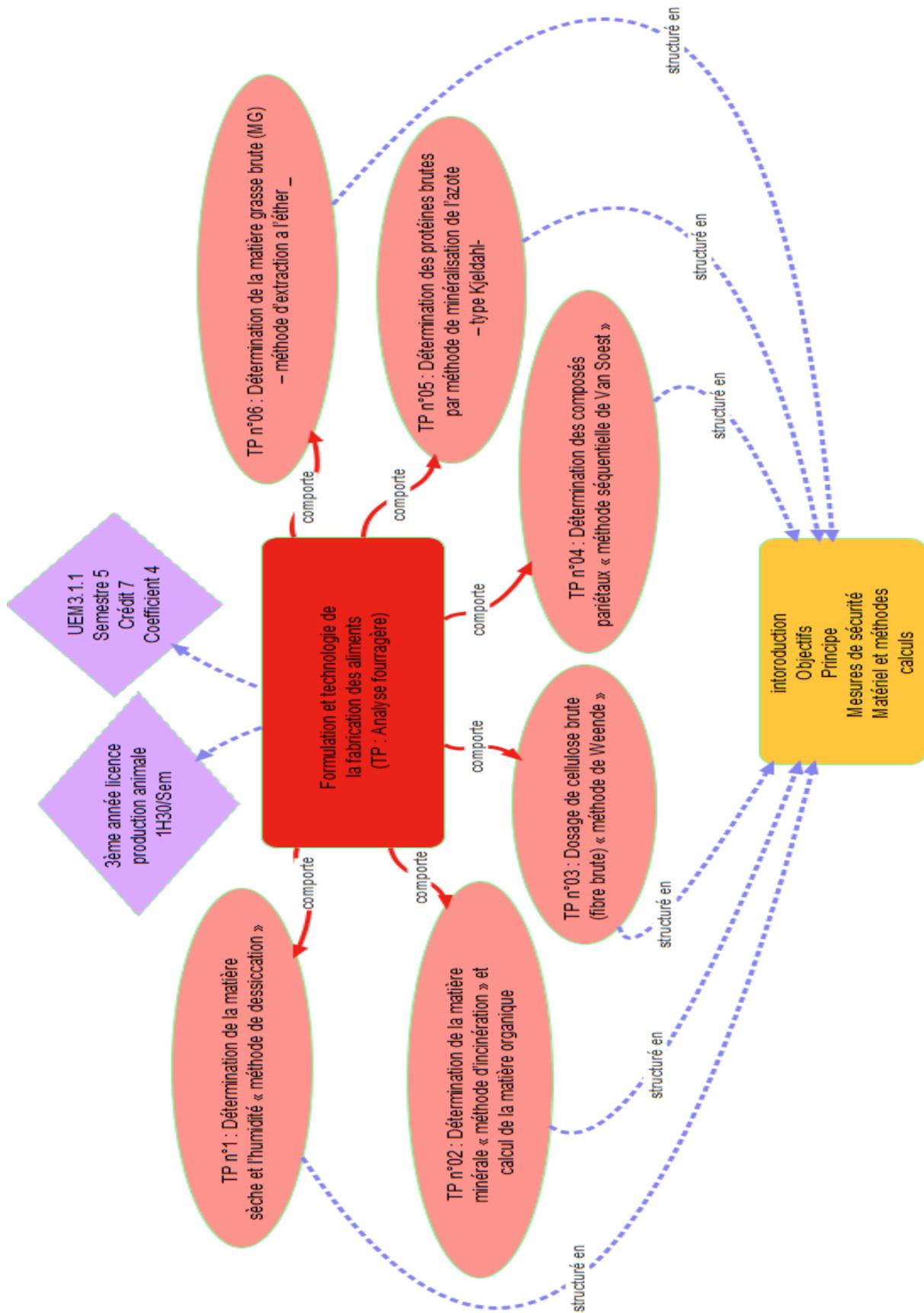
_ Emballer et étiqueter des échantillons de fourrage

L'échantillon devra être placé dans un sac plastique vidé de son air, bien fermé et hermétique. S'il est humide, il faut le conserver au frais ou congelé jusqu'à l'analyse (le plus rapidement possible).

L'étiquette doit comporter les informations suivantes : numéro/nom de l'échantillon, date de prélèvement, nature du fourrage, type d'échantillon (vert à la fauche, vert préfané ou conservé), le mode de conservation (ensilage, enrubannage, foin), le stade de récolte, le numéro de cycle (1e coupe, 2e coupe, etc.), le pourcentage de légumineuses si besoin, et les conditions de récolte (ventilé, fané par beau temps, pluie, etc.) ou de conservation (ajout de conservateurs). « site 1 »

Plan des TP :

TP n°1 : Détermination de la matière sèche et l'humidité « méthode de dessiccation »	8
TP n°02 : Détermination de la matière minérale « méthode d'incinération » et calcul de la matière organique	11
TP n°03 : Dosage de cellulose brute (fibre brute) « méthode de Weende »	14
TP n°04 : Détermination des composés pariétaux « méthode séquentielle de Van soest »	18
TP n°05 : Détermination des protéines brutes par méthode de minéralisation de l'azote – type Kjeldahl-	22
TP n°06 : Détermination de la matière grasse brute (MG)– méthode d'extraction a l'éther	_ 26



Carte mentale des TP

TP n°1 : DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE ET L'HUMIDITE

« METHODE DE DESSICCATION »

1.Introduction

L'eau et la matière sèche

Lorsqu' un échantillon d'aliments est placé dans une étuve maintenue à 103°C pendant 24 heures, toute l'eau (H₂O) s'évapore et le résidu sec s'appelle la *matière sèche (MS)*. Les aliments contiennent des quantités variables d'eau. Une jeune plante contient de 70 à 80% d'eau (c'est-à-dire, 20 à 30% de MS).

Cependant, les semences ne contiennent pas plus de 8 à 10% d'eau (c'est-à-dire, 90 à 92% de MS). La quantité d'eau dans un aliment est en général peu importante. Par exemple : les vaches laitières boivent de 4 à 5 kg d'eau par kg de MS ingérée. Cette eau doit être fraîche, propre et disponible à toute heure de la journée. A l'exception de l'eau, toutes les substances nutritives se trouvent dans la MS de l'aliment. La concentration d'une substance nutritive, comme par exemple la protéine, est en général exprimée sur base de la quantité de MS contenue dans l'aliment et non sur base de la matière fraîche (le poids de la MS et de l'eau que l'aliment contient).

2.Objectif

Détermination de la teneur en matière sèche et en eau d'un échantillon de fourrage.

3.Principe de la méthode

Les échantillons du fourrage sont séchés jusqu'à masse constante à (103 ± 2) °C. La différence de masse avant et après séchage sert de mesure pour la teneur en matière sèche et en eau. Ces teneurs sont exprimées en pourcentage de masse.

4.Appareillages et matériels utilisés

- Etuve : température contrôlée par thermostat avec ventilation forcée de l'air et capable de maintenir une température de (103 ± 2) °C.
- Dessiccateur : avec agent déshydratant actif (pour le refroidissement et l'élimination de l'humidité)
- Balance analytique : précision de 10 mg.
- Récipient en matériau n'absorbant pas l'humidité « capsule ou boîte pétri en verre »

- Broyeur
- Spatule.
- Boîtes hermétiques.



Figure 01: Etuve, Dessiccateur, balance analytique (Djouza , 2014)

5.Mode opératoire

La teneur en MS est obtenue après une dessiccation à $103^{\circ}\text{C} \pm 2$ pendant 4 heures dans une étuve ; puis, l'échantillon est placé dans un dessiccateur, jusqu'à poids constant

6.Calcul

La teneur en humidité est donnée par :

$$\text{H}\% = [(E - P)/E] \times 100$$

H% : pourcentage d'humidité ; P : poids de l'échantillon après séchage (g) ;

E : poids initial de l'échantillon après séchage (g)

$$\% \text{ MS (\%)} = 100 - \text{H}$$

MS% : matière sèche en %

Remarque :

Mouture des échantillons

Pour les autres analyses les échantillons sont ensuite broyés en poudres fines dans un moulin (ou broyeur) muni d'un tamis 1mm (AOAC, 1990) et conservés dans des boîtes hermétiques étiquetées et identifiées et posées dans un endroit loin de l'humidité et à l'abri de la lumière pour éviter toute détérioration des échantillons en attente des analyses ultérieures.



Figure 02: Broyeur (Djouza, 2014)

TP n°02 : DETERMINATION DE LA MATIERE MINERALE « METHODE D'INCINERATION » ET CALCUL DE LA MATIERE ORGANIQUE

1.Introduction

La matière sèche d'un aliment contient de la matière organique (glucides, lipides, protides, acides nucléiques) et de la matière inorganique (minérale). Les composés qui contiennent du carbone (C), de l'hydrogène (H), de l'oxygène (O) et de l'azote (N) sont des composés organiques. Par contre, les autres éléments chimiques trouvés dans les aliments (calcium, phosphore, sodium, etc.) font partie de la matière minérale. Lorsqu'un échantillon d'aliment est placé dans un four maintenu à une température entre 550° et 900 C « température de calcination de la matière verte » pendant 24 heures, la matière organique est consommée et la matière résiduelle est minérale (cendres). Chez les plantes, le contenu minéral varie de moins de 1% à plus de 12%.

Les concentrés contiennent en général plus de minéraux que les fourrages.

Les minéraux sont souvent classifiés en deux classes: les macro et les micros éléments. Cette distinction est basée sur la quantité requise par l'animal. Les macro-minéraux sont nécessaires dans l'ordre d'une ou quelques dizaines de grammes par jour. Par contre, le besoin en oligoéléments ne dépasse pas les quelques milligrammes par jour. Certains minéraux sont connus pour leur effet négatif sur la digestibilité des aliments (par exemple, la silice).

2.Objectif

Détermination de la teneur en matière minérale et organique d'un échantillon de fourrage

3.Principe (MM)

Lorsque l'échantillon est soumis à une incinération, la matière organique est consommée (subit une oxydation totale ; CHON après oxydation donne $CO_2 + H_2O + N_2$) et la matière résiduelle représente le poids des minéraux (cendres) dans les échantillons (A. O. A. C., 1990), Le but est de déterminer la teneur en matières minérales dans les échantillons, de façon à calculer la quantité de matière organique (MO). Cette dernière représente la différence entre la MS et les matières minérales (MM).

4. Consignes de sécurité

Utiliser des pinces à grandes branches et des gants pour se prémunir des brûlures aux bras et aux mains en chargeant ou déchargeant du four à incinération. Se placer sur le côté et ouvrir prudemment le four à moitié. Ne pas ouvrir le four chaud avant que l'échantillon soit complètement incinéré car des flammes peuvent survenir

5. Appareillages et matériels utilisés

- Balance analytique : précision de 10 mg
- Creuset en alliage ou porcelaine
- Spatule
- Four à moufle



Figure 03: Four à moufle (Djouza, 2014)

6. Mode opératoire

-Placer le creuset contenant la matière sèche au four à 500-600°C pendant 3 heures.

-Refroidir au dessiccateur.

-Peser le creuset contenant les cendres : p_3

7. Formule de calcul

La teneur en matière minérale (cendre brute) est le résidu de calcination d'un échantillon de fourrage (incinération) dans un four à moufle à $550^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ pendant 3 heures

$$\text{MM (en \% de MS)} = (100 - P)/E$$

Ou :

MM% : matière minérale (%) ;

MS% : matière sèche en% ;

P : poids de l'échantillon après (incinération)(g) ;

E : poids initial de l'échantillon après séchage (g)

Ce taux permet d'obtenir le pourcentage de la matière organique (MO) du fourrage.

MO (en %de MS) = 100 – MM

TP n°03 : DOSAGE DE CELLULOSE BRUTE (FIBRE BRUTE)

« METHODE DE WEENDE »

Objectif

Dosage de cellulose brute dans les aliments des animaux ‘fourrages ‘

1.Principe

La teneur en cellulose brute est déterminée par la méthode de Weende. Elle est obtenue après double hydrolyse par des solutions acide ‘acide sulfurique’ puis basique ‘hydroxyde de potassium’ ; généralement la substance obtenue contient en majorité de la cellulose, une fraction de lignine, une petite partie d’hémicellulose et une fraction de matière azotée. Vu que la variation de la CB et de lignine sont constantes ; elle permet que la CB est un bon indicateur de la digestibilité de la MO «DMO » et la valeur énergétique.

2.Consignes de sécurité et mesures spécifiques

- Suivre les instructions de sécurité spécifiées sur les fiches de sécurité des réactifs et dans le log book de l'appareil.
- Toutes les manipulations de solvants se font sous hotte

3.Réactifs

- Eau déminéralisée (distillée)
- Éther de pétrole (point d'ébullition 40 à 60 °C).
- Acide sulfurique (H₂SO₄), 0,15 M (mol/l).
- Acétone.
- Solution d'hydroxyde de potassium (KOH), 0,23 M
- Antimousse (n-octanol)

4.Appareils

- Balance analytique à 0,1 mg de précision
- Creusets filtrants en verre robuste de 50 ml, avec un filtre en verre fritté de porosité 40-100 µm. Avant la première utilisation, chauffer prudemment et graduellement le nouveau creuset filtrant pendant quelques minutes à 500°C. Refroidir.

- Four à moufle, capable d'être maintenu à une température de 550 ± 20 °C.
- Capsules d'incinération (en quartz).
- Four à séchage ventilé, capable d'être maintenu à une température de 103 ± 2 °C ou bien, une étuve électrique chauffée et ventilée, capable de maintenir une température de 130°C.
- Appareil de chauffage
- Équipement de filtration (**Système d'extraction à froid**), connecté à un système à vide, par exemple le Fibertec
- Dessiccateur



Figure 04: Extraction de la cellulose brute (Djouza, 2014)

5. Procédure

5.1. Prétraitement de l'échantillon

- **Élimination du carbonate**
 - Connecter le creuset filtrant au système de chauffage.
 - Laver l'échantillon 3 fois avec 30 ml d'acide chlorhydrique chaque fois. Après chaque addition, laisser agir une minute avant de filtrer.
 - Laver une fois avec 30 ml d'eau.
- **Dégraissage**

- Pour chaque creuset peser 1 g de l'échantillon à 0,1 mg près (W1).
- Placer les creusets dans l'équipement de filtration et ajouter environ 30 ml d'éther de pétrole dans chaque creuset et filtrer avec l'aide du vide.
- Répéter le lavage 2 fois.
- Sécher le résidu à l'air et transférer quantitativement dans un bécher.

5.2 Digestion (hydrolyse)

5.2.1 Dans chaque bécher ajouter 150 ml d'acide sulfurique et faire bouillir pendant 30 ± 1 minutes. Si de la mousse apparaît, ajouter quelques gouttes d'un agent anti-mousse.

5.2.2 Filtrer le mélange à travers un creuset filtrant en utilisant le vide (équipement de filtration).

5.2.3 Laver le résidu 5 fois, chaque fois avec 10 ml d'eau distillée chaude.

5.2.4 Ajouter un volume d'acétone pour couvrir simplement le résidu. Retirer l'acétone après quelques minutes en appliquant une légère succion.

5.2.5 Transférer quantitativement le résidu dans un bécher.

5.2.6 Ajouter 150 ml d'hydroxyde de potassium dans chaque bécher et faire bouillir pendant 30 ± 1 minutes.

5.2.7 Filtrer le mélange à travers un creuset en utilisant le vide.

5.2.8 Laver le résidu avec de l'eau distillée chaude jusqu'à neutralisation des rinçages.

5.2.9 Laver le résidu 3 fois, chaque fois avec 30 ml d'acétone. Sécher le résidu par succion après chaque lavage.

5.3 Séchage et incinération

5.3.1 Introduire les creusets dans un four ajusté à 103 ± 2 °C et sécher pendant 4 heures. Le temps de séchage démarre lorsque le four atteint 103 °C.

5.3.2 Placer les creusets dans un dessiccateur et laisser sécher.

5.3.3 Peser les creusets immédiatement après l'avoir retiré du dessiccateur à 0,1mg près (W2).

5.3.4 Placer les creusets dans un four à moufle, et incinérer les échantillons pendant 2 heures à 550 ± 20 °C. La durée de l'incinération démarre lorsque le four atteint 550 °C.

5.3.5 Placer les creusets dans un dessiccateur et laisser refroidir.

5.3.6 Peser le creuset directement après l'avoir retiré du dessiccateur à 0.1 mg près (W3).

6. Calcul

Pourcentage fibre brute (% FB):

$$\% \text{ FB} = (W2 - W3) \times 100 / W1$$

où,

W1 = poids échantillon (g),

W2 = poids creuset et résidu après séchage (g), et

W3 = poids creuset et résidu après incinération (g)

TP n°04 : DETERMINATION DES COMPOSES PARIETAUX « METHODE SEQUENTIELLE DE VAN SOEST »

Introduction

Etant donné les limites de cellulose brute, de nombreux chercheurs ont tenté de mettre aux points des méthodes de dosages par fractionnements des différents constituants de la paroi végétale. Signalons, en particulier, les travaux des chercheurs français (**Jarrige et al., 1982**) et américains (**Van Soest et al. 1991**), l'émergence de cette méthode est attribuée à son utilisation judicieuse de solution détergents qui évite certaines extractions préalables et à ses possibilités de semi-automatisation.

Les fibres insolubles dans les détergents acides (ADF) et les fibres insolubles dans les détergents neutres (NDF) sont des mesures importantes utilisées dans les aliments fourragers consommés par les animaux. Les deux calculs sont basés sur la digestibilité du matériel végétal présent dans la nourriture d'un animal. Les agriculteurs utilisent ces deux calculs pour déterminer la quantité de nourriture dont un animal a besoin et la quantité d'énergie que l'animal recevra de cette nourriture consommée.

Les deux calculs de fibres sont utilisés en conjonction l'un avec l'autre pour déterminer la quantité et l'énergie qui seront contenues dans une alimentation. Les fibres à faible teneur en cellulose, en lignine et en hémicellulose prennent généralement moins de place dans l'estomac et sont capables de fournir de plus grandes quantités d'énergie à l'animal. Les fibres riches en ces matériaux prennent plus de place et produisent moins d'énergie pour l'animal.

Les méthodes d'analyse des fibres sont basées sur des traitements chimiques successifs sur l'échantillon afin de solubiliser les composants non fibreux et à la fin l'obtention d'un résidu qui détermine la teneur en fibres (ADF, NDF).

1. Principe

Cette technique gravimétrique repose sur l'extraction des constituants solubles de parois cellulaires dans des solutions détergents soit neutre (pour NDF) soit acide (pour ADF) et la pesée du résidu après séchage.

- Les fibres neutres correspondent au résidu insoluble contenant la cellulose, hémicellulose et la lignine ou résidu des parois cellulaires (PC).
- Les fibres acides correspondent au résidu insoluble contenant la cellulose et la lignine ou lignocellulose (LC).

- La lignine est obtenu par attaque à l'acide sulfurique à 72% du résidu ADF et la pesée du résidu sec (ADL).

- Les résidus secs sont incinérés à 550 °C et les résultats exprimés par rapport à la matière sèche.

2. Équipement

- Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- Creusets avec filtre en verre, ou équipement.
- Appareil de chauffage.
- Équipement de filtration, connecté à un système à vide, par exemple le Fibertec (Analyseur semi-automatique)
- Dessiccateur.
- Four à séchage ventilé, capable d'être maintenu à une température de 103 ± 2 °C.
- Four à moufle, capable d'être maintenu à une température de 550 ± 20 °C.

3. Réactifs de préparation des détergents

3.1. Neutral Détergent Fiber (NDF)

Pour 1L de solution NDF, il nous faut:

- 18,61g de EDTA (di-sodium éthylène diamine tétra-acétate) ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 10H_2O$)
- 6,81 g de di-sodium tétra-borate ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)
- 30 g de sodium lauryl sulfate ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$)
- 10 ml d'éther monoéthylique ($C_4H_{10}O_2$)
- 4,56 g de di-sodium hydrogène-phosphate anhydre (Na_2HP0_4)

Mettre l'EDTA et le di-sodium tétra-borate dans un bécher, ajouter une certaine quantité d'eau distillée et chauffez jusqu'à dissolution, après ajouter le sodium lauryl sulfate, d'éther monoéthylique et le di-sodium hydrogène-phosphate anhydre. Porter jusqu'au trait (1000 ml) avec l'eau distillée chaude puis agiter vivement.

3.2. Acid Détergent Fiber (ADF)

Pour 1L de solution ADF, il nous faut:

- 20 g de CTAB (Bromure de Cétyl Tri-méthyl Ammonium : C₁₉H₄₂BrN)
- 30ml de H₂SO₄ concentré

Dans un bécher d' 1 litre, mettre le CTAB sur un agitateur magnétique pour assurer l'homogénéiser du mélange, puis ajouter l'acide sulfurique pur (l'ajout doit être fait délicatement dans le bécher préalablement mis dans un évier d'eau froide)

3.3. Acid Détergent Lignin (ADL)

On traite le résidu ADF avec l'H₂SO₄ à 72%

4.Mode opératoire

- Peser chaque creuset.
- Peser avec précision de l'ordre de 1 g d'échantillon (séché et broyé à 1 mm) dans un creuset filtrant • Procéder de la même façon décrite au cours de la méthode de Weende sauf que la quantité de la solution NDF est de 200 ml et que la durée d'attaque est d'une heure.
- Récupérer les creusets de l'NDF après leur séchage dans l'étuve à 105°C, leur pesée et les remettre dans le bécher du Fibertec contenant 200 ml de la solution ADF
- Après une heure d'extraction, laver les filtres contenant le résidu ADF avec de l'eau distillée en suite l'acétone.
- Séchage et pesée puis récupération du résidu ADF pour l'attaque à l'acide sulfurique pour l'extraction du résidu ADL
- Une fois filtré et rincé à l'eau chaude puis à l'acétone, le résidu récupéré subit alors une attaque par l'acide sulfurique à 72 % et ce durant 3 heures à température ambiante. L'acide est mis directement dans les creusets tout en agitant fréquemment avec des baguettes en verre (les creusets mis dans un récipient en verre doivent être à 3/4 remplis d'acide).
- Après cette opération, le résidu doit être de nouveau filtré puis rincé à l'eau chaude. Le creuset est séché à l'étuve à 105°C pendant 12 heures, pesé et enfin calciné à 450°C pendant 3 heures. (Goering et Van Soest, 1970 ; AOAC, 1990).

5. Calcul

La teneur en NDF est ainsi calculée comme suit :

$$\% \text{ NDF} = ((P1-P2)/ PE \times MS_a) \times 100$$

P1 : poids du creuset après séchage à 105°C (g)

P2 : poids du creuset après calcination (g)

PE : prise d'essai (g)

MS_a: %MS a /100.

La teneur en ADF est ainsi calculée comme suit :

$$\% \text{ ADF} = ((P1-P2)/ PE \times MS_a) \times 100$$

P1: poids du creuset après séchage à 105°C (g)

P2 : poids du creuset après calcination (g)

PE : prise d'essai (g).

MS_a: %MS_a/100.

$$\% \text{ Hémicelluloses} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

La teneur en ADL est ainsi calculée comme suit :

$$\% \text{ ADL} = \% \text{ Lignine} = ((P1-P2)/ PE \times MS_a) \times 100$$

P1 : poids du creuset après séchage à 105°C (g)

P2 : poids du creuset après calcination (g)

PE : prise d'essai (g).

MS_a : %MS_a /100.

$$\% \text{ Cellulose} = \% \text{ ADF} - \% \text{ ADL}$$

TP n°05 : DETERMINATION DES PROTEINES BRUTES PAR METHODE DE MINERALISATION DE L'AZOTE – TYPE KJELDAHL-

1.Introduction

Contrairement aux sucres et aux lipides, les protéines contiennent de l'azote. Cette propriété sera exploitée dans la méthode de détermination de la teneur en protéines dans les aliments. La méthode Kjeldahl est la méthode de référence pour la détermination des protéines totales dans les aliments. Il existe deux versions de la méthode qui utilisent le même principe : La méthode macro-Kjeldahl et la méthode micro-Kjeldahl. Elles diffèrent seulement par l'appareillage utilisé et les quantités d'échantillon ; la masse d'échantillon analysée par la méthode macro-Kjeldahl est environ 5 fois plus élevée que celle analysée par la méthode micro-Kjeldahl.

2.Principe

Pour la détermination de l'azote, selon l'AOAC (1995 ; 1999) ; l'échantillon est digéré (minéralisé) en utilisant de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur pour transformer l'échantillon azoté en sulfate d'ammonium. La solution acide est alcalinisée avec de l'hydroxyde de sodium (les ions ammonium sont transformés en ammoniac). Les sels d'ammonium sont distillés et récoltés dans un excès de solution d'acide borique, ceci suivi d'une titration avec la solution d'acide sulfurique. Pour détermination de la protéine brute, l'azote est multiplié par le facteur 6,25.

3.Équipement

- Balance d'analyse électronique, précise à 0,1 mg près.
- Tubes de digestion adaptés à l'unité Kjeldahl de digestion.
- Unité Kjeldahl de digestion avec tubulure pour rejet de fumées.
- Appareil Kjeldahl de distillation.
- Unité de Titration.



Figure 05; Minéralisateur et distillateur de Kjeldhal (Djouza, 2014)

4. Réactifs

- Acide sulfurique (H_2SO_4) concentré 95-98%.
- Solution NaOH, 40%.
- Acide chlorhydrique standard (HCl a 0.1N), solution volumétrique, $c = 0,1 M$ (précision à 0,1000 M).
- Catalyseur (80g de sulfate de potassium +20g sulfate de cuivre + 2g de sélénium)
- Solution de réception (par litre de solution): dissoudre 40 g d'acide borique dans un peu d'eau distillée puis ajouter 10ml d'une solution de colorant RB (200mg de bleu de méthylène et 100mg de rouge de méthyle dans 100 ml d'alcool à 95°), le tout est porté à 1000ml.

5. Procédure

5.1 Minéralisation (Digestion)

- Peser avec précision de l'ordre de 500mg d'échantillon (après homogénéisation) sur papier joseph (papier fabriqué sans azote) plié en papillote et introduit dans les matras et ajouter le catalyseur.
- Ajouter très lentement et en agitant 20ml de H_2SO_4 concentré. Cette opération doit être absolument effectuée avec précaution : travailler sous hotte, à ne pas orienter le tube ou la fiole au moment de l'ajout de l'acide vers la direction du visage et porter des gants, des lunettes et un tablier de protection.

- Mettre sur rampe de minéralisation chauffée à 420 - 450°C. Démarrer le système d'aspiration des vapeurs. Généralement, le démarrage de la minéralisation s'accompagne d'une formation de mousses qui peuvent parfois déborder le matras. Pour éviter des pertes, il est conseillé de retirer le support des tubes pour les laisser se refroidir 5 à 10 minutes puis les remettre de nouveau.
- Arrêter la rampe minéralisation lorsque la solution devienne limpide (vert pâle) et laisser refroidir environ 15 à 20 minutes (ne pas arrêter immédiatement l'aspirateur des vapeurs).
- Ajouter lentement et en agitant 150 ml d'eau distillée (en cas de formation d'un précipité, il faut agiter vivement le matras pour le dissoudre) (**Le Coq, 1965**)

5.2. Distillation et titration

- Mettre dans un erlenmeyer 50 ml de solution de réception. Placer l'erlenmeyer au-dessous de l'unité de distillation. Placer la fiole sur l'unité de distillation tout en fixant convenablement le bouchon puis transvaser 70 ml de soude (il est conseillé parfois de mettre quelques pièces de pierres penses pour éviter l'éclatement des fioles au moment de l'ébullition). Mettre en marche la distillation jusqu'à l'obtention de 200 ml de solution verdâtre dans l'erlenmeyer (ne pas oublier de mettre en marche le system de réfrigération)
- Titrer le contenu de l'erlenmeyer avec une solution de HCl à 0,1N jusqu'au virage de la couleur du vert au gris sale.

D'autre part, il est absolument nécessaire de réaliser durant chaque série d'analyses des blancs afin d'éviter l'effet éventuel de toute sorte d'impuretés pouvant exister notamment dans les réactifs sur les résultats ultérieurs. Ces analyses blanches consistent à suivre les différentes étapes de la méthode, mais en l'absence de l'échantillon à analyser.

6. Calcul

La teneur en azote ou en MAT de l'échantillon est ainsi calculée comme suit :

$$\%N = (((V - V_0) \times N \times 14,01) / PE \times MS a) \times 100$$

$$\%MAT = \%N \times 6,25$$

V : nombre de ml d'HCl utilisé pour la titration de l'échantillon

V₀ : nombre moyen de ml d'HCl utilisé pour la titration des blancs

N : normalité de l'HCl utilisé

14,01 : facteur d'équivalence, 1 ml d'HCl 1N titre 14,01 mg d'azote

PE : prise d'essai (mg)

MSa: % MSa / 100.

Calcul pourcentage Protéine brute (% CP)

$\% \text{ MPB} = \% \text{ N} \times F$

où,

- ✓ F = 6,25 pour tous fourrages, aliments pour animaux et mélanges alimentaires,
- ✓ F = 5,70 pour les grains, et
- ✓ F = 6,38 pour lait et produits laitiers.

TP n°06 : DETERMINATION DE LA MATIERE GRASSE BRUTE (MG)

– METHODE D'EXTRACTION A L'ETHER_

1. Introduction

Les lipides produisent environ 2,25 fois plus d'énergie que les hydrates de carbone. Cependant la grande majorité de l'énergie des fourrages et des concentrés provient des hydrates de carbone. Les matières lipidiques contiennent les lipides et d'autres substances (par exemple, des phospholipides, stéroïdes, cires, alcaloïdes, acides organiques, pigments et vitamines liposolubles) qui sont solubles dans les solvants organiques. Elles sont souvent mesurées par la méthode d'extraction à l'éther. La matière grasse brute, également connue sous le nom d'extrait d'éther, est l'extraction au Soxhlet de l'échantillon avec de l'éther de pétrole (AOAC, 1990) ou d'autres solvants hexane.

2.Principe

Un échantillon séché et broyé est extrait avec de l'éther di éthylique qui dissout les graisses, huiles, pigments et autres substances liposolubles. L'éther est ensuite évaporé de la solution grasse. Le résidu résultant est pesé et appelé extrait d'éther ou graisse brute. L'éther et les échantillons doivent être exempts d'humidité pour éviter la co-extraction de composants hydrosolubles dans l'échantillon tels que les glucides, l'urée, l'acide lactique, le glycérol, etc.

3. Équipement

- 3.1 Balance pour analyse, précise à 0.1 mg près.
- 3.2. Extracteur du type Soxhlet composé d'un ballon récepteur à col rodé et d'un réfrigérant à reflux « unité de reflux » permettant de condenser le solvant évaporé avant de tomber dans un extracteur qui est muni d'un système de siphonage permettant de transvaser l'éther dans le ballon. Cet extracteur doit héberger une cartouche en carton poreux “ dés d'extraction exempt de graisse et lavés à l'éther “ dans laquelle est déposée la matière à extraire
- 3.3. Plaques chauffantes adaptées aux ballons récepteurs



Figure 06 : Appareil Soxhlet (Djouza, 2014)

4. Réactifs

- ✓ 4.1 Ether de pétrole léger (température d'ébullition 40-60 °C) ou éther di_éthylique, purifié pour extraction de lipides (i.e. le résidu d'évaporation sera inférieur à 20 mg/litre).

- Consignes de sécurité et mesures spécifiques

- N'ayez pas de flammes nues à proximité.
- Évitez d'inhaler les vapeurs d'éther.
- Stockez l'éther dans des récipients métalliques.
- Manipulez les contenants ouverts (bidons de réactifs et béciers à graisse) sous une hotte.
- Effectuez les extractions dans un endroit bien ventilé.
- Assurez-vous que tout l'éther est évaporé des béciers avant de les placer dans le four pour éviter un incendie ou une explosion.

5.Procédure

- Peser avec précision de 2 g d'échantillon séché et broyé à 1 mm dans une cartouche propre
- Mettre la cartouche avec son contenu dans l'extracteur (le bord supérieur doit être au-dessus du niveau du siphon)
- Introduire 160 ml d'éther di-éthylique dans le ballon à col rodé préalablement taré

- Installer l'extracteur sur le ballon et mettre le tout au-dessous du réfrigérant
- Faire circuler l'eau dans les réfrigérants et allumer les plaques. Il faut noter qu'il est absolument nécessaire que l'appareil de Soxhlet soit bien protégé sous une hotte qui doit être loin de toute source de feu. L'éther est un solvant très volatil est rapidement inflammable.
- Arrêter l'ébullition quand le niveau de l'éther condensé dans l'extracteur est un peu au-dessous du niveau de siphon, retirer la cartouche soigneusement sans perdre les particules de l'échantillon et vider l'éther que contient l'extracteur. La durée d'extraction est de 8 h
- Remettre le tout en ébullition mais sans la cartouche pour recueillir le maximum d'éther dans l'extracteur. Il faut rapidement retirer le ballon muni de l'extracteur avant qu'il soit sec (avec un peu d'éther à l'intérieur) et ceci pour éviter non seulement les risques d'explosion, mais aussi les projections de l'éther dans le ballon et par conséquent la carbonisation de la matière grasse
- Sécher le ballon contenant l'extrait et le peu d'éther dans l'étuve 105°C durant une nuit (laisser la porte de l'étuve légèrement ouverte durant les 15 premières minutes)
- Peser le ballon après refroidissement (le refroidissement peut être fait à l'aire ambiante sauf que le ballon doit être muni de son bouchon).

6. Calcul

Le pourcentage d'extrait étheré est ainsi obtenu comme suit :

$$\%MG = ((P2 - P1) / PE \times MS_a) \times 100$$

P1 : poids du ballon vide (g)

P2 : poids du ballon après séchage à l'étuve 105°C (g)

PE : prise d'essai (g).

MS_a : %MS_a/100.

Références bibliographiques

1. AOAC (1990). The Association of Official Analytical Chemists official methods of analysis. 15 ed, VA : AOAC International, Arlington (USA).
2. AOAC (1995). The Association of Official Analytical Chemists official methods of analysis. 16 ed, VA : AOAC International, Arlington (USA).
3. AOAC (1999). The Association of Official Analytical Chemists official methods of analysis. 16 Ed, 5e révision VA : AOAC International, Gaithersburg MD (USA).
4. Djouza L., 2014. Contribution à l'estimation de la productivité pastorale de l'alfa (*Stipa tenacissima L.*) dans les parcours steppiques de la wilaya de Djelfa. Mémoire de master, Université de Batna 1. 97p
5. Goering et Van Soest, 1970 ; Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA Handbook (Washington, DC, USA). 379, 20 p.
6. Jarrige R.; Demarquilly C.;Dulphy J. P. (1982) La conservation des fourrages. Bull. Tchn. C.R.Z.V Theix, I.N.R.A., 50, 5-32.
7. Le Coq R. (1965). Manuel d'analyses alimentaire et d'expertises usuelles. Edition Doin. Deren et Cie. Tome II. Paris, 241-251.
8. Van Soest P.J.; Robertson J. B.; Lewis B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583-3597.
9. <https://www.web-agri.fr/fourrage/article/165868/herbe-ensilage-enrubannage-foin-comment-prelever-un-bon-echantillon-> « site 1 »