

UR XXXX - YYYY	Protocole de fractionnement biochimique de la Matière Organique par solubilisations successives (procédure de Van Soest)	Version : 1 Date : mars 04 Page : 1/10
----------------	---	--

Document rédigé par Fabien VEDRENNE	Date de rédaction : 02/03/2004
-------------------------------------	--------------------------------

SOMMAIRE

<i>SOMMAIRE</i>	1
1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION	2
2 TERMINOLOGIE ET ABRÉVIATIONS	2
3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE	2
4 DOCUMENTS ASSOCIES ET ANNEXES A LA PROCEDURE	3
5 AUTRES	3
5.1 Matériel Nécessaire	3
5.1.1 Inventaire du matériel	3
5.1.2 Préceptes d'utilisation de l'extracteur	3
5.1.2.1 Installation	3
5.1.2.2 Mise en place des creusets	3
5.1.2.3 Position des vannes	3
5.2 Réactifs nécessaires	4
5.3 Prétraitement de l'échantillon	4
5.4 Eléments de méthode	5
5.4.1 Mode opératoire de l'extraction séquentielle selon Van Soest	5
5.4.1.1 Extraction 1 → Fraction NDS	5
5.4.1.2 Extraction 2 → Fraction Hémicellulose	6
5.4.1.3 Extraction 3 → Cellulose	6
5.4.1.4 Perte au feu → Lignine	6
5.4.2 Sécurité	7
5.4.2.1 Pour l'opérateur	7
5.4.2.2 Pour le matériel	7

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Le présent document spécifie la procédure pour la détermination des contenus en hémicellulose, cellulose et lignine du lisier sec selon le protocole d'extraction de van Soest.

Les végétaux et leurs co-produits sont composés de substances appartenant à différentes catégories de glucides, lipides, protéines, de polymères de lignine ainsi que de matière minérale.

Le dosage des différents composants glucidiques est réalisé par une série d'extractions avec des réactifs neutres et acides, chacun étant capable d'extraire une famille de composants en laissant les autres intacts (ou presque).

Le protocole de van Soest met en évidence 4 fractions organiques en utilisant 3 solutions d'extraction.

L'utilisation d'un extracteur conçu dans ce but tel que le FIWE simplifie la standardisation des conditions d'analyse.

2 TERMINOLOGIE ET ABRÉVIATIONS

Les fractions solubilisées sont exprimées en pourcentage du substrat sec.

NDF_{org} (Neutral Detergent Fiber) : composés organiques non solubles dans le détergent neutre appelé aussi NDF. Le NDF_{org} est théoriquement la somme des polymères suivants : cellulose, hémicellulose et lignine, ainsi qu'une partie des pectines.

NDS_{org} (Neutral Detergent Solubles) : composés organiques solubles dans le détergent NDF. Le NDS_{org} est théoriquement la somme de la majorité des protéines, des sucres non pariétaux et de matières grasses.

ADF_{org} (Acid Detergent Fiber) : composés organiques non solubles dans le détergent acide appelé aussi ADF. L'ADF_{org} est théoriquement la somme des polymères suivants : cellulose, lignine. Ainsi, la différence NDF_{org} - ADF_{org} est une approximation des hémicelluloses.

ADL_{org} (Acid Detergent Lignin) : lignine sulfurique.
L'ADL_{org} est théoriquement la somme des lignines et des cutines.
La différence ADF_{org} - ADL_{org} est une approximation de la cellulose.

MS : Matière sèche

MO : Matière Organique

3 DOCUMENTS DE RÉFÉRENCE

Harmonization in Rabbit Feed Evaluation – Guideline for Chemical Analyses of Feeds and Faeces. E.G.R.A.N. Internal Report. N°1.

Mode d'emploi de l'extracteur de fibre dosage du contenu en fibre brute. FIWE. VELP SCIENTIFICA.

Intérêt de la caractérisation biochimique pour l'évaluation de la proportion de matière organique stable après décomposition dans le sol et la classification des produits organominéraux. Robin. Agronomie. 1997.

Use of a detergent in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. Van Soest et Wine. Journal of the AOAC. 1967.

Travail de normalisation (P. Mallard).

4 DOCUMENTS ASSOCIES ET ANNEXES A LA PROCEDURE

Voir schéma récapitulatif des extractions successives en Annexe 1.

5 AUTRES

5.1 MATERIEL NECESSAIRE

5.1.1 Inventaire du matériel

- Extracteur de fibre FIWE à 6 positions
- Creusets en verre de qualité 2, avec des frittés ayant des pores de 45µm (40 à 60 µm)
- Eau déminéralisée et bouilloire électrique
- Etuve à 105°C
- Four à 550°C
- Dessicateur
- Papier pH
- Balance de précision au 1/1000^{ème}
- Pince protection brûlure
- Masque, Gants et Lunettes
- Hotte

5.1.2 Préceptes d'utilisation de l'extracteur

5.1.2.1 Installation

4 raccordements doivent être établis à l'arrière de l'appareil :

- **Inlet** : brancher le tuyau fourni sur l'eau du robinet pour le refroidissement (débit environ 2 litres par minute)
- **Vacuum** : brancher un tube en silicone sur la connexion supérieure de la pompe et le diriger vers la sortie (évier)
- **Discharge** : brancher un tube en PVC pour l'écoulement de l'eau de refroidissement (vers évier)
- **Discharge** : brancher un tube en PVC pour l'écoulement des éventuelles fuites.

5.1.2.2 Mise en place des creusets

- Disposer les creusets référencés au centre de chaque logement le plus verticalement possible avec le levier en position haute.
- Abaisser le levier. Si celui-ci reste en position basse c'est que les creusets sont disposés correctement ; dans le cas contraire, ne pas forcer et redisposer les creusets. De plus, les creusets sont rangés par jeux de 6 et il conviendra de respecter ces jeux pour les extractions. En effet, la hauteur des creusets doit être identique à $\pm 0,2\text{mm}$ sans quoi des fuites peuvent survenir.
- Ouvrir le robinet d'eau et régler le débit sur environ 2 l/min.
- Mettre l'appareil sous tension à l'aide du commutateur d'alimentation, les lampes incorporées s'allument.
- Régler la capacité de chauffage à l'aide du régulateur de tension présent à l'avant de l'appareil (0 à 100%).
- Régler la minuterie présente à l'avant de l'appareil (0 à 60min). Il faut noter que la sonnerie de la minuterie indiquant la fin de la durée d'extraction ne stoppe pas le chauffage. Son rôle n'est donc qu'informatif.
- ALLUMER LA HOTTE !

5.1.2.3 Position des vannes

- **Fermée** : lorsque le contenu du creuset doit être porté à ébullition
- **Pression** : permet une admission d'air comprimé par le bas du verre fritté des creusets pour permettre de mélanger leur contenu. Il faut être vigilant, lors de l'utilisation de cette position, que le contenu du creuset ne soit pas projeté au delà des condenseurs à eau.

- **Vide** : la connexion au vide permet l'évacuation des réactifs puis de l'eau des rinçages.



Le positionnement des vannes est indépendant sous chaque creuset. Les filtrations peuvent se faire indépendamment si un colmatage est redouté.

5.2 REACTIFS NECESSAIRES

1. Solution de Détergent Neutre (NDS) : une solution commerciale existe

- Eau distillée qsp 1 L
- Sodium lauryl sulfate 30 g
- Disodium éthylène-diamine-tétraacétate (EDTA) 18.61 g
- Sodium borate decahydrate 6.81 g
- Disodium hydrogène phosphate anhydre 4.65 g
- Triéthylène glycol 10 ml
- Ajuster le pH entre 6.9 et 7.1

2. Solution de Détergent Acide (ADS) : Une solution commerciale existe

- 1 L de solution d'acide sulfurique à 1M (soit 49.04 g/L)
- 20 g de cétyl triméthylammonium bromide hexadecyltriméthylammonium bromure.
- 26.7 ml d'acide sulfurique concentré

3. Solution Acide Détergente pour Lignine (ADL) : une solution commerciale existe

- acide sulfurique à 72% (w/w)
- ajuster la densité de la solution à $d = 1,634$

4. Acétone (99%)

5. n-octanol

6. Eau déminéralisée

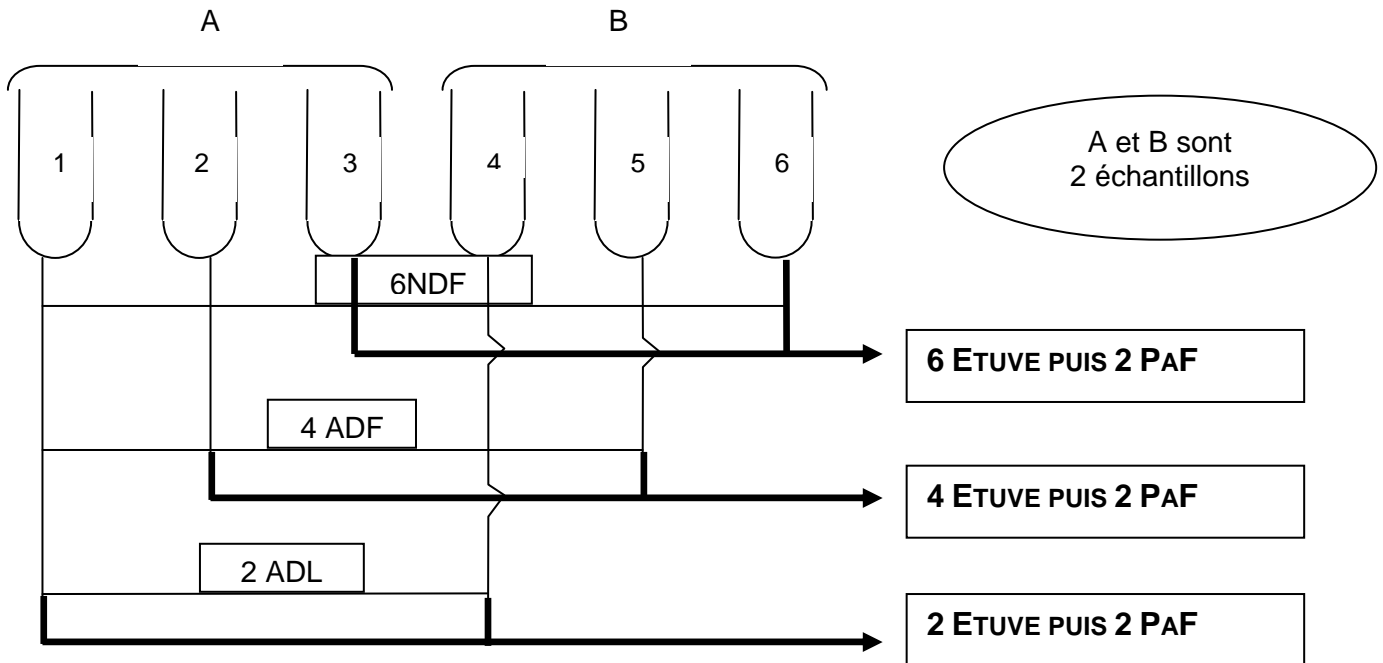
5.3 PRETRAITEMENT DE L'ECHANTILLON

- Sécher les échantillons dans une étuve à 105°C jus qu'à masse constante ou le lyophiliser (pour exprimer les résultats en poids frais, le contenu en humidité doit être déterminé).
- Broyer le résidu sec pour que les particules n'excèdent pas 1 mm.

5.4 ELEMENTS DE METHODE

5.4.1 Mode opératoire de l'extraction séquentielle selon Van Soest

Le schéma ci-dessous présente les extractions successives ainsi que le devenir de chaque creuset.



Chaque échantillon est représenté par 3 creusets, non pas pour des tests de reproductibilité mais pour apprécier les extractions conjointes de la matière minérale avec les fractions organiques recherchées. Il sera ensuite indispensable de soustraire ces fractions minérales pour la justesse des résultats !

5.4.1.1 Extraction 1 → Fraction NDS

- Mettre les 6 creusets vides au four à 550°C pendant t 4h.
- Les transférer dans le dessiccateur une fois leur température redescendue à 100°C environ (attention aux chocs thermiques !).
- Les peser (avec 1g d'auxiliaire de filtration si des essais préalable ont révélé un colmatage du fritté).
- Peser 1g d'échantillon sec maximum (W_0 précision $\pm 0.0001g$) dans chacun des 6 creusets secs et propres.
- Placer les 6 creusets sous les condenseurs à eau de l'extracteur.
- (Ajouter 100 ml d'eau préchauffée à ébullition + 2-3 gouttes de n-octanol. Maintenir en ébullition pendant 30 min.
- Eliminer l'eau par filtration et laver 5 fois à l'eau chaude.)
- Ajouter 100 ml de solution de détergent Neutre à température ambiante puis chauffer à ébullition sous reflux pendant 60 min à partir du début de l'ébullition.
- Filtrer la solution et laver 10 fois avec de l'eau distillée bouillante puis 3 fois à l'acétone.
- Transférer les creusets dans un dessiccateur et les peser (W_1) après refroidissement (10min).
- Mettre les creusets 3 et 6 de côté puis les transférer dans le four à 550°C pour calcination.
- Transférer les 2 creusets dans un dessiccateur et les peser (W_1) après refroidissement (10min).(attention au choc thermique).

➔ **La masse perdue correspond à la Fraction Soluble totale de l'échantillon.**

On peut écrire que : $NDS_{total} = NDS_{organique} + NDS_{minéral}$

Soit : $NDS_{organique} = NDS_{total} - NDS_{minéral}$

Le résidu, appelé **NDF** (Neutral Detergent Fibers) est constitué de fibres (cellulose, hémicelluloses et lignine) ainsi que de matières minérales non solubles.

5.4.1.2 Extraction 2 → Fraction Hémicellulose

- Disperser les résidus NDF des creusets 1 – 2 – 4 et 5.
- Ajouter 100 ml de la solution de détergent Acide à température ambiante et chauffer à ébullition sous reflux pendant 60 minutes à partir du début de l'ébullition (ébullition modérée et constante).
- Filtrer la solution et laver 10 fois avec de l'eau distillée bouillante puis 3 fois à l'acétone.
- Déposer les 4 creusets à 105°C pendant 6h minimum puis les peser.
- Mettre les creusets 2 et 5 de côté puis les transférer dans le four à 550°C pour calcination.
- Transférer les 2 creusets dans un dessiccateur et les peser (W_2) après refroidissement (10min).

→ La masse perdue correspond à la fraction Hémicellulosique + Mat Minérale extractible dans ce solvant.

Ainsi, $ADF_{organique} = ADF_{total} - ADF_{minéral}$

5.4.1.3 Extraction 3 → Cellulose

- Disposer les creusets 1 et 4 dans un cristalliseur [ou dans l'unité d'extraction].
- Remplir les 2 creusets de la solution d'acide sulfurique (soit environ 25ml).
- Maintenir immergé pendant 3h en rajoutant de l'acide si nécessaire.
- Utiliser une tige de verre [ou l'air comprimé] pour remuer dans le creuset au moins une fois par heure.
- 3h après l'ajout initial de la solution d'acide sulfurique, filtrer et laver 10 fois avec de l'eau distillée bouillante et vérifier que le filtrat est revenu à un pH proche de l'eau de rinçage (papier pH) puis rincer 3 fois à l'acétone.
- Déposer les creusets à 105°C pendant 6h minimum.
- Transférer les creusets dans un dessiccateur et les peser (W_3) après refroidissement (10min).

→ La masse perdue correspond à la fraction cellulosique + Mat Min extractible dans ce solvant.

Ainsi, $ADL_{organique} = ADL_{total} - ADL_{minéral}$

5.4.1.4 Perte au feu → Lignine

- Transférer les creusets 1 et 4 dans le four à 550°C pour calcination.
- Transférer les creusets dans un dessiccateur et les peser (W_4) après refroidissement (10min).

→ La masse perdue correspond à la fraction de lignine.

→ Cette procédure permet de distinguer 4 fractions organiques et celle Minérale :

- $NDF_{organique} = \text{hémicellulose} + \text{cellulose} + \text{lignine}$
- $ADF_{organique} = \text{cellulose} + \text{lignine}$
- $ADL_{organique} = \text{lignine}$

Ainsi,

- $\text{Cellulose} = ADF_{organique} - ADL_{organique}$

- Hémicellulose = $NDF_{organique} - ADF_{organique}$
- Protéines + amidon + sucre simples + mat grasse = $MO - NDF_{organique}$.

5.4.2 Sécurité

5.4.2.1 Pour l'opérateur



L'USAGE DE REACTIFS CHIMIQUES NECESSITE DES PRECAUTIONS INDISPENSABLES A VOTRE SECURITE : LUNETTES, GANTS, MASQUES, HOTTE EN ETAT DE MARCHÉ ET TRAVAIL REFLECHI.

Les étapes les plus critiques sont :

- Nettoyage des creusets.

Les procédures d'oxydation nécessitent des solutions diverses d'acides chromique, sulfonitrique, nitreux ou nitrique. Tous ces traitements doivent être effectués sous une hotte aspirante du fait de la toxicité très élevée des vapeurs nitriques-nitreuses libérées. De plus, lors de l'utilisation de l'acide nitrique, se protéger les mains avec des gants en PVC et non en caoutchouc qui est attaqué.

- Brûlure

Pendant et après les phases de chauffage, les creusets sont brûlants ainsi que les armatures métalliques. D'autre part, la façade amovible qui permet une bonne homogénéité thermique est elle aussi brûlante. Veillez à réfléchir à vos gestes. Une pince adhérente (liège) est mise à disposition si vous avez à prélever les creusets chauds.

- Réactifs

Ils peuvent émettre des vapeurs toxiques donc veillez à travailler sous une hotte fermée et en mode de fonctionnement.

- Risques électriques

Cet appareil est sous tension et est proche d'une source d'eau donc il n'y a pas de risque zéro.

5.4.2.2 Pour le matériel



La réussite des extractions est liée au bon état du matériel (creusets, joints, ...) qui résisteront d'autant mieux aux fortes températures et aux tensions sous vide qu'ils sont respectivement non rayés et propres.

- Les creusets et la minéralisation

Le chauffage et le refroidissement du verre effectués trop rapidement produisent des tensions dans les différentes parties, ce qui peut les faire casser, surtout aux endroits rayés ou très tâchés comme la zone de connexion entre le corps du creuset et le filtre en forme de disque. Une température de 550°C ne devra pas être dépassée.

Les vitesses maximum de chauffage et de refroidissement des creusets en verre sont les suivantes :

Chauffage °C	Refroidissement °C	Vitesse °C/min	Temp s nécessaire
20 → 350	350 → 20	350	1
350 → 480	480 → 350	24	6
480 → 550	550 → 480	12	6

- Les creusets et leur nettoyage mécanique

Le nettoyage mécanique peut entraîner des rayures réduisant la solidité du verre. Donc éviter les rayures, surtout à proximité de la connexion du corps du creuset et du filtre en forme de disque, car cette zone subit un maximum de tension sous vide.

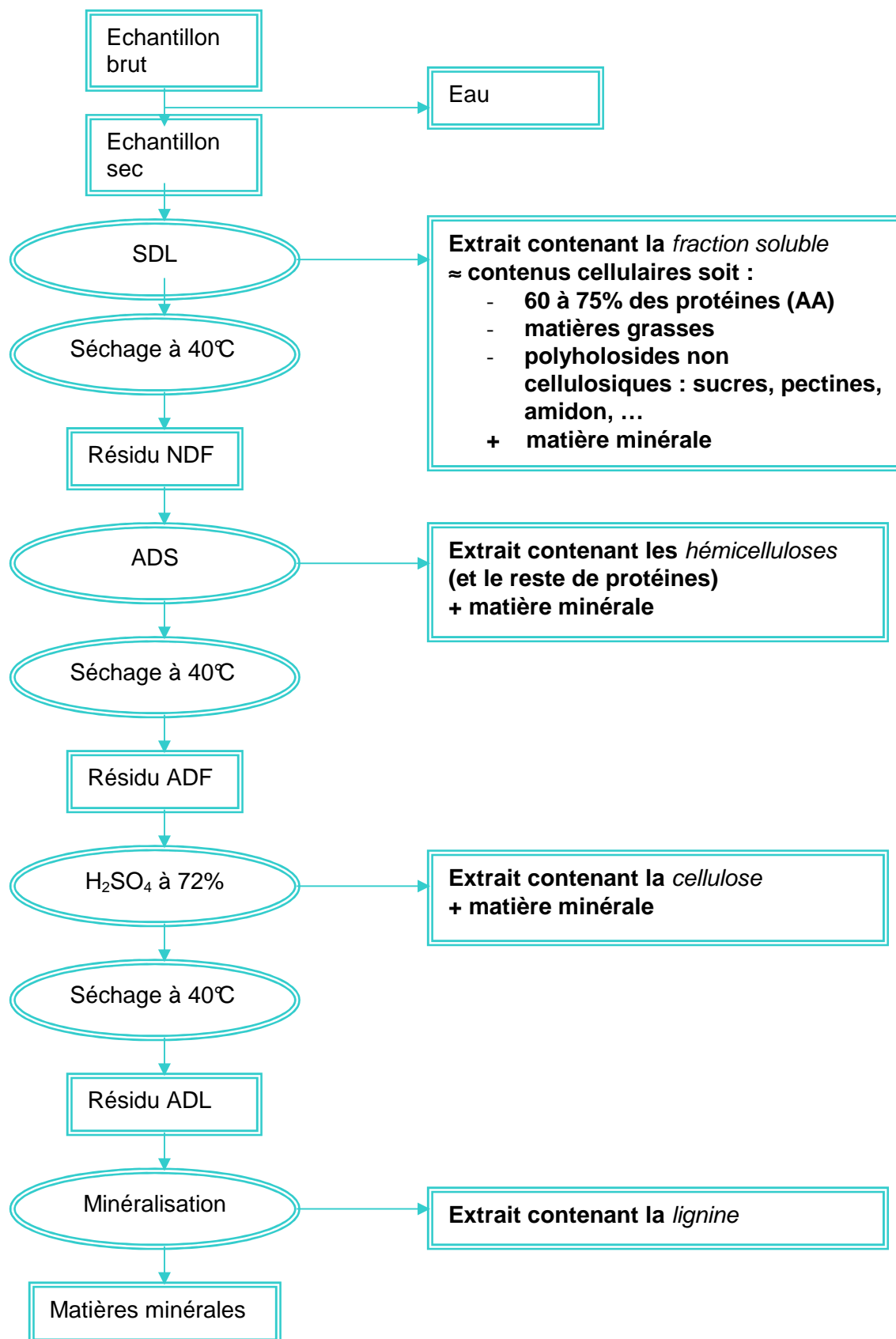
- Les joints entre les condenseurs et les creusets

A la fin de chaque extraction, sécher au moyen d'un papier les joints pour que ceux-ci ne soient

pas encrassés et jouent leurs rôle d'étanchéité pour les futures extractions.



De façon plus générale, toutes coulures, fuites ou débordements doivent être essuyer pour rendre l'appareil aussi propre que lorsque vous l'avez trouvé.

Annexe 1 : Extraction séquentielle des fractions organiques selon le protocole de Van Soest (1967)

Annexe 2 : Détermination des fractions carbonées et de la matière minérale extraite lors de l'application du protocole de Van Soest.

Les résultats nous montrent que la matière minérale est extraite conjointement à la matière organique qui seule nous intéresse. Comme il a été dit dans le protocole ci-dessus, chaque échantillon devra être représenté par 3 creusets (3 répliqués) et la teneur en matière minérale initiale (MMT) de l'échantillon devra être connue. Les 3 creusets subiront la première extraction au NDF. Ensuite 1 creuset permettra d'estimer la matière volatile (perte au feu 1 : PaF1) restante tandis que les 2 autres subiront la seconde extraction au ADF. Ensuite 1 creuset permettra d'estimer la matière volatile restante (PaF2) tandis que le dernier creuset subira la dernière extraction au ADL. Ensuite ce creuset permettra d'estimer la matière organique restante (PaF3).

La PaF3 permet de déterminer le contenu en **Lignine** et une quantité x de matière minérale insoluble.

La différence PaF3-PaF2 permet de connaître le contenu en **Cellulose**. Cette valeur est alors à comparer avec celle de l'extraction. La différence de masse correspond à une quantité y de matière minérale soluble dans le solvant ADL.

La différence PaF1-PaF2 permet de connaître le contenu en **Hémicellulose**. Cette valeur est à comparer avec la fraction extraite par le solvant ADS. La différence correspond à une quantité z de matière minérale soluble dans le solvant ADS.

La fraction organique soluble dans le solvant peut enfin être déterminée. Elle correspond à la différence entre la fraction extraite par le solvant (NDF) et la matière minérale totale de l'échantillon (MMT) retranchée des fractions x, y et z. soit : **NDS orga** = NDF - (MMT - x - y - z).

Il convient de vérifier, au final, que l'on a bien :

$$100\%MS = \text{NDS organique} + \text{Hémicellulose} + \text{Cellulose} + \text{Lignine} + \text{MMT}$$