

DOSAGE DU FER DANS LA

SPIRULINE

I. Introduction	1
II. Préparation et mise en place	2
III. Mise en culture de la spiruline en bioréacteur.....	2
A. Production en Biofermenteur	2
B. Culture de la Spiruline	3
C. Renouvellement de la souche.....	3
D. Enrichissement en Fer de la souche	3
E. Conclusion.....	4
IV. Extraction	4
A. Préparation des échantillons	4
B. Extraction	5
C. Problèmes de quantité.....	5
V. Analyses	6
A. Dosage	6
B. Résultats.....	7
C. Discussion et interprétation.....	9
VI. Conclusion.....	10

I. Introduction

Dans le cadre de notre formation de BTSA ANABIOTEC (Analyses biologiques et biotechnologiques), nous avons créé un projet expérimental (M58) visant à mettre en place un protocole d'analyse.

Plusieurs sujets se sont présentés à nous, mais c'est l'étude de la spiruline qui a retenu notre attention. Ayant déjà étudié ce sujet dans les années antérieures, nous connaissions son potentiel et nous souhaitions l'exploiter. En effet, la spiruline est une micro-algue qui est considéré comme étant un super-aliment et un bon complément alimentaire (régulièrement consommé par les populations des pays sous-développés). La spiruline est très riche en oligo-élément (Zinc, Magnésium, Potassium, Fer...), en pigment (chlorophylle A & B, caroténoïde et xanthophylle), en vitamines (elle contient toutes les vitamines sauf la vitamine C) et riche en acides aminés essentiels. Elle contribue, entre autre, à booster le système immunitaire, à réduire le cholestérol et les maladies cardiovasculaires et ralentir le vieillissement de la peau. La consommation de cette micro-algue permet de rééquilibrer les carences de notre organisme. A titre d'exemple, une personne anémique par carences de fer, en consommant de la spiruline pourra ré-augmenter son taux de fer dans le sang. C'est sur ce constat que nous avons décidé de produire une Spiruline plus riche en fer et ensuite d'entreprendre le dosage du fer sur ce complément alimentaire.

Pour mener à bien notre projet, nous avons sollicité Mr Regis GENEVE, algoculteur de la Drôme et dirigeant de la « Spiruline du Dauphiné ». Nous avons donc créée un partenariat avec cette entreprise dans le but de répondre à une des problématiques de Mr GENEVE. En premier lieu, il cherchait à doser le taux de fer exact de la spiruline qu'il produit, ne connaissant que les valeurs moyennes théoriques. Dans un second temps, il souhaitait enrichir une partie de sa production en fer, afin de viser un public anémique et/ou sportif.

Suite à de nombreux échanges avec Mr GENEVE, nous avons convenu à une culture de ces micro-algues en bioréacteur, à partir d'un échantillon d'un de ces trois bassins de production.

De ce fait nous avons mis en place deux bioréactions :

- Une culture de spiruline enrichis en fer ;
- Une culture de spiruline normale ;

II. Préparation et mise en place

Un mois avant les deux semaines de M58 (du 23 mars 2015 au 3 avril 2015), nous avons préparé les cultures de Spiruline en biofermenteurs, afin d'obtenir les quantités nécessaires de cette microalgue pour les échantillons lors des dosages en Fer.

Pour cette première mise en culture nous avons sollicité la présence de Mr GENEVE Régis, pour qu'il puisse nous guider lors de cette manipulation délicate. Il nous a également fait part de son expérience et de son savoir-faire en ce qui concerne les conditions de culture (température, ajout des nutriments, pH...) et le suivi des cultures.

C'est lors de ce rendez-vous que Mr GENEVE nous a fournis la souche de Spiruline et les nutriments nécessaires au développement optimal de la microalgue.

Dès l'arrivée de cette souche de Spiruline, avant la mise en culture, nous avons réalisé différentes analyses. Nous avons analysé le pH, la conductivité, la température, la salinité et la densité. De ce fait nous avons obtenu les caractéristiques physico-chimiques de la Spiruline.

Analyses	pH	Conductivité	Température	Salinité	Densité
Résultats	10,10	19,70 m.S	5°C	19,556	10,14

III. Mise en culture de la spiruline en bioréacteur

A. Production en Biofermenteur

Les productions se sont réalisées dans deux biofermenteurs différents, dont un sera enrichi en fer plus tard. Afin de ne pas brusquer le développement des Spirulines, nous avons travaillé sur une mise en culture optimal pendant trois jours. Le matin du premier jour nous avons ajouté une dose d'urée afin d'apporter une source d'azote, nous avons utilisé la lumière naturelle, et réglé la température à 15°C. Dans l'après-midi la température a été augmenté à 25°C. A savoir, tout au long de ces trois jours la température a été élevée de manière progressive. Le deuxième jour, nous avons installé une lumière artificielle : un néon, et enfin on a réglé la température à 35°C (température de culture optimal). Pour booster cette production en vue des échantillons à prélever plus tard, nous ajoutons différents nutriments comme du phosphore, du magnésium, du potassium... selon les quantités que Mr GENEVE ajoute dans ces bassins (nous avons établi un rapport de proportionnalité entre ces bassins et nos cuves de biofermenteurs.



B. Culture de la Spiruline

Une fois les biofermenteurs lancés avec la Spiruline, nous avons ajusté différents paramètres afin d'avoir des conditions de cultures optimum. Nous veillons à la vitesse de rotation à l'intérieur de la cuve, il faut que la rotation soit très faible afin de ne pas détruire les microalgues. Le pH est également surveillé, mais ces microalgues ont la capacité de rééquilibrer le pH automatiquement. Pour la veille de la température, des sondes permettent d'indiquer la température réelle à l'intérieur de la cuve et un système de chauffage et de refroidissement se met automatiquement en place afin de maintenir la température la plus juste possible.



C. Renouvellement de la souche

Nous avons rencontré un problème au vu des cultures de Spiruline qui au bout de quatre jours sont devenues jaunes avec une formation de gaz qui produisait des bulles à la surface. Nous avons ouvert les cuves en enlevant une sonde inutile afin de libérer un orifice au-dessus du bioréacteur pour aérer les souches, et approvisionner la Spiruline en Oxygène. Nous avons contrôlé la température à l'aide d'un thermomètre manuel pour s'assurer qu'il ne s'agisse pas d'un dysfonctionnement du biofermenteur. Mais malgré toutes ces précautions nous avons perdus nos cultures de Spiruline ; De ce fait nous avons complètement vidé les deux bioréacteurs. Ce phénomène s'est produit, car nous avons laissé l'enceinte des bioréacteurs hermétique, sans aucun apport d'oxygène. Donc les Spirulines n'ont pas pu se développer, elles ont fermenté. Devant cette perte de nos souches, nous avons recontacté Mr GENEVE afin qu'il puisse nous réapprovisionner en Spiruline de son exploitation, et en nutriments (potassium, magnésium, urée, phosphate et également en Fer ferleaf, que nous utilisons pour enrichir en Fer notre production). A la suite de ce problème, nous avons créé un circuit d'air dans l'enceinte des bioréacteurs, afin de fournir l'oxygène nécessaire au développement des microalgues. Un bulleur a aussi été rajouté nous l'avons fait fonctionner le matin pour l'un des bioreacteur et l'après-midi pour l'autre. Les néons se sont vus ajoutés des programmeurs pour assurer une bonne luminosité durant toute la journée (de 7h à 16h).

D. Enrichissement en Fer de la souche

Il faut savoir qu'au départ les deux bioréacteurs se sont vu ajoutés une dose de ferleaf afin de booster les cultures. Par la suite, une fois par semaine les nutriments étaient ajoutés (magnésium, potassium, phosphate et urée). A raison de trois enrichissements durant les cinq semaines de culture, nous avons ajoutés une dose de Ferleaf dans le bioréacteur 1 afin de tenter d'enrichir cette culture de Spiruline en Fer.

Tableau récapitulatif des ajouts de Ferleaf durant la période d'enrichissement :

	Bioréacteur 1 (enrichis en Fer)
[C] en Ferleaf du 1 ^{ère} ajout Le 11 mars 2015	10 μ L de Ferleaf
[C] en Ferleaf du 2 ^{ème} ajout Le 20 mars 2015	10 μ L de Ferleaf
[C] en Ferleaf du 3 ^{ème} ajout Le 27 mars 2015	20 μ L de Ferleaf

E. Conclusion

Pour la partie production de la Spiruline nous avons eu beaucoup de problèmes, premièrement nous avons perdus notre souche de Spiruline, il a donc fallu vite en relancé une nouvelle. Les nutriments ont aussi posés problèmes car il a fallu prendre en compte les quantités que Mr GENEVE met dans ces bassins et faire le rapport avec la quantité présente dans les cuves des biofermenteurs (1,8L), les valeurs étaient très faibles donc lors de la pesé cela a créé des sources d'erreurs vis-à-vis de la justesse. Egalement, lors de l'ajout du fer dans le bioréacteur 1, nous avons commis une erreur. Nous avons ajouté dix fois plus de Ferleaf que la dose prévus. Cela a ajouté un facteur 10 au résultat final.

IV. Extraction

A. Préparation des échantillons

Dès le début de la mise en culture (le 23 février 2015), nous avons décidé de réaliser un prélèvement par semaine, pour avoir tous nos échantillons prêts à être utilisés pour les analyses lors des deux semaines de M58. Pour chaque prélèvement, dans un premier temps nous arrêtons la rotation du bioréacteur environ 5h avant, afin de permettre aux Spirulines de remonter à la surface et de former une couche assez épaisse.

Une fois la couche formée, cette dernière était récolté à l'aide de spatules. Puis placé dans un entonnoir avec un filtre afin d'enlever l'excédent de milieu. Une fois la Spiruline filtré (toute une nuit de filtration), nous l'avons récolté, et placé dans une boîte de Pétri afin d'étaler la Spiruline pour faciliter le séchage. La boîte de Pétris a été placé dans l'étuve à 44°C afin de faire évaporer le maximum d'eau.



Le lendemain, les boîtes étaient retirés de l'étuve, puis placées au congélateur pour leur bonne conservation avant les analyses.

B. Extraction

Pour extraire le Fer présent dans la Spiruline que l'on cherche à doser, dans un premier temps nous avons testé le protocole d'analyse sur des épinards afin de vérifier si la manipulation fonctionnait correctement.

Suite à ces essais nous avons entamé la minéralisation des échantillons de Spiruline. C'est une manipulation pour laquelle il faut être vigilant car les réactions produites par cette dernière sont exothermiques (produites de la chaleur). Afin de diminuer ce risque nous avons utilisé le minéralisateur Kjeldahl.



Dans un premier temps nous avons pesé les échantillons de Spiruline contenu dans les boîtes de Pétris, puis nous les avons placés dans les tubes du minéralisateur. Nous avons ensuite placé dans les tubes, 5 mL d'acide sulfurique concentré suivis de 12 mL d'acide nitrique concentré également, ce qui a dégagé des vapeurs blanches. On a ensuite mis les tubes à chauffer pendant 30 minutes (temps de minéralisation) puis on les a laissé refroidir avant d'ajouter 1 mL d'acide nitrique concentré. On a ensuite versé le contenu du tube dans un bécher puis on a rincé le tube avec 20 mL d'eau distillée. Ensuite on a ajouté 15 mL de soude à 10 mol dans le bécher et on a mesuré le pH et on l'a ajusté afin d'arriver à un pH de 3 grâce au papier pH. Pour terminer on a versé la solution dans une fiole de 100 mL ajusté au trait de jauge.

C. Problèmes de quantité

Lors des prélèvements, la quantité de Spiruline était très faible, la couche à la surface de la cuve était vraiment très fine ; cela a été un problème car dans le protocole il fallait normalement 5g de produit. C'est pourquoi quand les quantités étaient vraiment insuffisantes nous avons rassemblé des échantillons tels que les échantillons 3 et 4.

Echantillons	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	Echantillon 4	Echantillon 5	Echantillon 6
Masses pesées (en g)	0,28	0,55	0,23	0,08	1,01	1,35

Echantillons rassemblés

V. Analyses

A. Dosage

1) Préparation des solutions :

- ***Solution d'acétate de sodium :***

Dans le protocole, on doit peser 63g d'acétate pour 250mL. Nous avons préparé une solution dans une fiole de 100mL. $(63 \times 100) / 250 = 25,2g$

A l'aide d'un sabot nous avons pesé 25,2g d'acétate de sodium que nous avons placé dans une fiole jaugée de 100 mL et que nous avons dissous dans de l'eau distillée. Une fois la totalité de l'acétate de sodium dissout nous avons complété la fiole jusqu'au traits de jauge avec de l'eau distillée.

- ***Solution de sel de Mohr (fer) :***

A l'aide d'un sabot nous avons pesé 34,84 mg de sel de Mohr que nous avons placé dans une fiole jaugée de 500 mL et que nous avons dissous dans de l'eau distillée. Une fois la totalité du sel de Mohr dissout nous avons complété la fiole jusqu'au traits de jauge avec de l'eau distillée.

- ***Solution de chlorure d'hydroxylamonium à 10% :***

A l'aide d'un sabot nous avons pesé 10,01g de chlorure d'hydroxylamonium que nous avons placé dans une fiole jaugée de 100 mL et que nous avons dissous dans de l'eau distillée. Une fois la totalité du chlorure d'hydroxylamonium dissout nous avons complété la fiole jusqu'au traits de jauge avec de l'eau distillée.

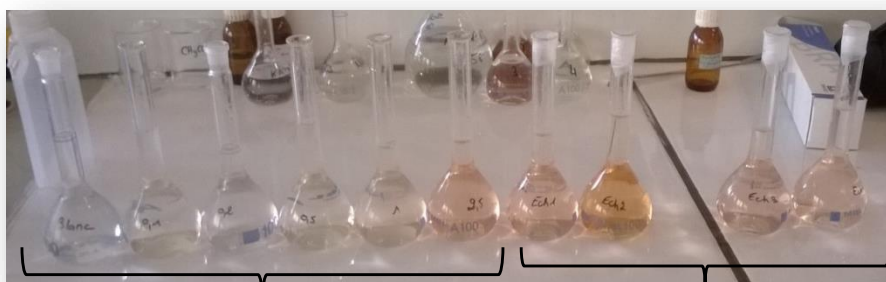
Valeurs données par les préparatrices soit : 10g pour 100mL.

Pour ce qui est de l'acide sulfurique concentré, de l'acide nitrique concentré, de la soude à 10 mol et de l'ortophénantroline nous avons utilisé les solutions préalablement préparés.

2) Mesure de l'absorbance :

Nous avons réalisé une gamme étalon dans des fioles jaugées de 100 mL, qui permet par la suite de réaliser une courbe d'absorbance sur laquelle nous plaçons les valeurs des échantillons de Spiruline.

[Fe]	Fe 10.0mg/L	NH ₃ OHCl	Phénantroline	CH ₃ COONa ⁺
Blanc	0mL	1mL	5mL	8mL
0.1mg.L	1mL	1mL	5mL	8mL
0.2mg.L	2mL	1mL	5mL	8mL
0.5mg.L	5mL	1mL	5mL	8mL
1.0mg.L	10mL	1mL	5mL	8mL
2.5mg.L	25mL	1mL	5mL	8mL



Gamme étalon

Echantillon Spiruline

B. Résultats

Tableau des absorbances :

Gamme étalon		Echantillons dilués au 1/8	
Blanc	0	Blanc	0
0.1mg.L	0.005	Echantillon 1	0.059
0.2mg.L	0.004	Echantillon 2	0.061
0.5mg.L	0.010	Echantillon 3 et 4	0.059
1.0mg.L	0.020	Echantillon 5	0.058
2.5mg.L	0.049	Echantillon 6	0.042

Concentrations en Fer obtenu après obtention des lectures d'absorbances :

	Concentration graphique mg/L	Concentration pour 100mL	[C] fer en mg/100g
Echantillon 1 (F 1 enrichis en Fer)	3,22	0,322	218mg
Echantillon 2 (F 1 enrichis en Fer)	3,32	0,332	482mg
Echantillon 3 et 4 (F 1+2 enrichis et non enrichis en Fer)	3,22	0,322	830mg (Valeur aberrante)
Echantillon 5 (F 1 enrichis en Fer)	3,16	0,316	250,3mg
Echantillon 6 (Echantillon bouteille 2)	2,14	0,214	126mg
	Valeur Norme		150mg/100g

A noter que : - F1 est enrichi en Fer ;

- F2 n'est pas enrichi en Fer ;

- La bouteille 2 contient la deuxième souche brute de Spiruline de Mr GENEVE ;

Concentrations en Fer tout au long de l'enrichissement :

	Bioréacteur 1 (enrichis)	Bioréacteur 2 (non enrichis)
[C] en Fer dans la bouteille de départ	Inoculum 126 mg	Inoculum 126mg
[C] en Fer après 1^{ère} enrichissement Le 11 mars 2015	218mg	145mg
[C] en Fer après 2^{ème} enrichissement Le 20 mars 2015	482mg	145mg
[C] en Fer après 3^{ème} enrichissement Le 27 mars 2015	250,3mg	145mg

Exemple de calcul échantillon 1 :

3,22mg/L soit 0,322mg/100mL

On sait que l'on a pesé une masse réelle de 0,28 g

Ainsi on sait que pour 0,28g de Spiruline on a 0,322mg de fer

On veut savoir le taux de fer pour 100g de Spiruline

$$M=(0,322 \times 100) / 0,28 = 115 \text{mg} / 100\text{g}$$

On prend en compte la dilution au 1/8

$$115 \times 8 = 920 \text{mg} / 100\text{g}$$

Calculs ajout nutriments :

Pour le fer :

10g de fer pour 17000L on veut connaître la quantité de fer pour 1,8L

$$(10 \times 1,8) / 17000 = 0,0011\text{g}$$



Valeurs quantité :

Sulfate de potassium : 0,0042g

Sulfate de magnésium : 0,0032g

Urée : 0,03g

Ferleaf® : 0,0011g pour Spiruline non enrichie et 0,0021g pour Spiruline enrichie.

Phosphate monoammoniacale : 0,0016g

Calculs préparation solutions :

- *Acétate de sodium* : dans le protocole, on doit peser 63g d'acétate pour 250mL. Nous avons préparé une solution dans une fiole de 100mL.

$$(63 \times 100) / 250 = 25,2g$$

- *Fer/Solution de sel de Mohr* : 35mg

- *Chlorure d'hydroxylamonium* : valeurs données par les préparatrices soit : 10g pour 100mL.

C. Discussion et interprétation

Les résultats ne sont pas concluants vis-à-vis des valeurs obtenues qui sont très faibles. Il faut savoir que l'échantillon N°2 a brûlé lors du séchage dans l'étuve à 44°C (durée d'incubation trop élevée), c'est peut-être pour cette raison que la valeur est élevée : 482mg/100g de Spiruline (double de l'échantillon N°1). Les échantillons 3 et 4 ont été rassemblés par manque de quantité lors des prélèvements ; la valeur correspondante à ces échantillons est pour moi aberrante car elle est largement au-dessus des autres : 830mg/100g. Je pense que dans la pratique le fait d'avoir rassemblé ces prélèvements nous a aidé pour la manipulation, mais pour les résultats cela entraîne une erreur notable. Donc pour le rendu final des résultats je ne prends pas en compte cette valeur.

Lors de la construction de la courbe d'absorbance nous avons eu beaucoup de mal à placer les points de nos échantillons. Cependant nous avons réussi à trouver les concentrations massiques correspondantes au taux de Fer. Par la suite nous avons cherché la valeur en mg de Fer pour 100g de Spiruline.

VI. Conclusion

Suite à la demande de Mr GENEVE, qui était de savoir si la Spiruline pouvait être enrichie en Fer, dans le but de transformer une partie de sa production, en l'enrichissant en Fer afin de viser un public anémique, sportif ou encore des femmes enceintes. Mr GENEVE nous alors fait état d'une problématique. Pour répondre au mieux à celle-ci, nous avons mis en place deux bioréacteurs dont un était enrichi grâce à un ajout de Ferleaf (produit utilisé par Mr GENEVE pour ces cultures).

Au regard des résultats obtenus à la suite des lectures d'absorbances, on remarque que la concentration en Fer augmente légèrement mais de manière progressive tout au long des ajouts du Ferleaf. Cependant en fonction des résultats on note tout de même qu'il y a un problème de corrélation entre l'ajout de Fer et l'augmentation du Fer dans la Spiruline. Ceci dit nous avons fait peu d'analyses car nous avons mis beaucoup de temps à mettre en place et à maintenir les cultures de Spiruline, donc les séquences analytiques ont été moins nombreuses que prévu.

Nous avons eu quelques difficultés pour mettre en place ces analyses de Fer, mais au vu de la norme qui est de 150mg/100g de Spiruline nous considérons nos résultats justes. A savoir que ce protocole est normalement établi pour le dosage du Fer dans les épinards donc peut-être que les concentrations des solutions ne sont pas adaptées à la Spiruline.

Enfin je peux conclure que tout de même l'enrichissement de la Spiruline est une possibilité pour Mr GENEVE.