THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Sciences des Agroressources

Présentée et soutenue par :

M. JEAN-BAPTISTE JENTZER

le vendredi 20 novembre 2015

Titre :

ETUDE D'UN PROCEDE D'EXTRACTION EN CONTINU DES GLYCOSIDES DE STEVIOL A PARTIR DES FEUILLES DE STEVIA (STEVIA REBAUDIANA BERTONI)

Ecole doctorale :

Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (L.C.A.)

Directeur(s) de Thèse :

M. GERARD VILAREM

M. LUC RIGAL

Rapporteurs :

M. CEDRIC BERTRAND, UNIVERSITE DE PERPIGNAN

M. FARID CHEMAT, UNIVERSITE D'AVIGNON

Membre(s) du jury :

M. JAN GEUNS, KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN, Président

M. GERARD VILAREM, INP TOULOUSE, Membre

M. NICOLAS FABRE, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

« En essayant continuellement on finit par réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de chance que ça marche. »

Jacques Rouxel

Remerciements

« Se réunir est un début, rester ensemble est un progrès, travailler ensemble est la réussite »

Henry Ford

Ces travaux de thèse sont le fruit d'un grand travail d'équipe et il me semble très important de remercier toutes les personnes qui ont apportés leur pierre à l'édifice que ce soit pour la résolution de problèmes scientifiques ou leurs encouragements.

Je commencerai par remercier mes directeurs de thèse, Gérard Vilarem et Luc Rigal, qui m'ont tellement appris et cru en moi, quel que soit la situation. Vous avez su me montrer le bon chemin sans me l'imposer, cette relative liberté m'a certes parfois menée à l'échec mais il est bien connu qu'on apprend toujours de ses erreurs. Gérard vous avez toujours été disponible et apte à résoudre mes différents problèmes. Luc, même si pendant toute la durée de mon doctorant nous avons moins échangé, chacune de vos interventions a tout le temps été très pertinente et bénéfique, de plus vous m'avez été d'une aide très précieuse pour la rédaction de ce manuscrit.

En plus de mes directeurs de thèse, j'ai eu la chance et l'honneur d'avoir eu Marion Alignan pour m'encadrer au quotidien. Ces simples mots ne seront jamais assez suffisants pour te dire merci et combien tu as pu m'apporter. M'encadrer n'a pas dû être de tout repos et j'espère avoir pu te rendre au centième ce que tu m'as apporté. Ce fût un réel plaisir de travailler à tes côtés, tu étais toujours là quand j'avais besoin de toi que ce soit pour le travail ou pour une bonne vieille boutade. A ce sujet préfères-tu avoir les jambes en gelée de groseille ou les mains en laine ? Encore merci pour tout.

Je voudrais maintenant remercier tous les partenaires du projet en commençant par l'Epi Salvagnacois, en particulier Rémi Andrieu et Charlotte Sohy pour leur soutien, leur écoute et leurs efforts pour comprendre à chaque fois mes travaux mais aussi pour le prêt de matériel. Merci aussi à Joël Perret et Mathieu Penin de la société Stevia Natura pour leurs précieux conseils et l'approvisionnement en feuilles de Stévia. Merci à Cyril Rouffet de la société La Patelière pour toutes ses interventions très intéressantes. Enfin merci aux laboratoires de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan, surtout à Monique Berger et Claire Barbet-Massin pour tous ces échanges captivants mais aussi leur aide.

Continuons avec le personnel du LCA : un gros merci à Didier Dangla pour le support technique et logistique, à Karine Trémeauville pour avoir toujours passé mes commandes en temps et en heure, à Didier Nicolas pour son aide avec l'hydrodistillation et le réacteur à ultrasons mais aussi pour son amitié, à Anne Lung et Laure Candy pour leur assistance avec les extracteurs bi-vis et Tournaire et leurs précieux conseils, à Stéphanie Deffontis pour les ultimes expériences qu'elle a réalisée pour moi pendant la rédaction de ce manuscrit, à Gilles Humbert pour tout ce qu'il a pu réaliser au cours de ces travaux, à Romain Armangeau pour le support logistique, sa bonne humeur et son amitié, et à tous ceux que j'aurais malheureusement oublié. Merci à tous, ce fût un grand plaisir de travailler avec vous. Je n'oublie pas non plus les travaux effectués par tous les stagiaires que j'ai pu encadrer. Merci à Alida, Jérôme, Daniel, Alexandre, Louise, Marion et Adrien.

La thèse est aussi l'occasion de faire de belles rencontres et de nouer de nouvelles amitiés. Je voudrais donc remercier tous les collègues avec qui j'ai passé des moments inoubliables. Je commencerais avec les plus vieux, mes deux kikinous préférés : Eric et Jérôme. Merci pour tous les délires qu'on a eu, je n'oublierai jamais la vidéo de l'inventeur de la mobylette électrique et votre beauté hors du commun ! Merci beaucoup aussi pour votre aide dans mes travaux. What more ? Juste à côté de leur bureau il y avait Mike et Jeff, guères plus jeunes que mes deux kikinous mais tout aussi loufoques. Jeff merci pour ton aide avec la modélisation des molécules. « Allo ? Oui allo ? Oui c'est bon vous pouvez venir le chercher », je pense que tu comprendras ce passage Mike. Qu'est-ce que tu as pu me faire rire avec ça ! Merci pour tous tes conseils sportifs, ça m'a toujours permis de me rétablir au plus vite ou d'améliorer mes performances, pour toutes ces conversations, ces blagues, ta bonne humeur, t'es vraiment quelqu'un de génial ! Un grand merci à mon rouge préféré Rémy. Tu sors vraiment du lot l'ami, merci pour toutes ces conversations qui sortaient de l'espace-temps, on s'est bien marrés ! Enfin merci à Vincent, même si tu as ruiné ma vie sociale en me faisant découvrir Hearthsonte !

Je vais maintenant remercier mes frères et sœurs d'arme : les doctorants, sans qui le travail au quotidien aurait été bien morne. Une fois n'est pas coutume, je commencerai aussi avec les plus anciens. Un énorme merci à Jordan. On s'est connu au LGC quand j'étais en stage mais nous n'avions eu que peu d'échanges et étions assez distants. Quand j'ai débuté mes travaux au LCA je suis atterri dans le même labo que toi. Et là, et là… Eh bien je pense que les murs se souviennent encore de nos rires ou de nos douces voix mélodieuses reprenant en chœur les œuvres d'art de Rihanna ou de sombres inconnus (la fameuse musique d'ascenseur de Toulouse FM…). Je regrette que Maître Gims ou Kendji Girac n'aient éclos à ce moment mais je pense que c'eut été plus un bien qu'un mal tant pour notre santé mentale que pour les nerfs de nos collègues… Je resterai toujours admiratif devant tes chorégraphies endiablées et notamment la danse du pas qui racle… Un autre gros merci à Manon pour ta gentillesse et ton écoute attentive. Un merci tout particulier à Julien. On s'est connu pendant que j'étais en école au club d'Handball de l'INP et il faut dire que notre entente sur le terrain faisait merveille. Je vais t'avouer que tu as été un des facteurs pour le choix de mon doctorat, j'avais vraiment envie de rejouer avec toi ! Tu m'as fait découvrir une nouvelle famille, celle du HBC Saint-Jean. On a vécu une saison particulièrement fantastique en remportant le championnat de régional honneur,

c'était énorme ! Merci à Guillaume, t'es quelqu'un d'incroyable, toujours à l'écoute des gens, merci pour tous ces moments de partage ! Merci à ma relectrice en chef, Cécile, on s'est connu à l'A7 et a priori tu n'as pas voulu me lâcher seul dans cette aventure, merci pour tout ! Merci à l'homme le plus taré de l'univers, Jaja aka « la Panthère du 69 » après cette incroyable performance pour la vidéo de Ben ! Merci au Lion des Comores, Assad, j'attends toujours le Delta mec ! Merci aux Gitanos Fréros : Ben et Jérem, on a créé bien plus qu'une amitié, une fraternité. Merci pour tout les gars, on s'est bien marrés ensembles et j'espère que ça continuera ! Merci à l'homme aux multiples facettes : Vincent ou Frincent selon les moments. J'espère que j'ai pu te transmettre toutes les ficelles de notre jeu favori ! Et enfin merci à tous les autres doctorants pour les moments partagés ensembles : Alice, Natalia, Pablo, Sabina, Jesus, Marian, Nydia, Cédric, Houssein, Gildas, Mathieu (désolé pour ceux que j'aurais oubliés) …

Je voudrais enfin remercier les membres de ma famille qui m'ont soutenu tout le long de mes travaux de thèse : mes parents, ma grand-mère, ma sœur, son mari, mon neveu et mon futur neveu ou ma future nièce. Un énorme merci à mon cousin Michael qui m'a hébergé durant les derniers mois de mon doctorat, t'es quelqu'un avec un cœur énorme, reste comme t'es mec !!

Sommaire

Sommaire i

Liste des abréviations ix

Introduction générale 1

Chapitre I Etat de l'art 5

I.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni 7

I.1.1 Contexte historique 7

I.1.2 Contexte réglementaire 8

I.1.2.1 Aux Etats-Unis 9

I.1.2.2 En Europe 9

I.1.2.3 En France 9

I.1.3 Contexte économique 10

I.1.4 *Stevia rebaudiana* au centre de la recherche scientifique 14

I.1.5 La plante 16

I.1.5.1 Classification 16

I.1.5.2 Description botanique 18

I.1.6 Rappels d'éléments d'anatomie et de cytologie végétales 21

I.1.6.1 La feuille 21

I.1.6.1.1 Structure de la feuille 21

I.1.6.1.1.1 L'épiderme et la cuticule 22

I.1.6.1.1.2 Les trichomes 25

I.1.6.2 La cellule végétale 28

I.1.6.2.1 La paroi cellulaire primaire 29

I.1.6.2.2 La membrane plasmique 30

I.1.6.2.3 Les organites 32

I.1.6.2.3.1 La vacuole 32

I.1.6.2.3.2 Le noyau 33

I.1.6.2.3.3 Les mitochondries et les chloroplastes 33
I.1.6.2.3.4 Le réticulum endoplasmique 33
I.1.6.2.3.5 L'appareil de Golgi 33
I.1.6.2.3.6 Les peroxysomes 34
I.1.6.3 Les voies de transport radial de l'eau et des solutés dans les tissus végétaux 34
I.1.6.3.1 Les plasmodesmes et la voie symplasmique 34
I.1.6.3.2 La voie apoplasmique 38
I.1.6.3.3 Les aquaporines et la voie transcellulaire 38
I.1.7 Composition des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni 41
I.1.7.1 Métabolites primaires 41
I.1.7.1.1 Les glucides 41
I.1.7.1.2 Les protéines 42
I.1.7.1.3 Les lipides 42
I.1.7.2 Métabolites secondaires 43
I.1.7.2.1 Les diterpènes 43
I.1.7.2.2 Les huiles essentielles 44
I.1.7.2.3 Les composés phénoliques 45
I.1.7.2.4 Autres métabolites secondaires 47
I.1.7.3 Cendres et humidité résiduelle 47
I.2 Les glycosides de stéviol 49
I.2.1 Description et composition 49
I.2.2 Voie de biosynthèse, localisation et accumulation 54
I.2.3 Rôle dans la plante 56
I.3 L'extraction solide-liquide appliquée aux végétaux 57
I.3.1 Le transfert de matière 58
I.3.2 Facteurs influençant le transfert 59
I.3.2.1 Nature et état du solide et du soluté 59
I.3.2.2 Nature du solvant 59
I.3.2.3 Ratio liquide-solide 60
I.3.2.4 Température 60
I.3.2.5 Agitation 60

I.3.2.6 Humidité 60
I.3.3 Détermination du coefficient de diffusion 61
I.3.3.1 Résolution de l'équation de diffusion 62
I.3.4 Extraction solide-liquide des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni 62
I.3.4.1 Les méthodes conventionnelles 62
I.3.4.2 Les méthodes alternatives 64
I.3.4.2.1 L'extraction assistée par ultrasons 64
I.3.4.2.2 L'extraction assistée par micro-ondes 65
I.3.4.2.3 L'extraction par fluide supercritique 66
I.3.4.2.4 L'extraction par eau subcritique 67
I.3.4.2.5 L'extraction assistée par enzymes 68
I.4 Les équipements d'extraction solide-liquide appliquée à la matière végétale 69
I.4.1 Extracteurs discontinus 69
I.4.2 Extracteurs continus 72
I.4.2.1 Les extracteurs à lits mobiles 73
I.4.2.2 Les extracteurs à chaîne de convoyage 75
I.4.2.3 Les extracteurs à vis de convoyage 76
I.4.2.1 Quelques données industrielles 80
I.5 Synthèse 81

Chapitre II Extraction aqueuse des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni 83

II.1 Caractérisation des matières premières et des produits de l'extraction aqueuse des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni 87

II.1.1 Caractérisation des feuilles 87

II.1.1.1 Caractéristiques physiques 87

II.1.1.2 Composition chimique des feuilles du Paraguay 92

II.1.1.2.1 Teneur en matière sèche 92

II.1.1.2.2 Teneur en composés hydrosolubles totaux 92

II.1.1.2.3 Teneur en cendres minérales 92

II.1.1.2.4 Teneurs en principaux composés pariétaux 93

II.1.1.2.5 Teneurs en protéines 93

II.1.1.2.6 Teneurs en lipides 94

II.1.1.2.7 Teneur en huile essentielle 94

II.1.1.2.8 Teneur en composés phénoliques totaux et mesure de la capacité antioxydante 95

II.1.1.2.9 Teneur en glycosides de stéviol 96

II.1.1.2.10 Tableau récapitulatif 96

II.1.2 Caractérisation d'un extrait aqueux des feuilles de Stévia provenant du Paraguay 97

II.1.2.1 Teneur en azote 97

II.1.2.2 Teneur en phosphore 98

II.1.2.3 Teneur en acides organiques 98

II.1.2.4 Teneur en sucres 98

II.1.2.5 Teneur en anions 99

II.1.2.6 Teneur en cations 99

II.2 Modélisation de l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol 101

II.2.1 Représentation des processus d'extraction 101

II.2.2 Modélisation de la cinétique d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol dans les feuilles de Stévia séchées du Paraguay 107

II.2.2.1 Equation du transfert de matière 109

II.2.2.2 Résolution numérique de l'équation de transfert 110
II.2.2.3 Comparaison de l'extraction du stévioside et du rébaudioside A 116
II.3 Influence des principaux facteurs sur l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol 120
II.3.1 Effet de l'agitation et de la dilution 120
II.3.2 Effet du broyage 123
II.4 Etude de l'extraction étagée des glycosides de stéviol 130
II.4.1 Etude de l'épuisement en glycosides de stéviol 130
II.4.2 Etude de l'extraction étagée avec recyclage de l'extrait 133
II.5 Synthèse 139

Chapitre III Extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni à l'échelle pilote 141

III.1 Etude de l'extraction des glycosides de stéviol en extracteur agité pilote 144

III.1.1 Description de l'installation pilote 144

III.1.2 Protocole d'extraction et de séparation solide-liquide 147

III.1.3 Conditions opératoires 148

III.1.4 Influence du transfert d'échelle sur les cinétiques d'extraction 149

III.1.4.1 Cas des feuilles séchées et broyées de Stévia du Paraguay 149

III.1.4.2 Cas des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay 153

III.1.5 Influence des conditions opératoires sur les rendements en solutés récupérés dans l'extrait après séparation solide-liquide 156

III.2 Etude de l'extraction des glycosides de stéviol en extracteur Reus 160

III.2.1 Description de l'installation et protocole d'extraction 160

III.2.2 Conditions opératoires et résultats expérimentaux 161

III.3 Etude de l'extraction des glycosides de stéviol en extracteur bi-vis ... 166

III.3.1 Description de l'installation pilote 166

III.3.1.1 Extracteur bi-vis BC21 166

III.3.1.2 Configurations du fourreau et du profil de vis installés 169

III.3.1.3 Trémie d'alimentation de la matière végétale 170

III.3.1.4 Pompe d'alimentation de solvant 171

III.3.2 Protocole d'extraction 171

III.3.3 Conditions opératoires des essais 173

III.3.4 Faisabilité de l'extraction solide-liquide des feuilles de Stévia en extracteur bi-vis 177

III.3.5 Intensification de l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia en extracteur bi-vis 182

III.3.5.1 Influence de la modification de la configuration et du profil de vis de l'extracteur bi-vis BC21 182

III.3.5.2 Influence de la température et du ratio liquide-solide 185

III.3.5.3 Influence de l'augmentation de la production horaire de glycosides de stéviol 190

III.4 Synthèse des essais pilote d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol à partir des feuilles de Stévia séchées du Paraguay 196

Chapitre IV Mise au point d'un extracteur solide-liquide, en continu, à contre-courant et application à l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni 200

IV.1 Conception et réalisation de l'extracteur pilote 203

IV.1.1 Choix de la technologie de transport des feuilles de Stévia pour l'extraction et la séparation solide-liquide 203

IV.1.2 Description de l'extracteur-séparateur solide-liquide continu à vis sans âme 208

IV.2 Etude des conditions de fonctionnement de l'extracteur-séparateur solide-liquide continu à vis sans âme 216

IV.2.1 Etude de l'influence du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme sur l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia 216

IV.2.2 Etude des temps de séjour du solide et du liquide dans l'extracteur pilote VHSA 231

IV.2.2.1 Protocole pour la détermination des distributions des temps de séjour 231

IV.2.2.2 Analyse des courbes de distribution des temps de séjour 232

IV.2.3 Adaptation du mode de fonctionnement de l'extracteur pilote VHSA 235

IV.2.3.1 Description du fonctionnement de l'extracteur pilote VHSA avec la recirculation des extraits 236

IV.3 Influence de la recirculation du filtrat brut sur les rendements d'extraction en glycosides de stéviol 243

IV.4 Comparaison de l'extraction aqueuse des feuilles séchées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote agité, bi-vis et VHSA 247

IV.5 Conclusion et perspectives ..... **Erreur ! Signet non défini.**

Conclusion générale 250

Partie expérimentale 256

Annexes 284

Bibliographie 292

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFNOR	Association Française de NORmalisation
APG	*Angiospermes Phylogeny Group*
ASE	*Accelerated Solvent Extraction*
CAS	*Chemical Abstracts Service*
CI_{50}	Capacité Antioxydante
CLHP	Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
EUSTAS	*EUropean STevia Association*
FDA	*Food and Drug Administration*
GRAS	*Generally Recognized As Safe*
JECFA	*Joint FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)/WHO (World Health Organization) Expert Committee on Food Additives*
L/S	*Ratio* liquide-solide
LCA	Laboratoire de Chimie Agroindustrielle
MS	Teneur en Matière Sèche
n	Nombre de répétitions
RE	Réticulum Endoplasmique
Stévia	*Stevia rebaudiana* Bertoni
T	Température
UV	UltraViolet
VHSA	Vis Hélicoïdale Sans Ame

Introduction générale

Stevia rebaudiana Bertoni est une plante originaire du Paraguay. Elle est utilisée depuis plusieurs siècles par les Indiens Guaranis pour sucrer le maté, boisson traditionnelle d'Amérique du Sud, et également en tant que plante médicinale. Découverte par les Européens en 1887, grâce au botaniste suisse Moises Santiago Bertoni, elle fait actuellement l'objet de nombreuses études. Son intérêt principal réside dans le fait qu'elle contient des molécules au goût sucré, les glycosides de stéviol, dont les plus connus sont le rébaudioside A et le stévioside.

L'alimentation des pays industrialisés, souvent trop riche en glucides et en lipides, a engendré une augmentation marquée de l'obésité et favorisé le risque de diabète. Face à ce constat, l'industrie agroalimentaire s'est efforcée de développer des produits allégés. Au sucre, ont ainsi été substitués les édulcorants acaloriques, molécules au goût sucré non métabolisées par le corps humain. Ces édulcorants sont souvent obtenus par voie de synthèse chimique comme l'aspartame, l'acésulfame K ou encore le sucralose. S'ils sont autorisés dans la confection de produits alimentaires, la toxicité de ces édulcorants et leur impact sur la santé humaine alimentent cependant les débats au sein de la communauté scientifique. Les consommateurs des pays industrialisés sont par ailleurs de plus en plus regardant vis-à-vis de l'origine et du caractère sain des produits qu'ils achètent. Les études effectuées sur les glycosides de stéviol, diterpènes glycosilés issus des feuilles de Stévia, tendent à souligner leur innocuité. Ils présenteraient même des vertus thérapeutiques, comme des propriétés anti-hypertensive ou antidiabétique et semblent ainsi être une alternative prometteuse au sucre et aux édulcorants artificiels.

La Stévia, exportée avec succès dans les années 1970 au Japon, s'est rapidement répandue en Asie et en Amérique du Sud. Elle fut autorisée aux Etats-Unis en 1995. En Europe, l'utilisation de ses édulcorants en tant qu'additif alimentaire ne fut approuvée qu'en 2011. La production et l'utilisation de la Stévia, ainsi que les études la concernant, n'ont fait dès lors qu'augmenter de façon importante d'années en années.

C'est dans ce contexte que le projet STEVIANOV a été créé. Il réunit des organismes publics et privés dont l'objectif est de développer une filière française tracée de *Stevia rebaudiana* Bertoni, depuis la culture de la plante jusqu'à l'extrait purifié. Ce projet est porté par la société d'intérêt collectif agricole l'Epi Salvagnacois, acteur agricole majeur du Tarn (Salvagnac, France), gérée par R. Andrieu. Cette société est spécialisée dans la collecte de céréales et oléo-protéagineux (blé, colza, lin,...), l'approvisionnement (aliments du bétail, fertilisants,…) ainsi que dans les conseils techniques et les appuis technico-économiques. Les autres partenaires du projet STEVIANOV sont :

- la première et l'unique entreprise de production d'extraits de Stévia en Europe, Stevia Natura, située dans le Puy-de-Dôme (Riom, France),

- un fabricant de confiseries et d'aides à la pâtisserie, La Patelière, situé dans le Gers (Condom). L'entreprise, créée en 1978, était initialement spécialisée dans les confiseries à base de pruneaux et de chocolat,

- le laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA) – UMR 1010 INRA/INP Toulouse-ENSIACET, situé en Haute-Garonne (Toulouse, France). Il a pour objectif de regrouper les compétences interdisciplinaires et de constituer un pôle d'excellence dans le domaine de la transformation chimique des agroressources. Il est divisé en 3 équipes : « Fractionnement et transformation des agroressources », « Lipochimie et réactivité chimique des agromolécules » et « Génie analytique et devenir environnemental des agro-constituants », dont seule la première participe au projet STEVIANOV,

- le laboratoire d'Agronomie - UMR 1248 INRA/INP Toulouse-EI Purpan, situé en Haute-Garonne (Toulouse, France). Ses compétences portent sur la conception et l'évaluation de systèmes de cultures économes en intrants, la dynamique hydrique et la gestion de l'irrigation, la reconnaissance de maladies, adventices et ravageurs,

- le laboratoire d'Agrophysiologie – UMR 1054 INRA/INP Toulouse-EI Purpan, situé en Haute-Garonne (Toulouse, France). Il est spécialisé dans l'accumulation des métabolites secondaires dans la plante et dans les expérimentations dans divers travaux de sélection.

Financé par le Fonds Unique Interministériel AAP 11, le projet STEVIANOV s'étend sur 5 ans de septembre 2011 à Août 2016. Les objectifs scientifiques et techniques de ce projet sont les suivants :

- la promotion et la mise en place d'une filière agricole française, tracée et de qualité de *Stevia rebaudiana* Bertoni,

- la mise au point de nouvelles méthodes d'extraction et de purification des glycosides de stéviol à faible impact environnemental,

- la commercialisation et la valorisation innovante des produits et co-produits issus de Stévia.

L'action de notre laboratoire, le LCA, se situe dans les deuxième et troisième volets : développer des méthodes innovantes d'extraction et de purification des glycosides de stéviol ainsi que la valorisation des co-produits après extraction des édulcorants. Cette étude a seulement été axée sur l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles de Stévia. L'objectif scientifique est de comprendre et de décrire le phénomène d'extraction solide-liquide des édulcorants, ainsi que d'identifier et lever les verrous au développement d'un procédé d'extraction innovant, en continu, à l'eau, à l'échelle pilote. L'optimisation de ce dernier permettra d'évaluer son transfert à l'échelle industrielle.

L'ensemble des travaux scientifiques décrits dans cette thèse sont présentés comme suit : dans un premier chapitre, l'histoire et le contexte socio-économique de la Stévia sont développés. La feuille de la Stévia étant le seul organe de la plante utilisé au cours cette étude, son anatomie ainsi que sa composition chimique sont décrites. Les composés édulcorants ciblés pour l'extraction solide-liquide, les glycosides de stéviol, sont détaillés à travers leurs propriétés physico-chimiques et leur voie de synthèse. Enfin l'extraction solide-liquide appliquée aux végétaux est développée, en ciblant les limites qui peuvent régir cette opération. Les paramètres opératoires et les méthodes d'extraction, traditionnelles et alternatives, dans un contexte de procédés, continus et discontinus, sont finalement abordés.

Dans un second chapitre, nous présentons la caractérisation physique (taille, granulométrie) et chimique (métabolites primaires et secondaires) des feuilles de Stévia utilisées au cours de l'étude. L'extraction aqueuse des glycosides de stéviol est ensuite abordée. L'objectif est de comprendre le phénomène d'extraction, d'identifier et lever les verrous existants (limites de solubilité, barrières physiques et chimiques inhérentes à la matière végétale, *etc*.) en étudiant l'influence de la préparation de la matière végétale (séchage, broyage, *etc*.) ou des paramètres opératoires (température, *ratio* liquide-solide, agitation, *etc*.).

Le transfert à l'échelle pilote est développé dans un troisième chapitre. Il étudie et compare l'extraction des glycosides de stéviol au travers de différents équipements tels que le réacteur batch agité qui sert de référence, un extracteur équipé d'émetteurs à ultrasons, ainsi qu'un extracteur bi-vis.

Grâce aux résultats acquis aux échelles laboratoire et pilote, le développement et l'optimisation d'un procédé d'extraction original, en continu, à l'eau, des glycosides de stéviol des feuilles de Stévia sont présentés dans un quatrième chapitre.

Chapitre I
Etat de l'art



I.1 *Stevia rebaudiana* Bertoni

I.1.1 Contexte historique

Le genre *Stevia* doit son nom au Dr. Peter James Esteve, professeur espagnol de botanique du XVIe siècle (H. Everett, 1980). Le botaniste suisse Moises Santiago Bertoni fut le premier à découvrir l'espèce *rebaudiana*, grâce aux indiens paraguayens et aux Metizos, en 1887. Il la nomma initialement *Eupatorium rebaudianum* Bertoni en 1899, en hommage au chimiste Ovidio Rebaudi qui avait isolé le premier son principe actif. En 1904, après observation d'un échantillon frais de la plante, il a décidé de la classer dans le genre *Stevia*. *Stevia rebaudiana* Bertoni est native des régions de l'Amambay et d'Iguaçu, situées aux frontières du Brésil et du Paraguay (Kinghorn et Soejarto, 1985). D'après de nombreux rapports cités par Lewis (1992), les indiens Guarani la connaissaient depuis de nombreuses années sous le nom de *caâ-êhê*, signifiant « herbe sucrée ». Ses feuilles étaient alors utilisées comme édulcorant, notamment pour adoucir le maté (infusion traditionnelle).

En 1942, la production de Stévia (ce terme désignera l'espèce *Stevia rebaudiana* Bertoni dans la suite de ce document) en Angleterre fut un échec (Lewis, 1992). Ce n'est qu'en 1964, au Paraguay, que des cultures de la plante furent conduites avec succès dans un but lucratif (Brandle *et al.*, 1998). Après son implantation au Japon par Sumida en 1968, la culture de la Stévia gagna, entre 1980 et 1990, de nombreux autres pays comme le Brésil, le Canada, la Chine, la Corée du Sud, l'Indonésie, Israël, le Mexique, la Tanzanie et les Etats-Unis (Crammer et Ikan, 1987; Brandle *et al.*, 1998; Kinghorn, 2002).

Le stévioside (Figure I-1a), composé édulcorant majoritaire de la Stévia, fut isolé la première fois en 1905 sous forme impure, puis à l'état purifié en 1931 par deux scientifiques français : Bridel et Lavieille (Bridel et Lavieille, 1931). Ce n'est qu'en 1963 que la structure chimique de cette molécule fut établie en tant que glycoside de *ent*-kaurène (Mosettig *et al.*, 1963). Dans les années 1970, un autre composé édulcorant de la plante, le rébaudioside A (Figure I-1b), fut isolé comme la deuxième molécule majoritaire (Kohda *et al.*, 1976). Plus tard, six autres composés édulcorants minoritaires furent identifiés : le dulcoside A, les rébaudiosides B à E et le stéviolbioside (Yamasaki *et al*,. 1976; Kobayashi *et al.*, 1977; Tanaka, 1982). De nos jours plus de 30 molécules édulcorantes ont été identifiées chez *Stevia rebaudiana* (Wölwer-Rieck, 2012; Ceunen et Geuns, 2013*a*).

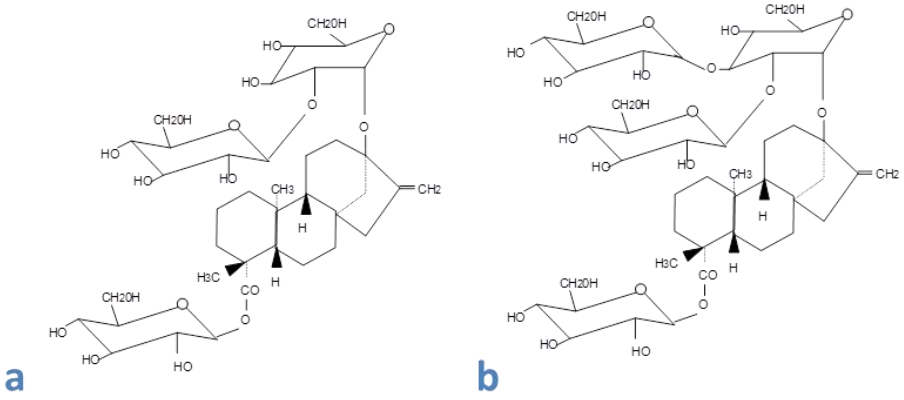


Figure I-1 Structure chimique du stévioside (N° CAS = 57817-89-7) (a) et du rébaudioside A (N° CAS = 58543-16-1) (b)

I.1.2 Contexte réglementaire

Les glycosides de stéviol sont autorisés, comme additifs alimentaires, en Amérique du Sud et dans de nombreux pays d'Asie comme le Japon, la Chine et la Corée. Au cours des dernières années, leur usage a été approuvé au Mexique, en Australie, en Nouvelle-Zélande, en Suisse, en France, au Pérou, en Uruguay, en Colombie, au Sénégal, en Russie, en Malaisie, en Turquie, à Taiwan, en Thaïlande, en Israël et à Hong-Kong (GRAS Expert Panel, 2012).

Lors de son cinquante et unième meeting à Genève en 1999, le JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) a émis un rapport sur la sécurité alimentaire des glycosides de stéviol, jugeant insuffisantes les données scientifiques alors disponibles pour permettre l'attribution d'une dose journalière admissible (DJA *i.e.* une estimation de la quantité d'une substance qu'un individu peut ingérer tous les jours par kg de poids corporel sans risque pour sa santé) (JECFA, 2000).

En juin 2004, ce même comité, considérant les données scientifiques accumulées pendant la période écoulée, a donné une autorisation temporaire d'utilisation et a fixé une DJA de 2 mg/kg de poids corporel/jour (en équivalent stéviol) (JECFA, 2004). La DJA a été augmentée à 4 mg/kg de poids corporel/ jour (en équivalent stéviol) en 2008 (JECFA, 2008).

Sur les recommandations du JECFA, le Codex Alimentarius a alors inscrit les glycosides de stéviol comme édulcorant dans les listes mondiales des additifs autorisés (N° SIN : 960).

Les étapes clés de leur autorisation aux Etats-Unis, en Europe, et plus particulièrement en France, sont décrites ci-après.

I.1.2.1 Aux Etats-Unis

Dans le domaine alimentaire, la réglementation américaine est régie par le Food, Drug and Cosmetic Act, et plus spécifiquement par le Food Additives Amendement adopté par le congrès en 1958 pour ce qui relève des édulcorants. Cet Amendement prévoit une autorisation de la Food and Drug Administration (FDA), avant toute mise sur le marché d'un additif développé après 1958. Cette règle ne s'applique pas si l'ingrédient est « GRAS » (Generally Recognized As Safe).

En 1991, la FDA a placé un embargo sur les feuilles de Stévia et a mis une procédure d'alerte à leur importation. L'interdiction a été levée en 1995 suite à la loi DSHEA (Dietary Supplement Health and Education Act) de 1994 (Kinghorn, 2002). En 2004, les édulcorants hautement purifiés (pureté > 95%) issus de *Stevia rebaudiana* Bertoni ont reçu pour la première fois le statut « GRAS » (FDA, 2008*a*, *b*).

I.1.2.2 En Europe

En 2000, la Commission des Communautés Européennes a rejeté la demande du Professeur J.M.C. Geuns de reconnaissance de *Stevia rebaudiana* Bertoni comme nouvel aliment (« Novel Food ») ou nouvel ingrédient alimentaire (Commission of the European Communities, 2000).

L'EFSA (European Food Safety Authority) a estimé en Mars 2010 une DJA équivalente à celle du JECFA de 4 mg/kg de poids corporel/jour (en équivalent stéviol). Suite à cela, l'introduction, en tant qu'additifs alimentaires, des glycosides de steviol avec une pureté supérieure à 95 %, a été approuvée à la fin de l'année 2011 par la Commission Européenne (European Commission, 2011).

A ce jour cependant, les plantes et les feuilles séchées de *Stevia rebaudiana* Bertoni ne sont toujours pas considérées comme nouvel aliment ou nouvel ingrédient alimentaire sur le continent européen.

I.1.2.3 En France

En juin 2006, une demande d'autorisation de première mise sur le marché des glycosides de stéviol a été déposée par J. Perret (de la société Greensweet SAS, maintenant devenue Stevia Natura) et MBG Green Technology (présidée par C. Moreno).

En 2007, l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) a estimé qu'il n'y avait aucune « preuve de l'innocuité pour le consommateur de l'emploi de glycosides de stéviol en tant qu'édulcorant » (AFSSA, 2008) et a considéré, en 2008, que « l'emploi de rébaudioside A extrait de

Stevia rebaudiana, de pureté supérieure à 97 % ne présente pas de risque pour le consommateur » (AFSSA, 2008). En 2009, elle a émis un avis favorable pour qu'un arrêté relatif à l'emploi de rébaudioside A extrait de *Stevia rebaudiana*, présentant une pureté supérieure à 97 %, en tant qu'additif alimentaire soit mis en place (AFSSA, 2009). En 2011, L'ANSES (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) a soumis le même avis (ANSES, 2011).

I.1.3 Contexte économique

Sauf mention contraire, les données chiffrées et informations citées dans cette partie proviennent de Zenith International, société mondiale de conseil dans l'industrie de l'alimentation et de la boisson.

En 2013, le marché global de la Stévia était dominé par le continent américain et l'Asie-Pacifique (Figure I-2). A ce jour, le nombre de zones géographiques dédiées à la culture de la Stévia est en pleine croissance. La culture s'étend ainsi sur le continent africain et dans de nouvelles régions d'Amérique du Sud, en Asie-Pacifique et en Europe.

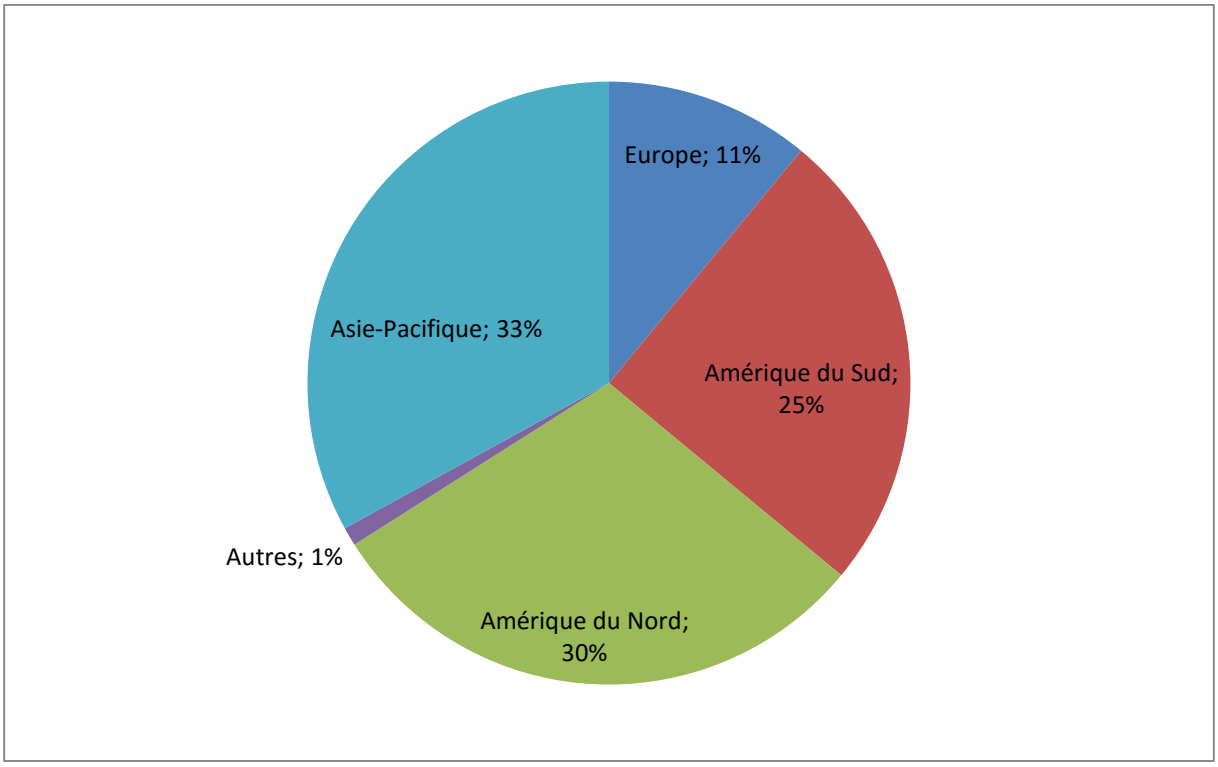


Figure I-2 Marché global de la Stévia par zones géographiques en 2013

Le volume et la valeur du marché global de la Stévia ont connu une nette augmentation en 2010, puis leur progression a chuté jusqu'en 2011 pour augmenter à nouveau en 2014 (Figure I-3 et Figure I-4). La nette augmentation en 2010 a résulté de l'ouverture du marché global de la Stévia au marché des Etats-Unis. La chute du marché en 2011 peut être expliquée par l'abondance de Stévia peu chère et de basse qualité provenant principalement de Chine, et qui engendra des produits aux qualités organoleptiques peu appréciées par le consommateur. Le regain observé en 2014 pourrait correspondre à l'ouverture au marché Européen. L'entreprise PureCircle©, leader mondial des fournisseurs d'édulcorants de Stévia, a estimé que plus de 2000 nouveaux produits avaient été lancés pendant l'année 2013, représentant une augmentation d'environ 75% par rapport à l'année 2012. En 2014 le marché global de la Stévia a été estimé à un volume de 4670 tonnes et une valeur de 336 millions US$. Pour 2017 les estimations sont de 7150 tonnes et 578 millions US$ (Figure I-4). Ainsi la tonne passerait de 0,07 millions US$ à 0,08 millions US$, alors que ce chiffre ne faisait que baisser depuis 2010 (Figure I-5). Si ces données se concrétisent, le marché global de la Stévia semble ainsi promis à un bel avenir.

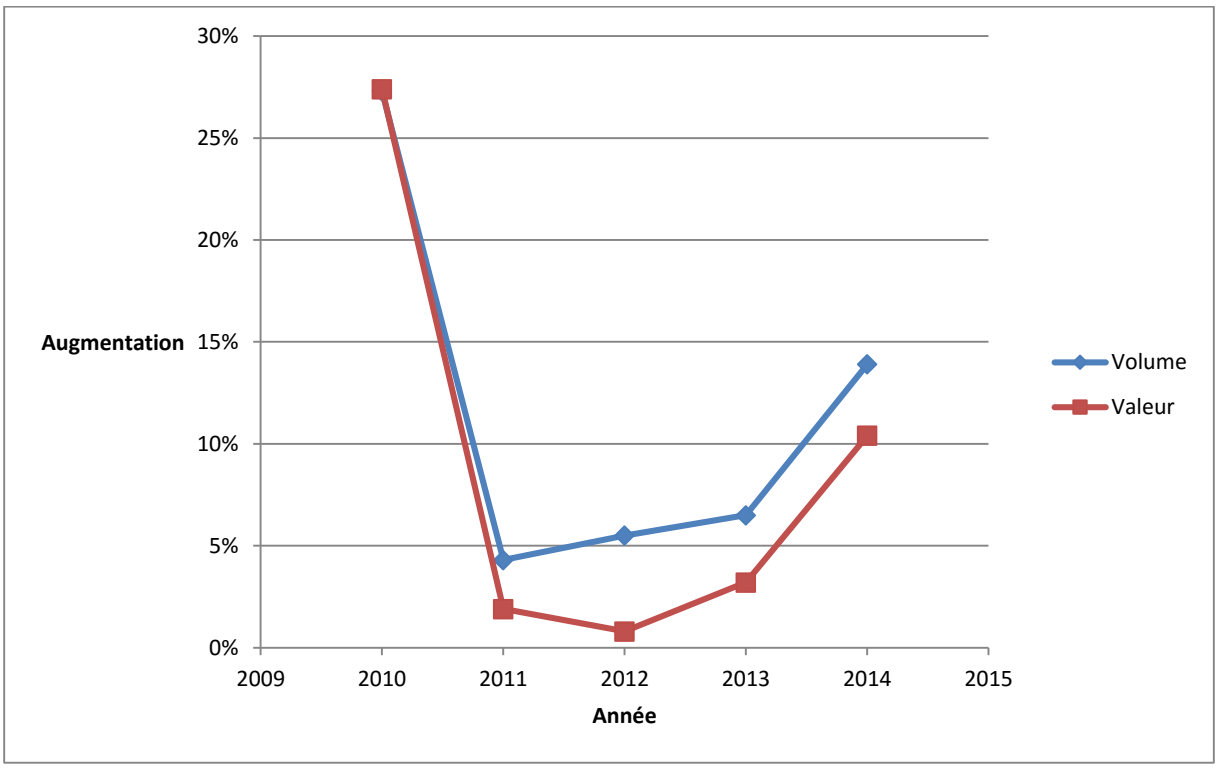


Figure I-3 Evolution du marché global de la Stévia de 2010 à 2014

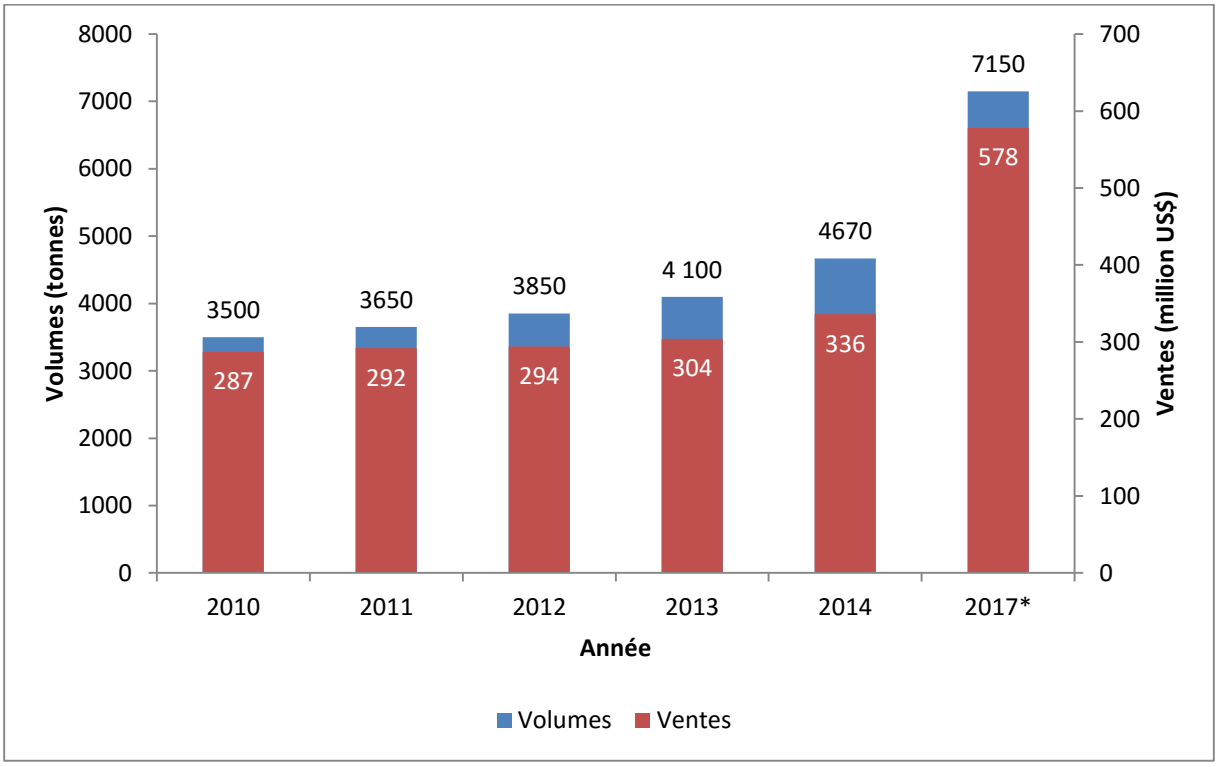


Figure I-4 Evolution du volume et de la valeur du marché global de la Stévia (*estimation)

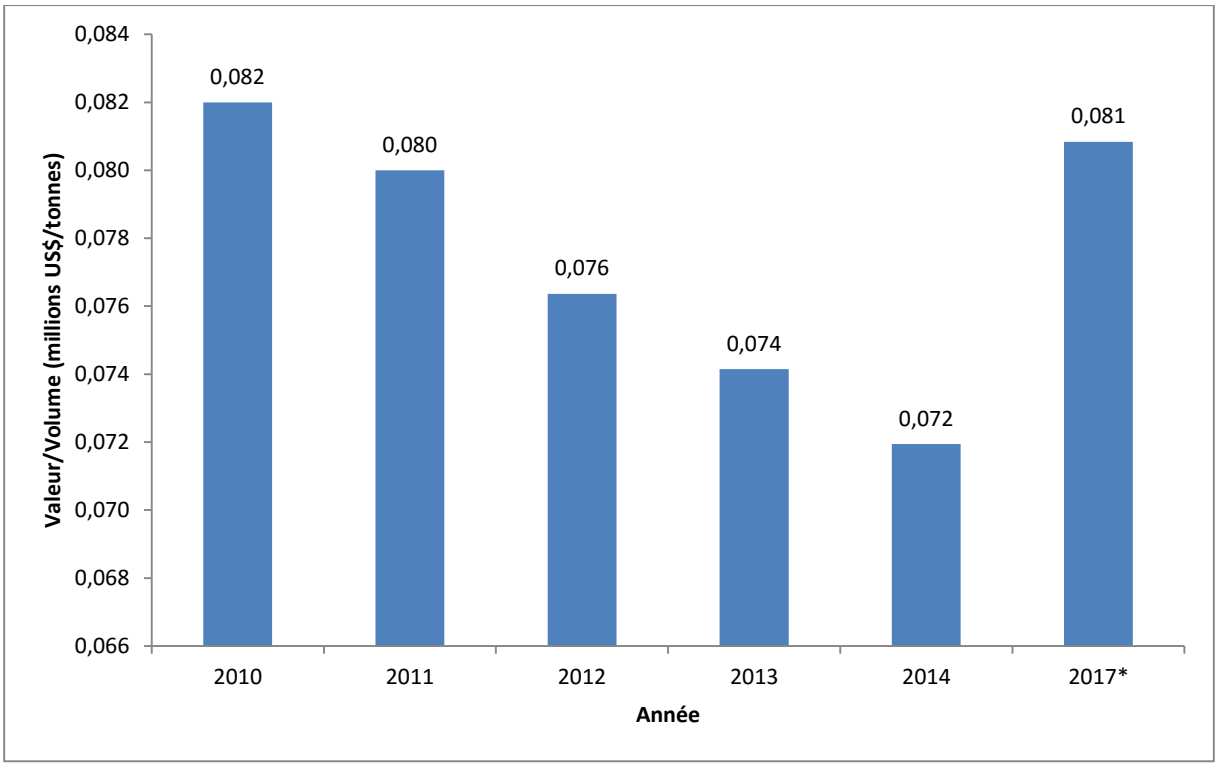


Figure I-5 Evolution du rapport valeur/volume du marché global de la Stévia (*estimation)

Les deux premiers fournisseurs mondiaux de produits à base de stévioside et de rébaudioside A sont les compagnies Coca-Cola avec Truvia®, et PepsiCo avec PureVia® (Figure I-6). Ces mêmes entreprises ont décliné leur produit phare, en 2013, avec du stévioside et du rébaudioside A : le Coca Cola Life® et le Pepsi Next® (Figure I-7). Leur communication ne cible pourtant pas l'usage des édulcorants de Stévia pour réduire la teneur en sucre de leurs produits. Ces compagnies semblent simplement axer leur force de vente sur la réputation et la qualité de produits originaux. Ceci illustre l'image négative véhiculée par les édulcorants de Stévia. La plante est en effet souvent associée à un arrière-goût amer (Crammer et Ikan, 1987) qui altérerait les qualités organoleptiques des formulations alimentaires.



Figure I-6 Edulcorants de table à base de glycosides de stéviol de la marque Truvia® et PureVia®
source : www.truvia.fr et www.purevia.fr



Figure I-7 Coca-Cola Life® et Pepsi Next®
source : www.coca-cola.fr et www.pepsinext.ca

En Europe, Stevia Natura, acteur du marché français (Figure I-8) et Stevia Internacional Europe, se sont associés en 2013 pour devenir le seul producteur d'extraits de Stévia.



Figure I-8 Gamme de produits Stevia Natura® (source : www.stevia-natura.fr)

Le plus gros consommateur de Stévia reste le Japon où sa consommation a fortement augmenté quand le gouvernement a banni l'utilisation de certains édulcorants synthétiques, le cyclamate et la saccharine en 1969, puis la dulcine en 1973, jugés nocifs pour la santé. On trouve aujourd'hui la Stévia dans différents produits alimentaires japonais, comme les plats cuisinés, les fruits de mer séchés, les crèmes glacées et les sorbets, les chewing-gums, la sauce soja, les boissons, les yaourts, les édulcorants de table ou encore le pain (Mizutani et Tanaka, 2002).

I.1.4 *Stevia rebaudiana* au centre de la recherche scientifique

Associations internationales à but non lucratif, l'EUSTAS (European Stevia Association) et la WSO (World Stevia Organisation) ont pour vocation principale la promotion de la Stévia, et illustrent à elles seules l'intérêt que porte le milieu de la recherche à la plante.

L'EUSTAS a été fondée en 2006 par le Professeur J.M.C. Geuns (Laboratoire de Biologie Fonctionnelle de l'Université de Louvain, Belgique), Peter Grosser (MedHerbs, Allemagne) et Monica Lorenzo Tedejor (Anagalide, Espagne). Son but est de promouvoir et de coordonner toutes les activités de recherche sur la Stévia et ses dérivés. Elle vise également l'obtention du statut de « Novel Food » pour la plante et ses feuilles séchées.

La WSO a été fondée en 2010 lors de la première conférence sur la Stévia organisée par la SFA (Société Française des Antioxydants) par les comités de la SFA, l'ISANH (International Society of

Antioxidant in Nutrition and Health) et la JSA (Japan Society of Antioxidants). Elle a été créée afin de développer de nouvelles stratégies de prévention des maladies chroniques, telles que l'obésité ou les diabètes, par l'utilisation de la Stévia dans l'alimentation et les boissons.

Au Japon, le « Stevia Konwakai », ou « Consortium Stevia », organisé par les fabricants d'édulcorants à base de Stévia, a promu leur distribution, non seulement au travers de travaux coopératifs pour obtenir leur autorisation et leur enregistrement comme substituts au sucre, mais également au travers d'échanges d'informations sur la production, le marketing et la recherche. Le « Stevia Konwakai » a été rebaptisé « Stevia Kogyokai » (Consortium industriel de la Stévia) et comptait onze entreprises en 2002 (Mizutani et Tanaka, 2002).

Le nombre d'articles scientifiques concernant la Stévia est lui en nette augmentation depuis 2006 comme le montre la Figure I-9. Les principaux axes de recherches portent sur l'agronomie de la plante et ses propriétés autres que son caractère édulcorant, la voie de biosynthèse, l'extraction, la purification et l'innocuité des glycosides de stéviol.

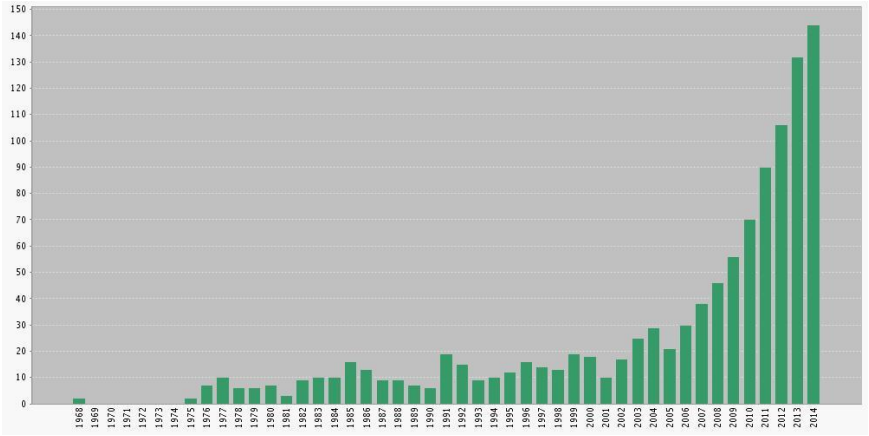


Figure I-9 Evolution du nombre de publications sur la Stévia entre 1968 et 2014 (plateforme Web Of Science™)

En Europe, notamment depuis l'autorisation des glycosides de stéviol en 2011, de nombreuses recherches sont menées pour introduire la culture de la plante sur le continent et développer de nouvelles méthodes d'extraction de ses principes actifs. La Belgique est un acteur important de la recherche sur la Stévia en Europe depuis les années 2000. Le Professeur J.M.C. Geuns et son équipe de l'Université de Louvain, sont les auteurs de plus de 25 publications dans des journaux à comité de lecture international, de 2 livres et de plus de 25 articles publiés dans des comptes-rendus de conférences ou *symposia* scientifiques internationaux. Avec l'Allemagne, le Danemark, l'Espagne, la France, la Grèce, l'Italie et la Turquie ce sont les pays européens communiquant le plus sur la Stévia (Geuns, 2013*a*, Geuns et Ceunen, 2015).

En France, des projets de recherche sur la Stévia voient le jour depuis 2010. Dans l'Hérault, la chambre d'agriculture et le centre d'expérimentation horticole de Marsillargues évaluent la possibilité

de cultiver la Stévia sur le sol français en agriculture raisonnée. En région Midi-Pyrénées et en Auvergne, le projet STEVIANOV tend à instaurer une filière tracée de Stévia française.

I.1.5 La plante

I.1.5.1 Classification

Stevia rebaudiana Bertoni (Figure I-10) est une plante herbacée vivace. Elle appartient, comme le tournesol, à la famille des *Asteraceae*, qui comprend plus de 14 000 espèces réparties en 900 genres, dans le monde entier. C'est la famille d'Eudicotylédones possédant le plus grand nombre d'espèces. La taxinomie de *Stevia rebaudiana* Bertoni, selon la classification phylogénétique APG III (Chase et Reveal, 2009), est présentée dans le Tableau I-1.



Figure I-10 *Stevia rebaudiana* Bertoni (Muanda, 2010; de Carvalho *et al.*, 2011)

Tableau I-1 Classification APG III de *Stevia* rebaudiana Bertoni

		Principales caractéristiques
Règne	*Plantae*	Organismes eucaryotes pluricellulaires, autotrophes et photosynthétiques, cellules avec membrane doublée d'une épaisse paroi cellulosique
Clade	Euangiospermes	« Plantes à fleurs », carpelles complètement fermés (graines contenues dans un fruit)
Clade	Eudicotylédones	Euangiospermes à pollen triaperturé (sauf exception), deux cotylédons, fleurs souvent tétra- ou pentamères, rarement trimères
Clade	Eudicotylédones supérieures	Dialy- ou gamopétales le plus souvent (parfois apétales)
Clade	*Asterideae*	Eudicotylédones supérieures le plus souvent gamopétales, pièces florales en verticilles, pentamères (parfois tétramères), calice et corolle différenciés, ovules unitégumentés et tenuinucellés
Clade	*Euasterideae* II ou *Campanulideae*	La base des pétales forme d'emblée un tube, à l'exception des Apiacées où le tube reste virtuel; clade essentiellement constitué d'espèces herbacées à ovaire infère
Ordre	Asterales	Fleurs gamopétales inferovariées; étamines soudées par leurs anthères ou tout au moins rapprochées au début de la floraison; capsule polysperme; feuilles alternes
Famille	*Asteraceae*	Fleurs gamopétales inferovariées; étamines soudées par leurs anthères en un synandre; akène monosperme; parfois du latex; inflorescence en capitule involucré
Sous-famille	*Asteroïdeae*	Fleurs tubuleuses présentes, tout au moins au centre du capitule, pas de tube laticifère
Tribu	*Eupatorieae*	Capitules homogames, contenant uniquement des fleurons tubulés
Genre	*Stevia*	[a]
Espèce	*Stevia rebaudiana* Bertoni	[b]

[a] Voir revue de Soejarto (2002) pour une description complète.
[b] La description de *Stevia rebaudiana* Bertoni est détaillée dans la partie I.1.5.2.

I.1.5.2 Description botanique

Stevia rebaudiana (Figure I-11, Figure I-14a) est une plante herbacée pérenne mesurant 30 à 50 cm de hauteur à l'état sauvage. En culture elle peut atteindre une taille moyenne de 70 à 80 cm et jusqu'à plus de 140 cm en conditions optimales.



Figure I-11 Feuilles et fleurs de *Stevia rebaudiana* Bertoni (d'après Muanda (2010))

Elle possède des racines filiformes (Figure I-14a), une tige mince et dressée, et produit facilement des ramifications secondaires depuis sa base qui sont renouvelées annuellement (Figure I-14a).

Ses feuilles sont simples, sessiles et nervurées, de forme lancéolée à obovale. Larges d'environ 1 à 2 cm et longues de 3 à 5 cm (Figure I-11, Figure I-14c), elles sont disposées de façon opposée.

Les fleurs de *Stevia rebaudiana* sont pentamères, petites, habituellement blanches, et groupées en capitules. Elles peuvent aussi être mauves et avoir une coloration différente entre le haut et le bas (Figure I-11, Figure I-12, Figure I-14d).



Figure I-12 Fleurs de *Stevia rebaudiana* Bertoni (d'après Martini *et al.* (2015))

La plante est autostérile et probablement pollinisée par les insectes, ses graines sont petites, environ 3 mm de longueur, et sont dispersées par le vent grâce à leur pappus (Figure I-13, Figure I-14e) (Brandle *et al.*, 1998; Soejarto, 2002; Muanda, 2010; Yadav *et al.*, 2011; Martini *et al.*, 2015).

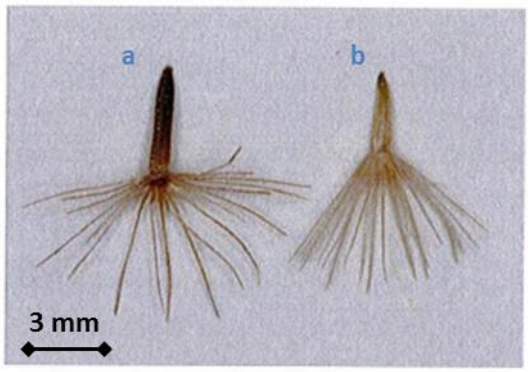


Figure I-13 Graines de *Stevia rebaudiana* Bertoni : (a) graine fertile. (b) graine stérile (d'après Martini *et al.* (2015))

Les plantes de Stévia peuvent être multipliées par boutures ou par semis. Les taux de germination sont plutôt faibles et les semis mettent du temps à se développer. Ainsi il vaut mieux conduire des cultures transplantées annuelles ou pérennes (Brandle *et al.*, 1998). La plante connait une bonne croissance sous des températures de 20 à 24°C et sur un sol riche et drainant. Elle souffre du froid, mais peut tolérer des températures proches de 0°C sur de courtes périodes (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Elle est sensible à un excès d'eau mais nécessite une irrigation si le climat n'est pas adéquat. En absence de mécanisation, les cultures nécessitent une main d'œuvre importante, ce qui pourrait être un frein à leur développement en Europe (Campos, 2012). Néanmoins, des solutions commencent à voir le jour sur l'ancien continent, où les programmes de recherche s'orientent vers la sélection de génotypes adaptés, et l'optimisation des conditions de culture (Geuns, 2012, Geuns, 2013*a*, Geuns et Ceunen, 2015).

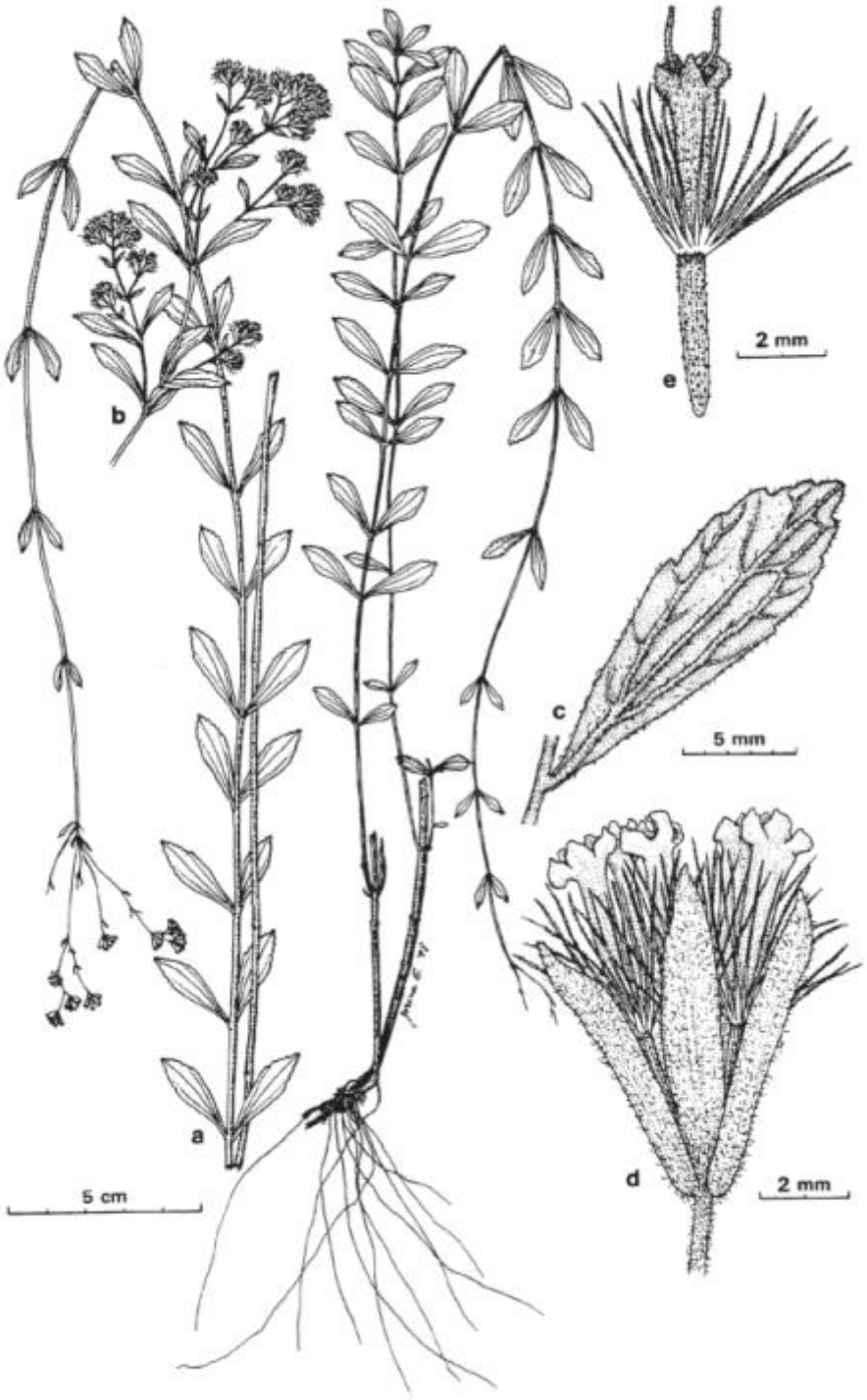


Figure I-14 Schéma analytique de *Stevia rebaudiana.* (a) Spécimen sauvage (b) Spécimen cultivé (c) Feuille (d) Capitule avec fleurs ouvertes(e) Inflorescence et anthère (Soejarto, 2002)

I.1.6 Rappels d'éléments d'anatomie et de cytologie végétales

La biosynthèse des glycosides de stéviol opère dans les vacuoles des cellules chlorophylliennes, au sein des cellules parenchymateuses. Ces molécules s'accumulent donc principalement dans les feuilles (Bondarev *et al.*, 2003; Brandle et Telmer, 2007; Ceunen et Geuns, 2013a, b). C'est la raison pour laquelle cette étude a été restreinte à l'extraction solide-liquide des molécules édulcorantes de feuilles. Afin de mieux comprendre les facteurs microstructuraux limitant la diffusion interne dans la feuille, nous avons jugé utile d'apporter quelques éléments anatomiques et cytologiques. Une attention plus particulière sera portée aux structures végétales ou composants cellulaires pouvant *a priori* présenter une contrainte à l'extraction solide-liquide.

I.1.6.1 La feuille

La feuille est un organe fondamental de la tige. De forme, structure, et fonction très variées, elle est en général spécialisée dans la photosynthèse (processus permettant aux plantes de synthétiser des molécules organiques à partir de la lumière du soleil), et la transpiration. Sa croissance est définie.

I.1.6.1.1 Structure de la feuille

Comme c'est le cas pour la Stévia, la feuille se présente généralement sous forme d'une lame verte aplatie, la lamina, constituée de différents tissus et structures (Figure I-15).

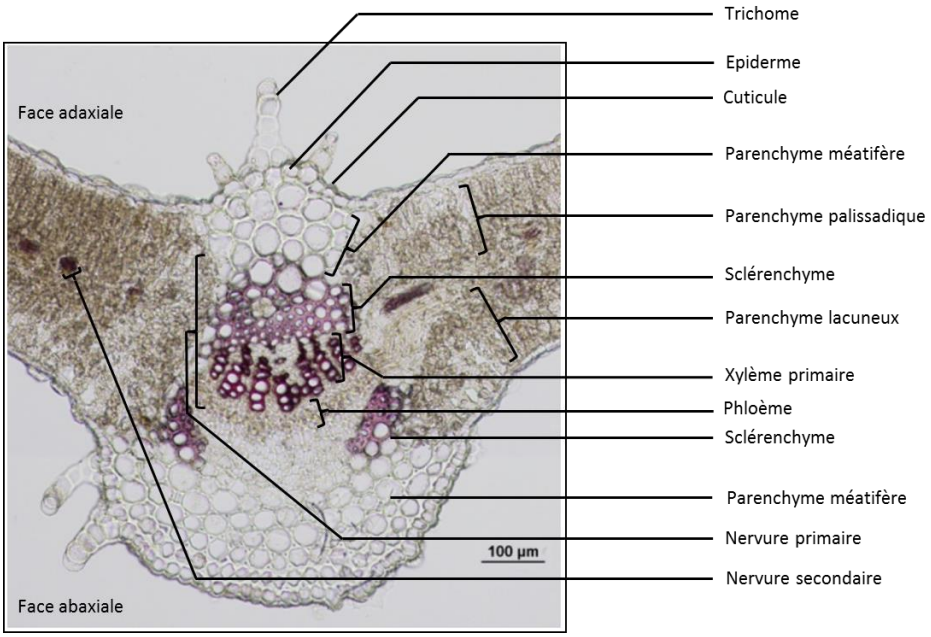


Figure I-15 Coupe transversale d'une feuille mature de *Stevia rebaudiana* Bertoni (d'après Lata *et al.* (2013)). Microscopie photonique; traitement à l'hydrate de chloral et coloration au phloroglucinol et HCl

Nous sommes en présence d'une feuille bifaciale, avec ainsi une face adaxiale (face supérieure) et une face abaxiale (face inférieure). De part et d'autre des nervures secondaires, le mésophile est divisé en parenchyme palissadique sur la face adaxiale, et en parenchyme lacuneux sur la face abaxiale. Alors que le parenchyme palissadique, avec ses cellules allongées, jointives, parallèles entre elles et riches en chloroplastes, optimise l'absorption d'énergie lumineuse, le parenchyme lacuneux, dont les cellules chloroplastiques sont de forme lobée et séparées par de grands espaces intercellulaires, permet l'échange des gaz avec l'atmosphère lors de la photosynthèse. De part et d'autre de la nervure principale, est observé un tissu parenchymateux méatifère, également chloroplastique : ses cellules isodiamétriques présentent entre elles des méats, petits espaces intercellulaires situés aux angles des cellules et résultant du décollement des parois cellulaires. Les tissus parenchymateux sont chez la Stévia le siège de la biosynthèse des glycosides de stéviol (Brandle et Telmer, 2007).

Les nervures, la nervure principale (médiane) et les nervures secondaires, sont principalement constituées de tissus conducteurs de la sève brute (xylème) et de la sève élaborée (phloème). Ces tissus sont protégés par un tissu de soutien, le sclérenchyme, aux parois épaisses et lignifiées.

I.1.6.1.1.1 L'épiderme et la cuticule

Aux faces abaxiale et adaxiale de la feuille, la couche de cellules la plus externe constitue l'épiderme, composé de cellules isodiamétriques (Bondarev *et al.*, 2010). L'épiderme est recouvert d'un dépôt cireux : la cuticule ou membrane cuticulaire, une structure continue de 0,1 à 10 µm d'épaisseur (Trouvelot *et al.*, 2014). La cuticule, dont la composition n'a pas été décrite à notre connaissance chez la Stévia, est généralement composée de trois couches avec, depuis la face la plus externe (interface air-végétal), vers la face la plus interne : un film de cire épicuticulaire, la cuticule propre et la couche cuticulaire (Figure I-16).

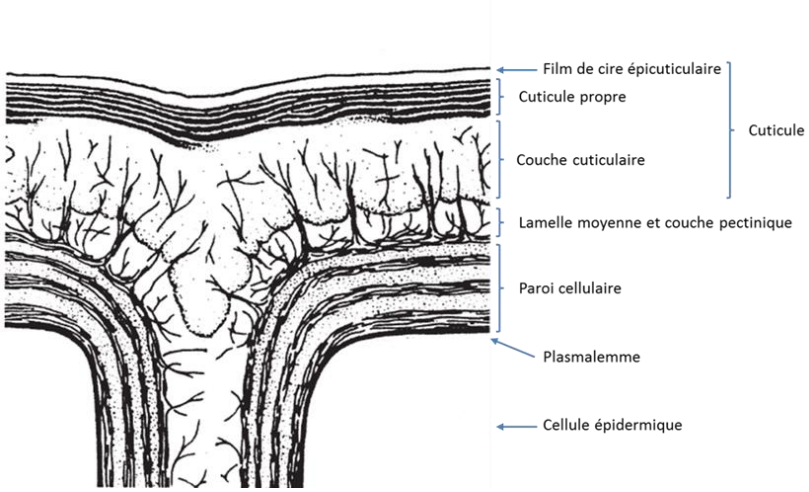


Figure I-16 Coupe schématique de la partie externe d'un épiderme de plante dépourvu de cristaux de cires épicuticulaires (d'après Jeffree (1986))

La composition du film épicuticulaire a souvent été décrite : elle comprend de très longues chaînes de composés aliphatiques (alcools primaires et secondaires), des acides gras, des cétones, et leurs dérivés. Parmi les alcools aliphatiques, le nonacosan-10-ol est un composant typique des cires épicuticulaires. Le film de cire épicuticulaire est le composant le plus hydrophobe de la cuticule, bien que son effet sur la mouillabilité du végétal soit relativement faible comparé à celui de la structure de surface (Wang *et al.*, 2014).

La cuticule propre, située sous cette couche de cire épicuticulaire, contient principalement de la cutine et/ou de la cutane ; elle est dénuée de tout polysaccharide (Jeffree, 2006). La cutane est un biopolymère de type polyméthylénique non hydrolysable et insoluble. Lorsqu'elle est analysée par pyrolyse à point de Curie couplée à la chromatographie en phase gazeuse et à la spectrométrie de masse (PypC-CG/SM), la cutane est caractérisée par une série étendue de chaînes linéaires similaires d'alcanes, d'alc-1-ènes et de α,ω-alcadiènes, de C6 à C35, qui pourraient être des produits de dégradation thermique des chaînes polyméthyléniques (Tegelaar *et al.*, 1989). La cutine est un biopolymère dépolymérisable hétérogène (Tegelaar *et al.*, 1993) constitué de longues chaînes d'acides gras hydroxylés, souvent à 16 ou 18 atomes de carbone. Des ponts formés par les liaisons ester, entre les groupements carboxyles et hydroxyles des acides gras contigus, constituent un réseau étendu de polymères. Ce réseau est enrobé dans une matrice de cires intracuticulaires très hydrophobes, mélange complexe de longues chaînes d'hydrocarbures saturés, d'alcools, d'aldéhydes et de cétones (Hopkins, 2003).

La couche cuticulaire, localisée sous la cuticule propre, consiste en un mélange de cutine et de cutane, de pectine et d'hémicelluloses, qui accroit la polarité de cette couche due à la présence de groupements fonctionnels hydroxyle et carboxyle. La lamelle moyenne et la couche pectinique sont situées sous la couche cuticulaire. Des quantités variables de fibrilles de polysaccharides et de lamelles de pectines pourraient s'étendre depuis la paroi cellulaire, liant la cuticule au tissu sous-jacent (Jeffree, 2006; Fernandez *et al.*, 2013). A la surface de la cuticule, des cristaux de cires épicuticulaires peuvent compléter l'ensemble. D'une façon générale, les parois de l'épiderme supérieur des feuilles bifaciales sont davantage cutinisées que celles de l'épiderme inférieur (Speranza et Calzonigi, 2005). Les clichés réalisés par Tateo *et al.* (2001), du fait peut-être du trop faible grossissement, ne nous permettent pas d'observer de cristaux de cires épicuticulaires sur les feuilles de Stévia (Figure I-17).

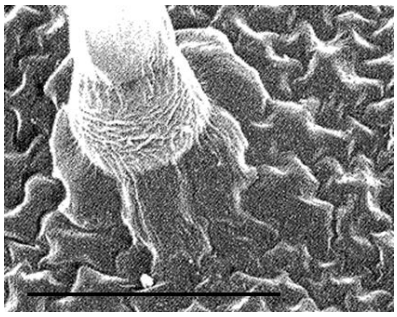


Figure I-17 Cellules épidermiques cutinisées à la surface de la feuille de *Stevia rebaudiana* Bertoni (d'après Tateo *et al.* (2001)). Microscopie électronique à balayage ; échelle = 100 µm

La surface de la cuticule est ponctuée de stomates. Ce sont de petits organes, constitués de deux cellules de garde chlorophylliennes limitant une ouverture nommée ostiole, grâce auxquels les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur de la feuille vont pouvoir être contrôlés (Figure I-18). Chez la Stévia, ils ont une longueur moyenne de 34 µm pour une largeur moyenne de 24 µm (Oliveira *et al.*, 2004; Lata *et al.*, 2013).

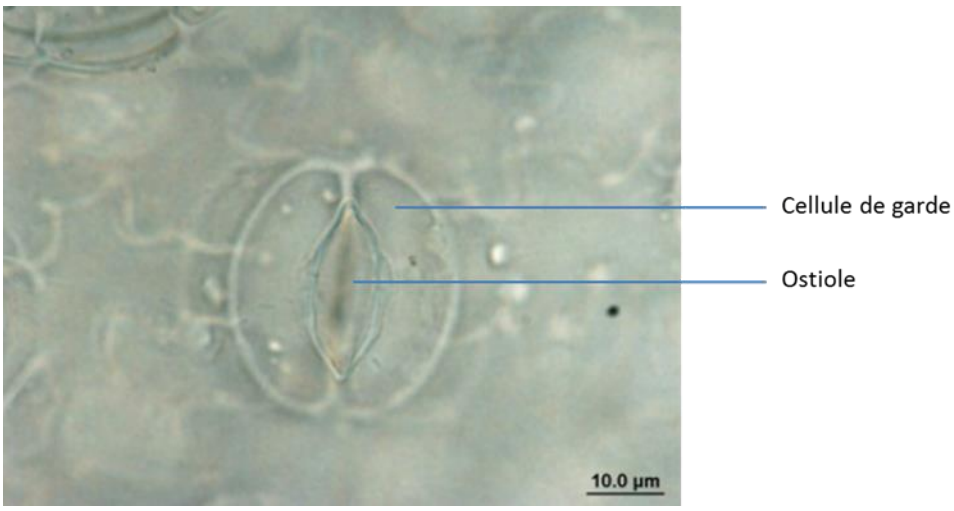


Figure I-18 Stomate de *Stevia rebaudiana* Bertoni observé en microscopie photonique (d'après Lata *et al.* (2013))

La cuticule est perméable aux composés apolaires, mais à l'opposé de ce que sa composition pourrait le laisser croire, elle n'est pas totalement imperméable aux composés polaires. Le concept de deux voies de diffusion parallèles et séparées au travers de la cuticule végétale est en effet bien établi. L'essentiel de la cuticule, composé de groupements méthyle et méthylène, constitue la voie lipophile qui a été correctement caractérisée (Buchholz, 2006; Schreiber, 2006). La preuve de l'existence d'une voie hydrophile est largement indirecte, et la caractérisation de pores aqueux doit s'appuyer respectivement sur l'interprétation de flux d'eau et d'électrolytes. La meilleure preuve de l'existence de ces pores aqueux dans certaines parties de la cuticule, est le fait que ces dernières sont perméables aux espèces ioniques hydratées. L'explication en est la suivante : les molécules d'eau entourent les ions formant des couches d'hydratation. Ces interactions ion-dipôle sont très fortes (énergie de liaison > 100 kJ/mole), ainsi, sous conditions physiologiques, les ions sont hydratés, ce qui leur rend inaccessible la voie lipophile. Outre les groupements méthyle et méthylène, les cuticules contiennent des dipôles permanents comme des groupements hydroxyle, amine ou carboxyle. Ces dipôles permanents absorbent l'eau, et les cuticules gonflent selon l'activité de l'eau ou de la pression partielle de vapeur d'eau. Si les dipôles permanents (interactions dipôle-dipôle) ou les groupes ionisables (interactions ion-dipôle) sont continus à travers la cuticule, l'eau absorbée peut former une phase aqueuse dans la cuticule, c'est-à-dire des pores aqueux. Ces pores aqueux se forment uniquement en présence d'eau, et ont été localisés dans la cuticule préférentiellement sur le bord des cellules de garde des stomates, à la base des trichomes et au niveau des parois cellulaires anticlines (parois se formant

perpendiculairement à la surface d'un organe). Il faut bien comprendre ici que l'on ne doit pas confondre ces pores aqueux avec des pores macroscopiques et permanents (pour revue, voir Schönherr, 2006).

Trouvelot *et al.* (2014) ajoutent que la voie de passage cuticulaire des glucides présente de faibles limites d'exclusion de taille (autour de 2 nm), alors que la voie stomatale permet l'entrée de plus grosses molécules (au-delà de 43 nm de diamètre) (Eichert et Goldbach, 2008). Cependant, seul un nombre de stomates limité permet de participer à cette diffusion (moins de 10 % des stomates totaux dans le cas d'*Allium porrum* L. (Eichert et Burkhardt, 2001)).

I.1.6.1.1.2 Les trichomes

Les excroissances épidermiques situées sur la cuticule sont appelées trichomes (Zaffran, 1998; Laberche, 2010). Deux grands types d'appendices pluricellulaires épidermiques sont observés sur la feuille de Stévia : les trichomes non glandulaires et les trichomes glandulaires (produisant des sécrétions) (Figure I-19, Figure I-20, Figure I-21 et Figure I-22). Parmi les trichomes non glandulaires, les auteurs distinguent les trichomes longs des trichomes courts. Longs, ils sont de forme conique, droits ou courbés, composés de huit à seize cellules en colonne (on les qualifie ainsi de trichomes unisériés) et d'une longueur de 210 à 650 µm. A leur base, on observe un piédestal formé de 6 à 12 cellules épidermiques (la base est donc plurisériée) (Figure I-19 et Figure I-20a). Courts, ce sont des filaments pluricellulaires de 4 à 8 cellules alignées (trichomes unisériés), plus fins que les grands trichomes, leur taille est comprise entre 80 et 175 µm, et leur sommet est arrondi (Figure I-19 et Figure I-20b) (Tateo *et al.*, 2001; Bondarev *et al.*, 2010). Les trichomes non glandulaires sont habituellement métaboliquement inactifs (Aschenbrenner *et al.*, 2013). Bien que Hohmann (1978) ait suggéré une fonction sécrétoire aux trichomes non glandulaires de *Stevia rebaudiana*, les tests histochimiques réalisés par Tateo *et al.* (2001) n'ont pas permis de le confirmer. Peut-être existe-t-il en réalité un second type de trichome physiologiquement actif chez la Stévia : le trichome long glandulaire? En effet, comme le souligne Aschenbrenner *et al.* (2013), un trichome linéaire glandulaire est visible sur les micrographies de Monteiro *et al.* (2001), alors qu'il n'en est pas fait état dans l'étude de ce dernier (Figure I-22). Les cellules de ce trichome apparaissent de plus nucléées, alors que les trichomes non glandulaires sont très souvent constitués de cellules mortes, vides de toute structure. C'est de surcroit un type de trichome communément retrouvé chez toutes les espèces de la famille des Asteraceae (Aschenbrenner *et al.*, 2013). Les trichomes courts et longs de Stévia n'ont jamais été observés qu'en microscopie électronique à balayage, technique ne permettant pas de déceler le contenu cellulaire, ou en microscopie photonique, mais après traitement à l'hydrate de chloral (Lata *et al.*, 2013), affectant le contenu cellulaire. Ainsi, nous n'excluons pas que les trichomes courts soient en réalité glandulaires.

Les trichomes glandulaires de Stévia décrits dans la littérature (Figure I-19, Figure I-20c, Figure I-21c et Figure I-22) sont quant à eux profondément ancrés dans l'épiderme foliaire, et composés de deux colonnes de cinq cellules (trichomes bisériés) avec une tête proéminente (Tateo *et al.*, 2001;

Monteiro *et al.*, 2004). Ils ont une fonction sécrétoire et génèrent de l'huile essentielle comme cela a été décrit par différents auteurs (Tateo *et al.*, 2001; Markovic *et al.*, 2008; Wölwer-Rieck *et al.*, 2014). Pour former la gaine sécrétoire, la membrane cuticulaire se détache de la paroi externe des cellules apicales sécrétoires, le long d'une ligne qui apparaît être la couche de pectine (Monteiro *et al.*, 2003).

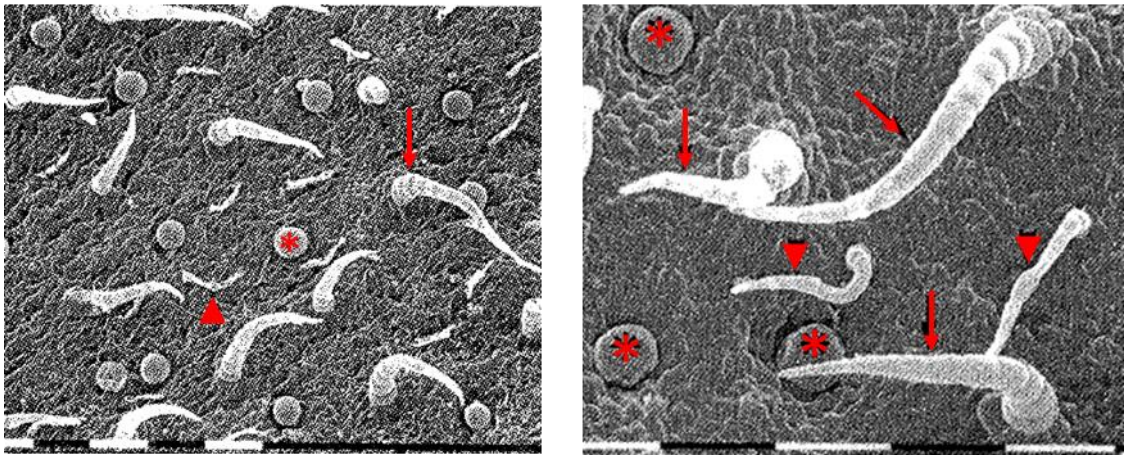


Figure I-19 Trichomes observés à la surface de la feuille de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Tateo *et al.*, 2001). Flèche : trichome long non glandulaire ; pointe de flèche : trichome court non glandulaire ; astérisque : trichome glandulaire. Microscopie électronique à balayage ; échelle = 100 µm

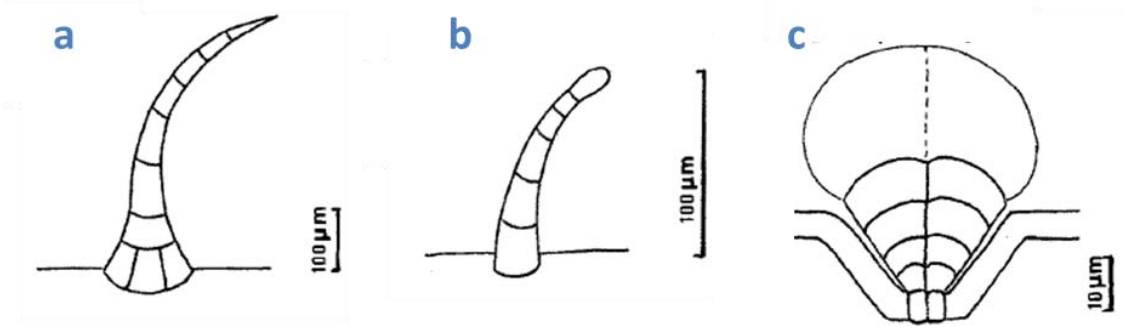


Figure I-20 Diagramme montrant les différents types de trichomes : glandulaires (c) et non glandulaires (long unisérié, plurisérié à la base (a) et court unisérié (b)) présents sur les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Tateo *et al.*, 2001)

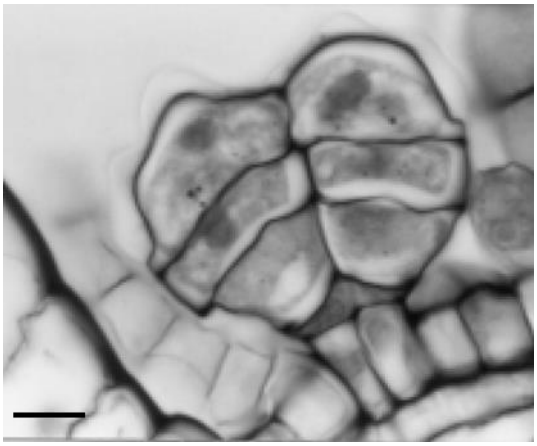


Figure I-21 Trichome glandulaire bisérié de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Monteiro *et al.*, 2001). Microscopie électronique à transmission ; échelle = 10µm

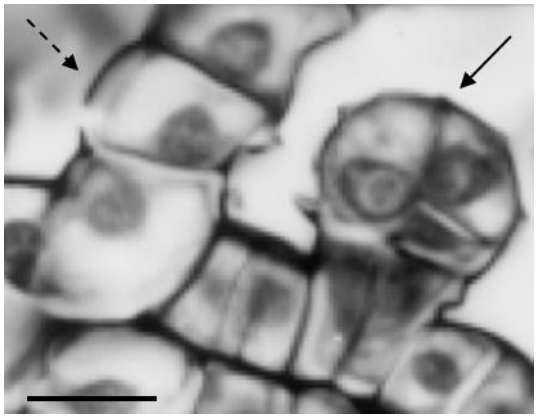


Figure I-22 Trichomes de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Monteiro *et al.*, 2001); flèche pleine : trichome glandulaire. La flèche en pointillés pourrait désigner un trichome non encore décrit chez la Stévia : le trichome linéaire unisérié glandulaire. Microscopie électronique à transmission, échelle = 10 µm

Les trichomes foliaires ont différentes fonctions : ils peuvent altérer la couche limite au-dessus de la feuille, contribuer à canaliser la lumière, protéger contre les stress thermiques, ou encore réduire la perte d'eau lors de la transpiration (Aschenbrenner *et al.*, 2013). Lorsqu'ils sont denses, leur enchevêtrement réussit à retenir, à l'abri de l'épiderme, une couche d'air qui se sature lentement d'humidité au lieu d'être rapidement renouvelée (Speranza et Calzonigi, 2005).

I.1.6.2 La cellule végétale

La cellule est l'unité fondamentale du vivant. Les cellules sont spécialisées et interdépendantes. De nombreux processus biochimiques s'y déroulent, impliquant un grand nombre de molécules organiques et inorganiques. La Figure I-23 représente le schéma général d'une cellule végétale chloroplastique.

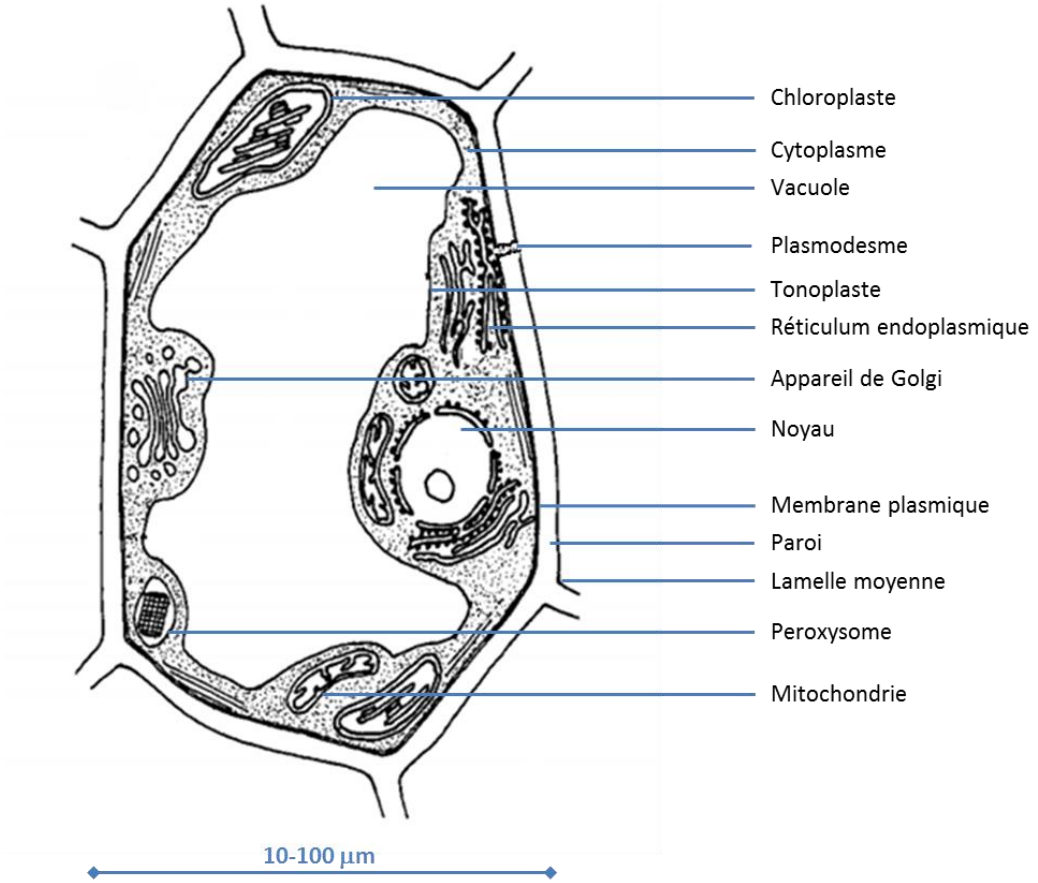


Figure I-23 Représentation schématique d'une cellule végétale chloroplastique (d'après Zaffran (1998))

La cellule végétale (du latin *cellula*, diminutif de *cella*, chambre) est une structure microscopique complexe constitutive des végétaux. Elle est organisée en compartiments et contient différents organites. Au sein de la cellule parenchymateuse chloroplastique, on distinguera principalement une vacuole, et d'autres organites tels que le noyau, les chloroplastes, les réticulums, l'appareil de Golgi, les mitochondries et les peroxysomes. Contenus dans le cytosol, constituant ainsi le cytoplasme, ces différents constituants sont entourés d'une membrane plasmique et d'une paroi primaire. Ces cellules ne possèdent pas de paroi secondaire, à la composition et l'organisation distinctes. La paroi secondaire est déposée à la fin de la croissance de la cellule et seulement autour des cellules qui requièrent une force mécanique importante et un renforcement structural (Cosgrove, 2005).

I.1.6.2.1 La paroi cellulaire primaire

La paroi cellulaire primaire est une matrice hétérogène et complexe de polysaccharides, glycoprotéines, solutés et enzymes, dont la composition varie à l'intérieur d'une même cellule et entre des cellules individuelles. Elle possède une structure similaire à la fibre de verre, avec des microfibrilles de cellulose cristalline intégrées dans une matrice de polysaccharides complexes que l'on peut diviser en deux classes : les pectines et les hémicelluloses. Les parois des cellules primaires sont minces (0,1 à 1 µm) et ne sont pas lignifiées (Braidwood *et al.*, 2014). Elles comprennent de manière générique 15 à 40 % de cellulose, 30 à 50 % de polysaccharides pectiques (les principaux étant le rhamnogalacturonane I et l'homogalacturonane, le xylogalacturonane, l'arabinane, le rhamnogalacturonane II et l'arabinogalactane étant présents en plus faible quantité), 20 à 30 % de xyloglucanes et des quantités moindres d'arabinoxylanes et mannanes (hémicelluloses) et de protéines structurales, sur la base d'une masse sèche. L'organisation des différents composants pariétaux est présentée sur la Figure I-24. Les microfibrilles de cellulose sont synthétisées par de grands complexes hexamériques (cellulose synthases) dans la membrane plasmique, alors que les hémicelluloses et les pectines, qui composent la matrice polysaccharidique, sont synthétisées dans l'appareil de Golgi puis déposées par des vésicules à la surface de la paroi. Les domaines pectiques seraient liés entre eux par des liaisons covalentes et se lieraient aux xyloglucanes par des liaisons covalentes et non-covalentes. Les polysaccharides pectiques neutres (en vert sur la figure 13) sont également capables de se lier à la surface de la cellulose (Cosgrove, 2005; Cosgrove et Jarvis, 2012).

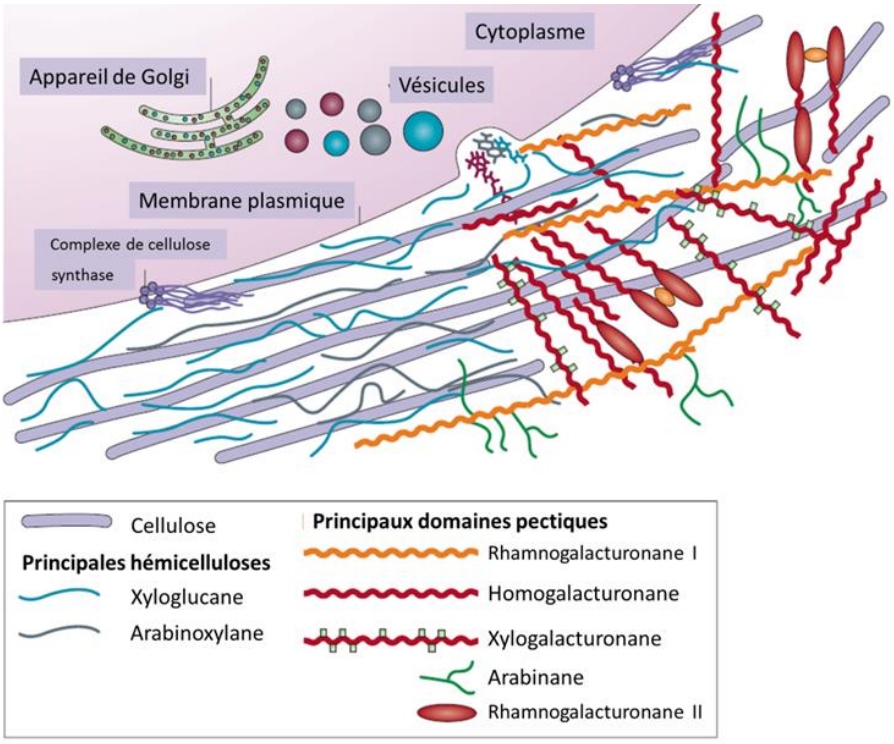


Figure I-24 Structure simplifiée de la paroi primaire. Pour plus de clarté, le réseau hémicelluloses-cellulose est présenté sans pectine sur la partie gauche du schéma (d'après Cosgrove (2005))

Les polysaccharides pectiques sont peut-être les polysaccharides les plus complexes du monde du vivant. Ils forment des gels hydratés, repoussant les microfibrilles et facilitant leur glissement latéral lors de la croissance cellulaire, tout en les bloquant en place lorsque la croissance cesse. Ils sont par ailleurs d'importants déterminants de la porosité et de l'épaisseur pariétales, et collent les cellules ensemble grâce à une couche d'adhésion appelée lamelle moyenne (Figure I-23) (Cosgrove 2005).

La paroi contient par ailleurs un nombre important de protéines telles que les protéines riches en glycine (GRPs) et les glycoprotéines riches en hydroxyproline (HRGPs). Parmi les HRGPs, on compte quatre groupes majeurs : les glycoprotéines riches en proline (PRPS), les lectines, les extensines et les protéines arabinogalactanes (AGPs). Les HRGPs sont toutes glycosylées et contiennent des séquences hautement répétitives qui peuvent être communes. La majorité des protéines de la paroi cellulaire sont réticulées. Elles ont probablement une fonction structurale, même si elles peuvent également participer à la morphogenèse. Les protéines arabinogalactanes sont facilement solubles et pourraient jouer un rôle majeur dans les interactions cellule-cellule au cours du développement (pour revue, voir Cassab, 1998 et Hijazi *et al.*, 2014).

La paroi cellulaire permet non seulement de renforcer la plante, mais joue également un rôle dans la croissance du végétal, la différenciation cellulaire, la communication entre les cellules, les mouvements de l'eau et la défense (Cosgrove, 2005).

Si aucune étude, à notre connaissance, ne mentionne la composition pariétale des cellules de *Stevia rebaudiana* Bert., de Oliveira *et al.* (2013) ont mis en évidence la présence d'arabinogalactanes dans la feuille de Stévia.

I.1.6.2.2 La membrane plasmique

Toutes les cellules vivantes sont enveloppées d'une membrane plasmique qui forme une barrière essentielle entre l'intérieur de la cellule et l'environnement extracellulaire. Chez les cellules végétales, la membrane plasmique est entourée de la paroi, précédemment décrite. Les modèles classiques des membranes cellulaires, tel que le modèle de la mosaïque fluide (Singer, 1972), ont décrit la membrane comme une solution de protéines diffusant dans une bicouche visqueuse de solvant phospholipidique (Figure I-25).

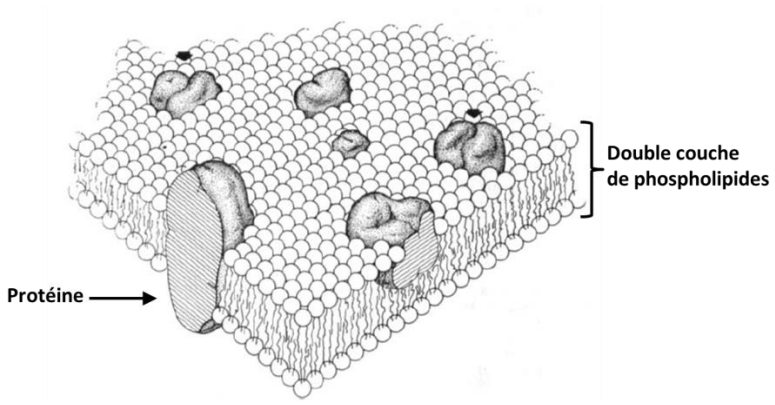


Figure I-25 Représentation schématique de l'organisation tridimensionnelle de la structure en mosaïque fluide de la membrane plasmique (d'après Singer (1972))

Cependant, les preuves suggérant l'existence de sous-structures membranaires compartimentalisées à l'intérieur de la membrane, appelées micro-domaines, sont maintenant nombreuses. Certains domaines sont attribués aux radeaux membranaires, alors que d'autres seraient produits par les interactions entre le cytosquelette, c'est-à-dire l'ensemble organisé des polymères biologiques qui confèrent à la cellule l'essentiel de ses propriétés mécaniques, et la membrane cellulaire (Li *et al.*, 2013*b*) (Figure I-26).

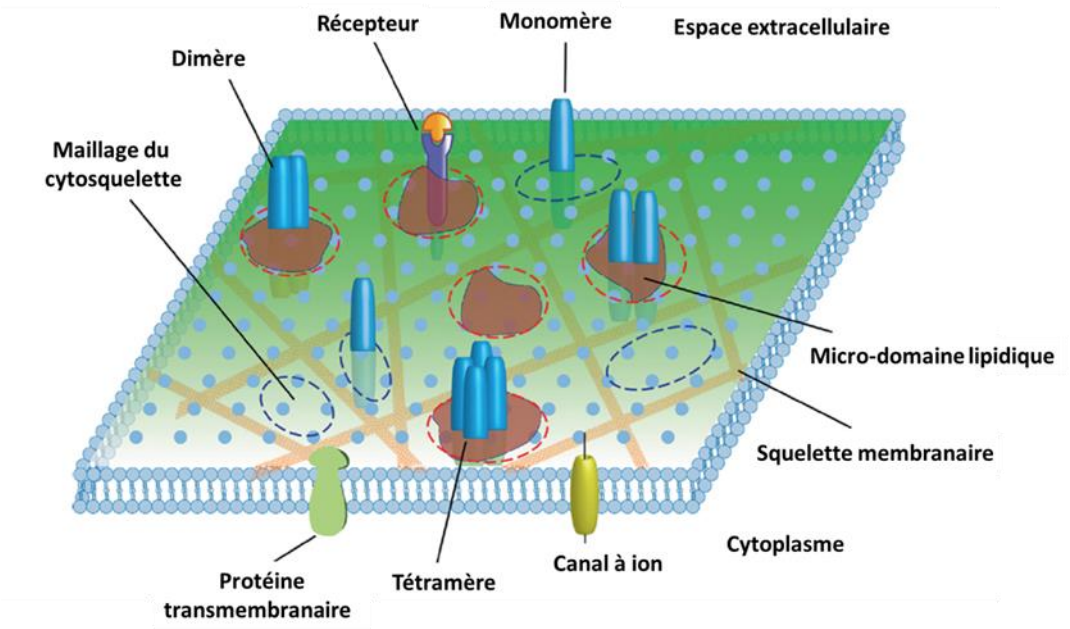


Figure I-26 Représentation schématique actuelle de la structure de la membrane plasmique (d'après Li *et al.* (2013*b*))

Les radeaux membranaires possèdent une composition moléculaire spécifique : ils sont enrichis en stérols et sphingolipides, et sont démunis de phospholipides insaturés. Ils seraient des plateformes de transduction du signal, similaires à ceux décrits chez les mammifères (Mongrand *et al.*, 2010) (Figure I-27).

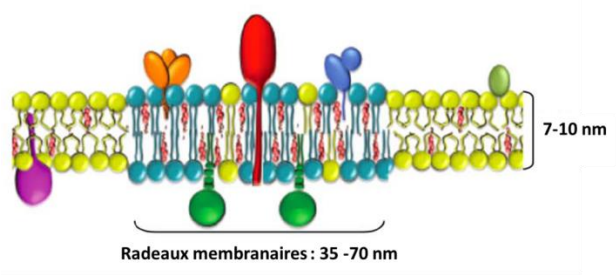


Figure I-27 Organisation moléculaire proposée pour les domaines en radeau à l'intérieur de la membrane plasmique. Phospholipides (en jaune), sphingolipides (en bleu turquoise), stérols libres (en rose), protéine transmembranaire (en rouge) et protéines (en violet, vert et orange) (d'après Mongrand *et al.* (2010))

I.1.6.2.3 Les organites

I.1.6.2.3.1 La vacuole

Petites et nombreuses dans les cellules méristématiques (cellules jeunes non encore différenciées), les vacuoles sont des organites multifonctionnels remplis d'eau qui jouent un rôle central dans les stratégies cellulaires du développement de la plante. Elles croissent avec la cellule et se réunissent entre elles pour ne plus constituer qu'une seule vacuole volumineuse limitée par le tonoplaste. Dans la plupart des cellules des tissus végétatifs, la vacuole peut occuper jusqu'à 95 % du volume cellulaire total, repoussant tout le contenu cellulaire contre la paroi. Les vacuoles végétales sont diverses en taille, en forme et en contenu. Les nombreuses fonctions de cet organite sont la turgescence (c'est-à-dire l'élongation de la cellule par une entrée d'eau), l'homéostasie protoplasmique (le protoplasme étant constitué du cytoplasme, du noyau et des organites vivants cellulaires), le stockage de produits métaboliques, la séquestration de xénobiotiques, et la digestion de constituants cytoplasmiques. Au regard de cette dernière fonction, les vacuoles sont acides et contiennent des enzymes hydrolytiques analogues aux enzymes lysosomales des cellules animales. La membrane de telles vacuoles, le tonoplaste donc, contient des aquaporines spécifiques des organes végétatifs : les g-TIPs (pour Tonoplast Intrinsic Proteins) (pour revue, voir Marty, 1999). Le rôle des aquaporines sera précisé dans la partie I.1.6.3.3. Outre les aquaporines, la régulation du contenu et du volume des vacuoles dépend également de deux types de pompes à protons : l'ATPase-H+ vacuolaire et la pyrophosphatase-H+ (Maeshima, 2001).

I.1.6.2.3.2 Le noyau

Le noyau contient le matériel génétique (ADN) de la cellule et permet de le séparer du cytoplasme. L'ADN est ainsi protégé, et le fonctionnement autonome ainsi que le développement des mécanismes régulateurs au cours du métabolisme cellulaire sont permis.

I.1.6.2.3.3 Les mitochondries et les chloroplastes

Les mitochondries et les chloroplastes sont des organites spécialisés de la cellule. Ils sont le siège des opérations de manipulation de l'énergie. La mitochondrie est le centre de la respiration de la cellule. Elle produit de l'adénosine triphosphate ou ATP, molécule qui, hydrolysée, fournit l'énergie nécessaire aux réactions chimiques du métabolisme. Le chloroplaste, quant à lui, est le siège de la photosynthèse. Mitochondries et chloroplastes sont les seuls organites à posséder leur propre ADN.

I.1.6.2.3.4 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) forme le premier compartiment d'une série d'organites que comprend la voie sécrétoire. C'est un organite multifonctionnel : il est le site de production des protéines sécrétoires, de leur repliement et du contrôle de leur qualité, et également celui de la biosynthèse des lipides. Il est également impliqué dans d'autres fonctions telles que la régulation de l'auxine (une hormone végétale exerçant un contrôle sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation), l'homéostasie du calcium, et la formation de corps protéiques et lipidiques. Il est enfin intimement impliqué dans le processus autophagique. Alors qu'historiquement le RE est décrit sous deux formes, granuleux ou lisse, selon respectivement la présence ou l'absence de ribosomes attachés à sa surface, il est plus approprié de parler en termes de RE tubulaire ou cisternal, les deux pouvant supporter la synthèse de protéines (pour revue, voir Hawes *et al.*, 2015).

I.1.6.2.3.5 L'appareil de Golgi

Morphologiquement, l'appareil de Golgi est unique, puisque formé de centaines de piles individuelles de citernes aplaties qui sont mobiles, et qui demeurent intactes durant la division cellulaire. Les caractéristiques fonctionnelles exclusives de l'appareil de Golgi incluent la synthèse et le trafic d'hydrates de carbone complexes pour la paroi cellulaire, et le transport de protéines jusqu'aux vacuoles et aux chloroplastes (Faso *et al.*, 2009).

I.1.6.2.3.6 Les peroxysomes

Microsomes limités par une membrane, les peroxysomes se trouvent à proximité des chloroplastes. Ils sont caractérisés par la présence d'oxydases qui séparent l'hydrogène du substrat qui leur est spécifique et le transfèrent à de l'oxygène élémentaire. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi formé sera décomposé par une catalase en O_2 et H_2O. Le type d'oxydase varie selon le type de cellule et la fonction. Les peroxysomes foliaires oxydent l'acide glycolique engendré par la photorespiration (les électrons seront transférés sur l'oxygène, il en résultera de l'H_2O_2) puis restituent de l'acide glyoxilique aux chloroplastes. Cet acide glyoxilique est en outre transformé en glycine qui est transférée aux mitochondries (Nultsch, 1998; Bowes et Mauseth, 2012).

I.1.6.3 Les voies de transport radial de l'eau et des solutés dans les tissus végétaux

Alors que le transport axial permet le mouvement de l'eau chargée en différents solutés le long des vaisseaux de la plante, le transport radial implique trois voies : la voie apoplasmique, par laquelle l'eau traverse l'ensemble des interstices des parois cellulaires (par simple diffusion passive) et des cellules mortes du xylème, la voie symplasmique qui comprend les mouvements d'eau *via* les plasmodesmes et le cytoplasme, et la voie transcellulaire, dans laquelle l'eau traverse les parois, et par le biais d'aquaporines, les membranes cellulaires. Les deux dernières voies ne pouvant pas être empiriquement différenciées, elles sont regroupées sous la voie dite « de cellule à cellule » (Steudle et Frensch, 1996).

I.1.6.3.1 Les plasmodesmes et la voie symplasmique

Afin d'assurer la communication intercellulaire, fondamentale à la multicellularité, les cytoplasmes des cellules adjacentes sont mis en réseau *via* les plasmodesmes, canaux membranaires d'un diamètre moyen de 50 nm, formant un *continuum* symplasmique entre les cellules et permettant ainsi l'échange moléculaire direct (Kitagawa, 2015). Les plasmodesmes sont en nombre variable (0,1 à 10 par μm^2) et souvent groupés dans des régions où la paroi est amincie (Heller, 2004) (Figure I-28).

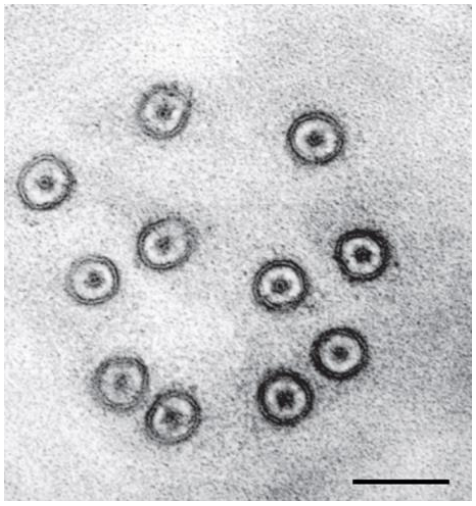


Figure I-28 Section transversale de plasmodesmes entre des cellules adjacentes de parenchyme dans une feuille de canne à sucre (Robinson-Beers et Evert, 1991, reproduit par Roberts et Oparka, 2003), échelle = 100 nm

Le réticulum endoplasmique est continu entre deux cellules adjacentes à l'intérieur du plasmodesme, formant le desmotubule (Figure I-29). Différents modèles structuraux du desmotubule ont été postulés : selon Gunning et Overall (1983), il aurait une structure cylindrique et membraneuse avec un lumen interne, alors que Tilney *et al.*, (1991) le proposent plutôt comme une tige solide et protéinacée (Roberts et Oparka, 2003).

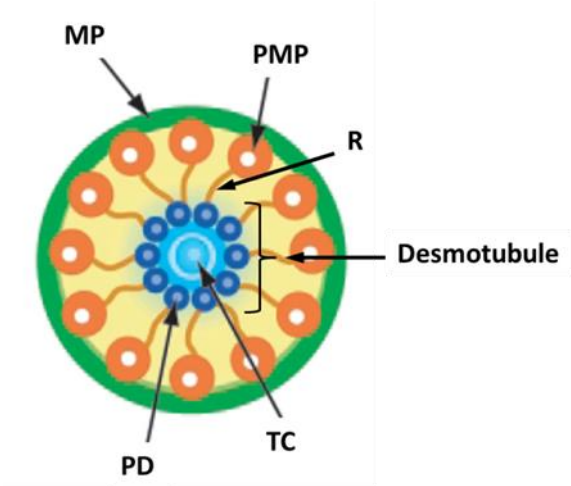


Figure I-29 Représentation schématique de la structure d'un desmotubule à l'intérieur d'un plasmodesme en section transversale. MP : membrane plasmique; PMP : protéines intégrées à la membrane plasmique; R : extension en forme de rayon ; PD : protéines intégrées au desmotubule; TC : tige centrale (d'après Roberts et Oparka (2003) basé sur le modèle de Ding *et al.* (1992)

La connectivité des plasmodesmes peut être régulée. Des dépôts de callose (polymère de β-1,3-glucane) au niveau de l'orifice du plasmodesme peuvent en effet mener à sa constriction, réduisant ainsi la taille d'exclusion limite, ou même l'obstruer complètement, bloquant tout trafic plasmodesmal (Lee et Lu, 2011; Kitagawa *et al.*, 2015). Le renouvellement du callose est finement contrôlé par l'activité de callose synthases, de β-1,3-glucanases et de protéines PDLP5 (Plasmodesmata-Located Protein 5). La composition lipidique de la membrane plasmique des plasmodesmes est distincte des autres régions membranaires : elle est riche en sphingolipides complexes, en stérols et glycérolipides, et pourrait également contribuer à réguler la fonction des plasmodesmes (Kitagawa *et al.*, 2015). Ajouté à cela, la signalisation autonome non cellulaire est médiée par de nombreux récepteurs au travers des plasmodesmes suivant la perception de signaux apoplasmiques (Figure I-30).

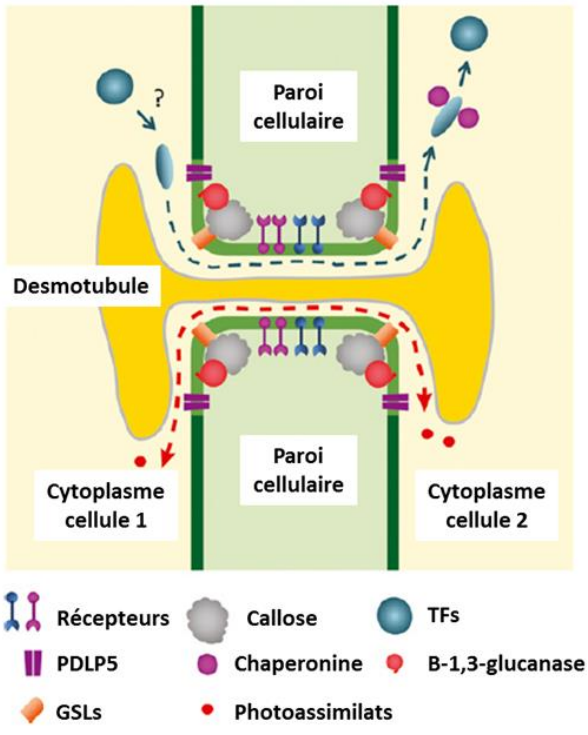


Figure I-30 Représentation schématique de la structure d'un plasmodesme; TFs : facteurs de transcription ; PDLP5 (Plasmodesmata-Located Protein 5) et GSLs (Glucose Synthases) : protéines de régulation de la synthèse de callose (d'après Kitagawa *et al.* (2015))

Les molécules peuvent, selon leur nature, emprunter quatre voies différentes de passage au travers des plasmodesmes qui sont schématisées sur la Figure I-31.

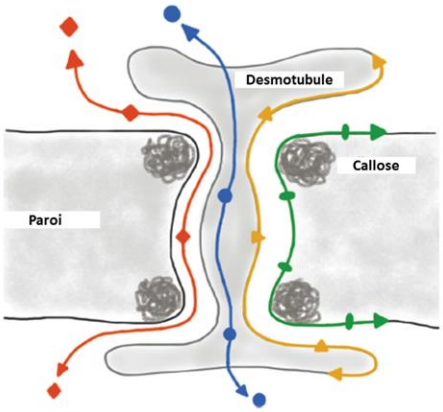


Figure I-31 Les différentes voies de passage des molécules au travers des plasmodesmes : la voie symplasmique (en rouge), le lumen des desmotubules (en bleu), la diffusion latérale dans la membrane plasmique qui borde le plasmodesme (en vert) et la diffusion latérale dans la membrane du desmotubule (en jaune) (d'après Stahl et Simon (2013))

Les plasmodesmes sont les voies de passage majoritaires pour le mouvement de cellule à cellule des micromolécules telles que les photoassimilats (composés carbonés issus de la photosynthèse) et les macromolécules telles que les protéines et les acides nucléiques. Ils ont une taille d'exclusion limite basale, qui est définie comme étant la taille d'exclusion limite « naturelle » des plasmodesmes dans les tissus matures qui n'ont pas été modifiés, par exemple par des stress environnementaux ou chimiques, ou encore des protéines virales de mouvement qui accroissent la taille d'exclusion limite. Cette taille d'exclusion basale est variable à l'intérieur des tissus et des organes, suivant le stade de développement de la plante, et entre les espèces. Bien que de nombreuses études rapportent une taille d'exclusion limite comprise entre 850 et 900 Da (pour revue voir Lucas *et al.*, 1993), il apparaît maintenant que cette taille est considérablement plus élevée pour de nombreuses cellules (Roberts et Oparka, 2003). Si des molécules sont plus petites que la taille d'exclusion limite basale des plasmodesmes, le transport intercellulaire se fait par diffusion. Les sucres, les métabolites, les ions et les acides aminés diffuseraient ainsi au travers du manchon cytoplasmique des plasmodesmes. Les molécules plus larges que la taille d'exclusion limite basale (exemple des facteurs de transcription (TFs), Figure I-30) requièrent quant à elles un transport sélectif et peuvent être transportées grâce à des protéines porteuses appelées chaperonines. Durant le transport sélectif, des changements conformationnels, non nécessairement permanents, peuvent se produire dans le pore plasmodesmal. Dans le cas de ce dernier mode de transport actif, Oparka *et al.* (1999) ont pu mettre en évidence une taille moléculaire d'exclusion limite de 50 kDa. Pour ce qui est du transport passif, le travail séminal de Terry et Robards (1987) suggère que le rayon de Stokes, plus que la masse moléculaire, est déterminant pour le passage de petites molécules au travers du plasmodesme, que le taux de diffusion est directement corrélé au rayon de la molécule perméante, et que de faibles variations dans le rayon de Stokes pourraient causer d'importantes différences de mobilité des molécules (Oparka et Roberts, 2001). Le rayon de Stokes d'une molécule est le rayon d'une particule sphérique qui aurait le même comportement hydrodynamique que la molécule considérée. Le point soulevé par Terry et Robards (1987) est d'une importance cruciale, puisqu'un dextrane de 25 kDa a le même rayon de Stokes qu'une protéine globulaire de 51 kDa, soulignant le fait qu'à des tailles

d'exclusion limite élevées, la masse moléculaire peut être un mauvais indicateur du potentiel de transport au travers des plasmodesmes (Roberts et Oparka, 2003). Les travaux de Terry et Robards (1987) ont également permis de mettre en évidence que le diamètre du canal dans le cytoplasme d'un plasmodesme est de 4 nm.

I.1.6.3.2 La voie apoplasmique

L'apoplasme est l'ensemble des parois, lacunes et méats du végétal. Il est ouvert à la libre diffusion de l'eau et des solutés (ions et molécules) grâce aux propriétés hydrophiles de la paroi, leur permettant ainsi de s'infiltrer jusqu'aux organes sans même pénétrer dans une cellule. Il constitue ainsi un milieu de transport intercellulaire (Heller *et al.*, 2004).

I.1.6.3.3 Les aquaporines et la voie transcellulaire

Les aquaporines sont les protéines intrinsèques de la membrane plasmique (PIPs) qui, assemblées sous forme de canaux, facilitent la diffusion passive de l'eau et/ou de petits solutés non chargés (urée, acide borique, acide silicique) ou de gaz (ammoniac, dioxyde de carbone) à travers la membrane cellulaire (Maurel *et al.*, 2008; Hachez *et al.*, 2013). Elles appartiennent à une grande famille de protéines membranaires homologues à la protéine intrinsèque majeure bovine (MIP) et possèdent une structure similaire avec six domaines transmembranaires et une symétrie interne montrant deux motifs Asn-Pro-Ala hautement conservés (Maurel et Chrispeels, 2001) (Figure I-32). Le nombre important d'isoformes de PIPs retrouvé chez les végétaux reflète l'importance physiologique des aquaporines dans le maintien de l'équilibre de l'eau chez la plante. Ces canaux sont finement régulés à de multiples niveaux afin de contrôler leur abondance et leur activité dans la membrane plasmique (Hachez *et al.*, 2013).

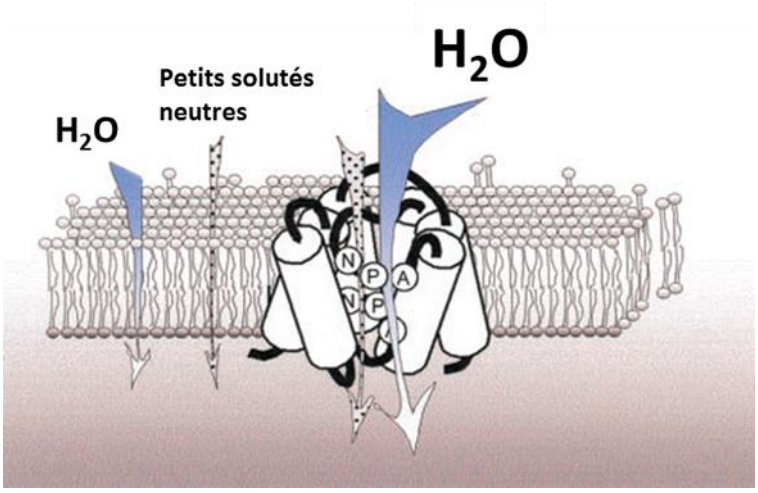


Figure I-32 Les aquaporines facilitent la diffusion membranaire de l'eau et des petits solutés au travers de la membrane plasmique. La perméabilité membranaire résiduelle de la membrane lipidique à ces molécules est également indiquée sur le schéma (d'après Maurel et Chrispeels (2001))

La Figure I-33, la Figure I-34 et la Figure I-35 représentent les trois voies de transport radial au sein des tissus végétaux :

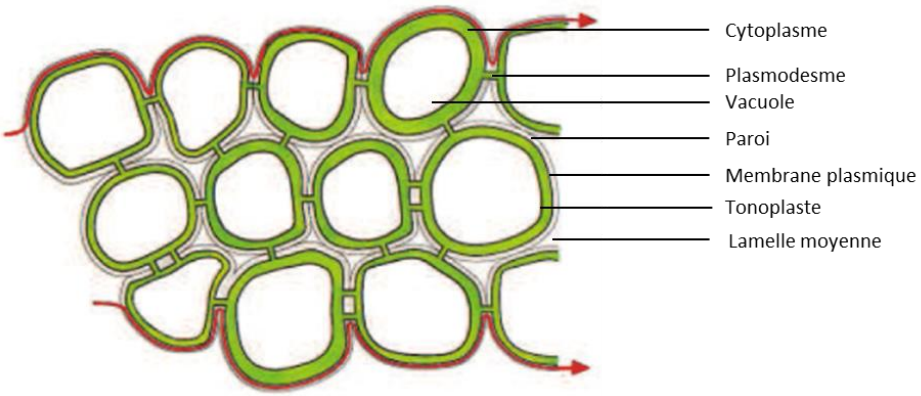


Figure I-33 Schéma de la voie apoplasmique où l'eau et les solutés diffusent librement à travers les parois cellulaires (d'après Steudle et Frensch (1996))

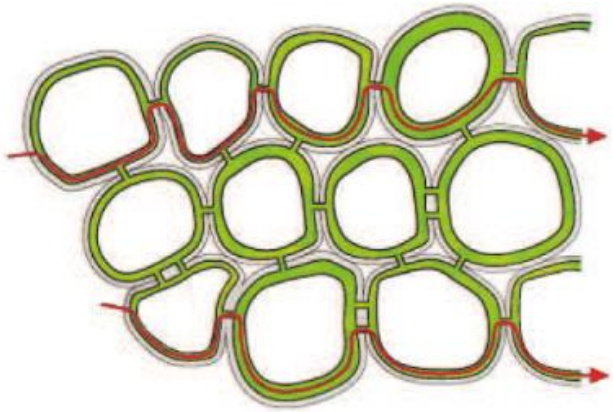


Figure I-34 Schéma de la voie symplasmique régie par les plasmodesmes qui relient les cellules entre elles (d'après Steudle et Frensch (1996))

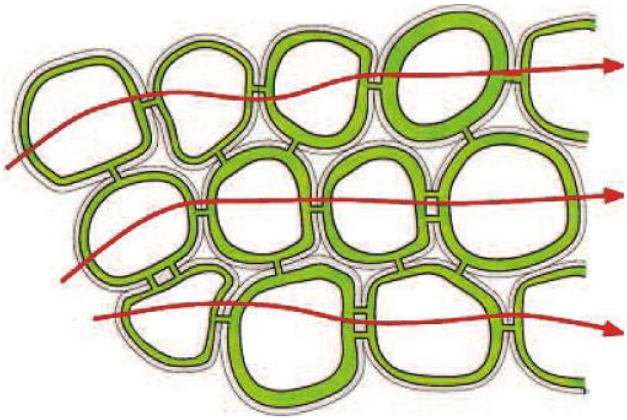


Figure I-35 Voie transcellulaire régie par les aquaporines qui permettent la diffusion de l'eau et des solutés à travers les membranes cellulaires (d'après Steudle et Frensch (1996))

De ces trois voies, la voie symplasmique est la voie la plus fréquemment utilisée, sauf s'il y a accumulation vacuolaire de sucre contre le gradient de concentration, comme par exemple dans la racine de betterave ou la tige de canne à sucre : la voie apoplasmique s'impose alors. Dans ce cas, il y a en général hydrolyse du saccharose à la sortie du complexe conducteur par une invertase apoplasmique, suivie d'un transport actif dans la cellule d'appel. Il y a ensuite symport sucre-protons à travers la membrane plasmique de la cellule accumulatrice, puis traversée du tonoplaste par antiport (Robert et Catesson, 2000).

I.1.7 Composition des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni

L'intérêt de l'utilisation de *Stevia rebaudiana* Bertoni comme édulcorant commercial a mené à des investigations phytochimiques étendues de l'espèce, permettant l'identification de plus de trois cents composés. Si l'on exclut les glycosides de stéviol, son profil chimique n'est pas fondamentalement différent de ceux décrits chez les autres membres de la tribu des Eupatorieae (Cerda-Garcia-Rojas et Pereda-Miranda, 2002; Kennelly, 2002). Dans la description qui va suivre, nous distinguerons les métabolites primaires des métabolites secondaires, et porterons une attention plus particulière aux glycosides de stéviol.

I.1.7.1 Métabolites primaires

Les métabolites primaires ont un rôle essentiel pour le métabolisme et le développement du végétal. Ils contiennent trois différents types de composés organiques : les glucides, les lipides et les protéines.

I.1.7.1.1 Les glucides

Les glucides sont des composés importants de stockage et de structure de la matière végétale. Ils existent sous forme de sucres libres ou de polysaccharides. Dans la feuille de Stévia, leur teneur a été déterminée par différence ou par la méthode à l'Anthrone (Dreywood, 1946). Le calcul par différence a été effectué en soustrayant à la masse totale de l'échantillon ses teneurs en protéines, en lipides, en cendres, en eau et en fibres brutes (si cette dernière a été déterminée). La méthode à l'Anthrone repose sur l'analyse des sucres simples obtenus après hydrolyse acide de la matière. Ces deux méthodes sont donc approximatives. Il n'est donc pas étonnant que les résultats soient très disparates : en effet une valeur moyenne de 49,6 ± 9,9 g de glucides totaux / 100 g de matière sèche a été obtenue par les auteurs (Tableau I-2). Tadhani et Subhash (2006) sont les seuls auteurs à avoir utilisé la méthode à l'Anthrone. La valeur obtenue (35,2 g de glucides totaux / 100 g de matière sèche) est bien plus basse que celles déterminées par les autres auteurs. La méthode par différence semblerait donc surestimer les quantités de glucides totaux. Les écarts entre les valeurs obtenues par les auteurs pourraient cependant également être attribuables aux origines géographiques des plantes analysées : Egypte (Abou-Arab *et al.*, 2010), Espagne (Wölwer-Rieck, 2012), Inde, Pakistan (Savita *et al.*, 2004; Tadhani et Subhash, 2006; Kaushik *et al.*, 2010) ou encore Paraguay (Wölwer-Rieck, 2012). Il est donc fortement probable qu'elles n'aient pas le même génotype, qu'elles aient été cultivées différemment ou encore qu'elles n'aient pas été récoltées au même stade ontogénétique.

Certains auteurs ont également déterminé la teneur en fibres brutes. Ce sont les composés polysaccharidiques des parois cellulaires végétales : la cellulose, les hémicelluloses et les lignines. La méthode de dosage utilisée, suite à des extractions successives acides et basiques à chaud de la

matière végétale, sous-estime la quantité totale de polysaccharides pariétaux (Baker, 1977). La teneur moyenne obtenue par les auteurs est de 14,6 ± 2,8 g / 100 g de matière sèche (Tableau I-2).

Comme spécifié dans la Partie I.1.6.2.1, de Oliveira *et al.* (2013) ont aussi identifié des arabinogalactanes ainsi que des fructooligosaccharides (de Oliveira *et al.*, 2011). D'après Kennelly (2002) du saccharose et du glucose sont également présents dans les feuilles de Stévia.

I.1.7.1.2 Les protéines

Les protéines sont des molécules formées par une ou plusieurs chaînes d'acides aminés. Leur teneur chez la Stévia a été déterminée à partir du dosage de l'azote total par la méthode Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Une valeur moyenne de 13,3 ± 3,2 g de protéines / 100 g de matière sèche a été obtenue par différents auteurs (Tableau I-2). Comme pour les glucides totaux les écarts observés entre les valeurs peuvent être expliqués par le manque de précision de la méthode utilisée ainsi que par les différences de génotype, de stade ontogénétique et de mode de culture des plantes.

I.1.7.1.3 Les lipides

Les lipides sont des molécules hydrophobes ou amphiphiles (composés chimiques constitués de longues chaînes carbonées apolaires et d'une tête polaire). Leur teneur moyenne dans la feuille a été déterminée chez *Stevia rebaudiana* par extraction au solvant (alcool-éther). Elle est de 3,6 ± 1,2 g de lipides / 100 g de matière sèche (Tableau I-2). La variabilité des différentes teneurs obtenues peut être expliquée de la même façon que pour les glucides et les protéines.

Le profil en acides gras des lipides des feuilles de Stévia a été déterminé (Tableau I-3). Korobko *et al*. (2008) identifient les acides linolénique et linoléique comme majoritaires, auxquels Tadhani et Subhash (2006) ajoutent l'acide palmitique. Pour ce dernier acide, l'écart observé entre les deux auteurs (27,5 % pour Tadhani et Subhash contre 2,1 % pour Korobko *et al*.) est difficilement explicable.

D'autres lipides tels que les triterpénoïdes, les phytostérols, les pigments, les glycolipides et les phospholipides ont également été décrits (Ceunen et Geuns, 2013*a*). Parmi les triterpénoïdes, on trouve la β-amyrine, le lanostérol, le lupéol et ses esters. Les stérols sont une sous-catégorie de stéroïdes qui sont des lipides mineurs de triterpènes. Ils possèdent un noyau stérane avec un groupe hydroxyle. Chez l'être humain le stérol le plus connu est le cholestérol. Le stigmastérol et le β-sitostérol ont été identifiés chez la Stévia. Ce sont des composés classiquement présents dans les plantes (Sholichin *et al.*, 1980; Cerda-Garcia-Rojas et Pereda-Miranda, 2002; Kennelly, 2002; Ibrahim *et al.*, 2006; Korobko *et al.*, 2008; Hossain *et al.*, 2011; Sheeja et Lawrence, 2015). Les pigments déterminés chez la Stévia sont les chlorophylles (a et b) et le β-carotène (Kennelly, 2002; Yildiz-Ozturk *et al.*, 2014).

Tableau I-2 Teneurs en métabolites primaires des feuilles de *Stevia rebaudiana* séchées (résultats exprimés en g/100g de masse sèche)

	Références									
	Abou-Arab *et al.* (2010)	Goyal *et al.* (2010)	Kaushik *et al.* (2010)		Savita *et al.* (2004)	Serio (2010)	Shivanna *et al.* (2013)	Tadhani *et al.* (2006)	Wölwer-Rieck (2012)	
			Eté	Mousson					Paraguay	Espagne
Glucides totaux	61,9	N.D.	N.D.	N.D.	52	53	46,1	35,2	N.D.	N.D.
Fibres brutes	15,5	15,2	N.D.	N.D.	18,5	15	15,9	N.D.	12,1	9,8
Protéines	11,4	11,2	12,0	12,9	9,8	11,2	16,0	20,4	15,5	12,1
Lipides	3,7	1,9	2,7	3,7	3	5,6	2,3	4,3	5,0	3,6

N.D. : non déterminé

Tableau I-3 Profil des principaux acides gras des feuilles de *Stevia rebaudiana* (résultats exprimés en g/100g d'huile de feuille de Stévia)

Acide gras	Tadhani *et al.* (2006)	Korobko *et al.* (2008)
Acide palmitique (C16:0)	27,5	2,1
Acide palmitoléique (C16:1)	1,3	ND
Acide stéarique (C18 0)	1,2	2,0
Acide oléique (C18:1)	4,4	N.D.
Acide linoléique (C18:2)	12,4	9,3
Acide linolénique (C18:3)	21,6	25,0

N.D. : non déterminé

I.1.7.2 Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires, dont la distribution est parfois centrée sur des groupes taxonomiques très ciblés, peuvent avoir de nombreuses fonctions biologiques comme l'attraction de pollinisateurs (Kessler et Baldwin, 2007), l'activité antioxydante (Erel *et al.*, 2011), la cicatrisation des plaies (Bernards et Lewis, 1992) ou encore la protection contre les pathogènes (Dixon et Harrison, 1990). Dans cette étude ils ont été répartis en 4 catégories : les diterpènes, les composés volatils, les composés phénoliques et les autres métabolites secondaires.

I.1.7.2.1 Les diterpènes

Les diterpènes sont des molécules à 20 atomes de carbone constituées de 4 unités d'isoprène, dont les plus connus chez la Stévia sont les glycosides de stéviol. La description de ces derniers sera détaillée dans la partie I.2.

Des diterpènes de type labdanes ont aussi été identifiés chez la Stévia : les stérébines A à N, le jhanol, l'austroinuline et la 6-*O*-acétylaustroinuline (Sholichin *et al.*, 1980; Oshima *et al.*, 1986, 1988; Brandle *et al.*, 1998; Kennelly, 2002; McGarvey *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2006). Des exemples de structures de ces molécules sont présentés sur la Figure I-36. D'après Kennelly (2002), ces composés sont présents individuellement en faible quantité dans les feuilles de Stévia : de 0,2 mg à 150 mg / 100 g de matière sèche. Cependant d'après McGarvey *et al.* (2003), leur teneur est significative et ils pourraient être à l'origine de l'arrière-goût amer/astringent associé aux extraits purifiés de glycosides de stéviol. Pour pallier ce problème, ces auteurs suggèrent de développer des variétés de Stévia dans lesquelles la voie de biosynthèse des diterpènes de type labdane serait inhibée.

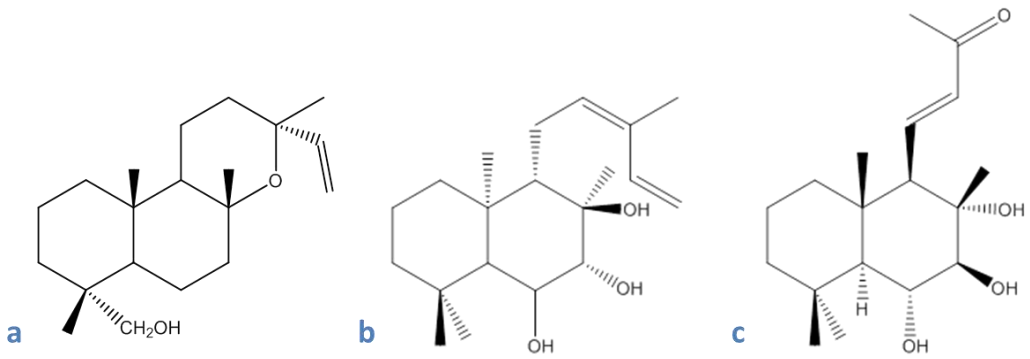


Figure I-36 Exemples de diterpènes de type labdanes issus des les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni : (a) Jhanol (N° CAS = 62929-59-3) (b) Austroinuline (N° CAS = 62868-75-1) (c) Stérébine A (N° CAS = 107647-14-3)

I.1.7.2.2 Les huiles essentielles

Selon la norme AFNOR (1986), les huiles essentielles sont les produits obtenus, soit à partir des matières premières naturelles par distillation à l'eau, soit à partir des fruits de citrus par des procédés mécaniques, et qui sont séparés de la phase aqueuse par des procédés physiques. Les huiles essentielles sont extraites principalement par deux méthodes de distillation (entraînement à la vapeur d'eau et hydrodistillation) et une méthode d'expression à froid dans le cas particulier des agrumes. La présence foliaire d'huile essentielle est un caractère répandu chez les Asteraceae, il n'est donc pas étonnant d'en retrouver chez la Stévia (Cerda-Garcia-Rojas et Pereda-Miranda, 2002). Les rendements, exprimés par rapport à la matière sèche sont très variables d'un auteur à l'autre : 0,025 % (Martelli *et al.*, 1985), 0,35 % (Turko *et al.*, 2007) et 3,5 % (Muanda, 2010). A titre de comparaison avec d'autres végétaux, selon la qualité et la composition de l'huile essentielle, des bons rendements oscillant entre 0,13 % et 2 % peuvent être économiquement intéressants (Sousa *et al.*, 2015). Comme discuté dans la partie I.1.6.1.1.2 les huiles essentielles de feuilles de Stévia seraient contenues dans les trichomes,

structures superficielles de la feuille. Les trois auteurs ont travaillé sur des feuilles de Stévia séchées. Il est possible qu'une partie des composés volatils aient été dégradés pendant le séchage. Ainsi des rendements plus élevés pourraient être espérés avec des feuilles fraîches. Martelli et Turko ont réalisé un entraînement à la vapeur tandis que Muanda a préféré l'hydrodistillation. Le rendement obtenu par Muanda ne pourrait être à lui seul expliqué par la différence de technique utilisée, mais être attribuable au génotype, au stade ontogénétique de la plante au moment de la récolte, aux conditions environnementales (durée du jour, éclairement, température, apport en eau), ou encore aux conditions de culture. De ces derniers peut en effet dépendre la teneur et la composition en huile essentielle (Can Baser et Buchbauer, 2009; Ceunen et Geuns, 2013).

Jusqu'à 300 composés volatils ont été identifiés dans la feuille de Stévia dont une majorité de sesquiterpènes. Parmi les composés majoritaires se trouvent l'α-oxyde de caryophyllène (Figure I-37a) et le spathulénol (Figure I-37b). Ces molécules sont connues pour avoir des propriétés antibactériennes et antimicrobiennes (Martelli *et al.*, 1985; Cioni *et al.*, 2006; Turko *et al.*, 2007; Markovic *et al.*, 2008; Muanda *et al.*, 2011; Siddique *et al.*, 2012; Ceunen et Geuns, 2013*a*).

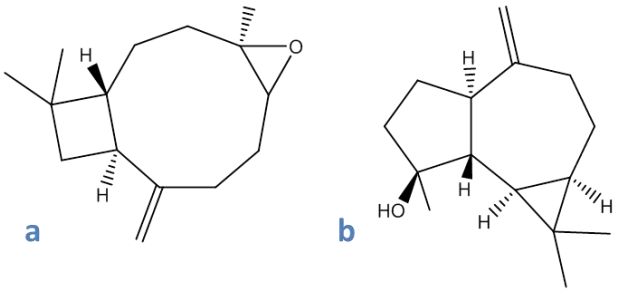


Figure I-37 Exemples de composés volatils contenus dans les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni : (a) Oxyde de caryophyllène (N° CAS = 1139-30-6) (b) Spathulénol (N° CAS = 6750-60-3)

I.1.7.2.3 Les composés phénoliques

Les composés phénoliques jouent un rôle important dans les défenses de la plante contre les agents pathogènes et les agressions des animaux herbivores. Ils agissent aussi comme réponse aux états de stress abiotique comme les précipitations ou les radiations ultraviolet. Ils ont de nombreuses applications en cosmétique et santé humaine. En effet ils peuvent avoir des propriétés antioxydantes, piégeurs de radicaux libres, chélateurs de métaux, inhibiteurs ou réducteurs d'enzymes. Ils peuvent aussi interagir avec les signaux des voies de transduction et les récepteurs de cellules. Ils sont utilisés comme moyen de prévention de maladies chroniques comme le cancer, le diabète ou encore les maladies cardiovasculaires. Ils peuvent aussi posséder des activités antimicrobiennes (Daglia, 2012).

Ils sont divisés en quatre grandes catégories : les flavonoïdes (Figure I-38a), les acides phénoliques (Figure I-38b) et dérivés, les stilbènes (Figure I-38c) et les lignanes (Figure I-38d). Plus de 8000 composés ont été découverts et chaque espèce possède un profil phénolique qui lui est propre

(Wagner, 1979; Collin et Crouzet, 2011). Pour doser les composés phénoliques totaux issus des feuilles de Stévia, la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton et Rossi, 1965) a été utilisée. Les résultats sont exprimés en équivalent d'acide gallique, d'acide tannique ou de catéchine / g ou mg d'extrait ou de feuilles sèches. Il est important de souligner que cette méthode n'est pas spécifique : de nombreuses substances peuvent interférer lors du dosage comme les sucres, les acides organiques ou les ions métalliques (Wölwer-Rieck, 2012). Le Tableau I-4 rassemble les résultats des dosages des composés phénoliques des feuilles de Stévia issus de la littérature. Ces résultats sont difficilement comparables car les standards ou les solvants d'extraction utilisés sont très différents. Cependant tous les auteurs s'accordent sur le fait que les extraits de feuilles de Stévia sont riches en composés phénoliques totaux.

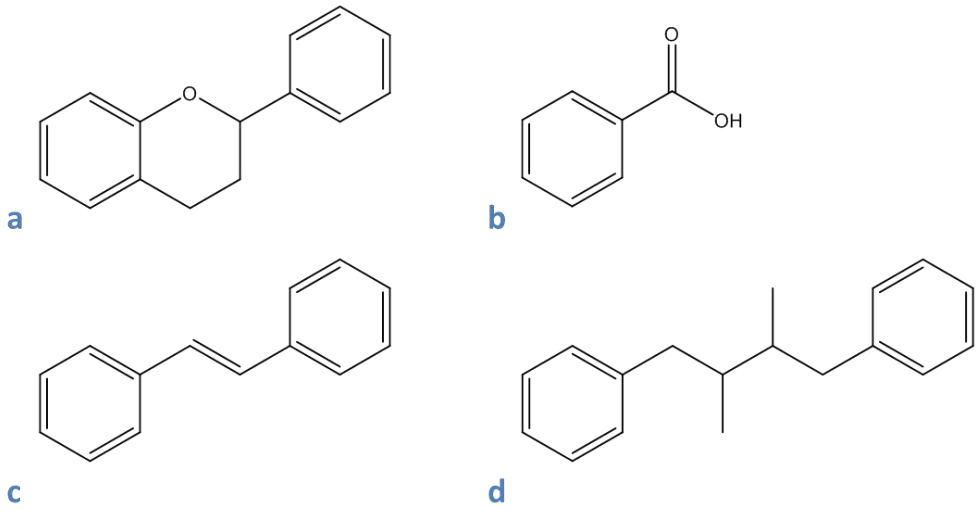


Figure I-38 Structure du squelette carboné des différents composés phénoliques (a) flavonoïde (b) acide phénolique (c) stilbène (d) lignane

Tableau I-4 Teneurs en composés phénoliques des feuilles de *Stevia rebaudiana*

Référence	Composés phénoliques totaux (mg/g)	Solvant d'extraction
Periche *et al.*, (2015*a*)	93,4[a]	Eau
Ruiz Ruiz *et al.* (2014)	28,5[a]	Eau-méthanol
Shivanna *et al.* (2013)	91,0[a]	Eau-méthanol
Ghanta *et al.* (2007)	86,0[a]	Eau-méthanol

Tadhani *et al.* (2007)	25,2[a]	Méthanol
Kaushik *et al.* (2010)	41,5[b]	Eau
Kim *et al.* (2011)	130,7[c]	Eau
Barba *et al.* (2015)	9,0-29,1[d]	Eau
Jahan *et al.* (2010)	15,3-65,0[d]	Eau-éthanol
Shukla *et al.* (2009)	61,5[d]	Ethanol

[a] exprimé en mg d'équivalent acide gallique/g de feuilles sèches
[b] exprimé en mg d'équivalent acide tannique/g de feuilles sèches
[c] exprimé en mg d'équivalent catéchine/g de feuilles sèches
[d] exprimé en mg d'équivalent acide gallique/g d'extrait de feuilles

De nombreux composés phénoliques ont été identifiés dans les extraits de feuilles de Stévia comme des glycosides de flavonol (quercétine, apigénine et leurs dérivés), une grande variété de coumarines et acides cinnamiques (acide ferrulique, acide caféique, acide chlorogénique) ainsi que des tanins et des flavonoïdes. Ces composés pourraient également être à l'origine de l'arrière-goût des produits à base de Stévia (Kennelly, 2002; Tadhani et Subhash, 2006; Hossain *et al.*, 2011; Ceunen et Geuns, 2013*a*; Shivanna *et al.*, 2013; Barba *et al.*, 2015; Sheeja et Lawrence, 2015).

La remarquable capacité antioxydante des extraits de feuilles de Stévia serait positivement corrélée avec leurs teneurs en polyphénols totaux (Tadhani *et al.*, 2007; Shukla *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Criado *et al.*, 2015; Periche *et al.*, 2015*a*).

I.1.7.2.4 Autres métabolites secondaires

De nombreuses autres molécules ont été identifiées dans les feuilles de Stévia :

- Des acides organiques : acide oxalique, acide citrique, acide formique, acide lactique, acide malique acide succinique et acide tartrique (Kennelly, 2002; Savita *et al.*, 2004)
- Des vitamines : acide folique, acide ascorbique et vitamine B2 (Kim *et al.*, 2011)
- Des saponines détectées par criblage phytochimique (Tadhani et Subhash, 2006; Hossain *et al.*, 2011; Sheeja et Lawrence, 2015)
- Des alcaloïdes comme la stéviamine (Tadhani et Subhash, 2006; Hossain *et al.*, 2011; Sheeja et Lawrence, 2015)
- Des anthraquinones détectées par criblage phytochimique (Tadhani et Subhash, 2006; Sheeja et Lawrence, 2015)

I.1.7.3 Cendres et humidité résiduelle

Les feuilles séchées caractérisées par différents auteurs ont une humidité résiduelle moyenne de 7,8 ± 2,5 g pour 100 g de feuilles (Tableau I-5).

La teneur en cendres d'une matière végétale correspond au résidu de cette matière après combustion à 550°C. Les cendres sont composées de minéraux et leur teneur chez la Stévia a été estimée par les auteurs en moyenne à 8,7 ± 2,2 g / 100 g de matière sèche (Tableau I-5). La composition minérale des feuilles de Stévia est donnée dans le Tableau I-6. Le potassium et le calcium sont les composés majoritaires, suivis du magnésium et du phosphore.

Tableau I-5 Teneurs en humidité et en cendres des feuilles de *Stevia rebaudiana* séchées (résultats exprimés en g/100g de masse sèche pour les cendres)

	Références								
	Abou-Arab *et al.* (2010)	Goyal *et al.* (2010)	Kaushik *et al.* (2010)		Savita *et al.* (2004)	Shivanna *et al.* (2013)	Tadhani *et al.* (2006)	Wölwer-Rieck (2012)	
			Eté	Mousson				Paraguay	Espagne
Humidité	5,4	4,7	7,7	8,6	7	13,0	N.D.	7,2	8,8
Cendres	7,4	6,3	8,4	9,5	11	6,6	13,1	7,7	8,1

N.D. : non déterminé

Tableau I-6 Composition minérale des feuilles de *Stevia rebaudiana* (résultats exprimés en mg/100g de masse sèche)

Minéral	Références					
	Goyal *et al.* (2010)	Kaushik *et al.* (2010)		Savita *et al.* (2004)	Serio (2010)	Tadhani *et al.* (2006)
		Eté	Mousson			
Calcium	544	722	808	464	600	1550
Magnésium	349	N.D.	N.D.	349	500	N.D.
Potassium	1780	839	730	1800	1800	2510
Phosphore	318	N.D.	N.D.	11	318	350
Sodium	89	33	63	190	N.D.	160
Fer	4	31	31	55	4	36
Zinc	2	N.D.	N.D.	2	N.D.	6

N.D. : non déterminé

I.2 Les glycosides de stéviol

Les glycosides de stéviol sont les composés responsables des propriétés édulcorantes de la Stévia. Après une description de leurs propriétés physico-chimiques, leur voie de biosynthèse sera abordée.

I.2.1 Description et composition

Les glycosides de stéviol sont des molécules édulcorantes et acaloriques. Par définition, un glycoside est un composé possédant au moins une molécule de glucide liée à groupement non-glucidique (aglycone) (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012). Les glycosides de stéviol ont pour noyau aglycone commun le stéviol. Trente-quatre glycosides de stéviol ont été identifiés, à ce jour, chez *Stevia rebaudiana* Bertoni, ainsi que 8 isomères ou formes glycosylées de stéviol (Tableau I-7, Tableau I-8 et Figure I-39) (Ceunen et Geuns, 2013*a*).

S. rebaudiana est la principale espèce contenant des glycosides de stéviol. De nos jours seules quelques autres espèces accumulant ce type de composés ont été identifiées : *Stevia phlebophylla* A. Gray, *Rubus suavissimus* S. Lee et *Angelica keiskei* (Miq.) Koidz (Ceunen et Geuns 2013*a*). Pour *S. phlebophylla* la situation est ambiguë : des traces de stévioside auraient été détectées par Kinghorn *et al.* (1984) mais cela n'a pas pu être confirmé (Ceunen et Geuns, 2013*a*). Chez *R. suavissimus* du rubusoside, du stéviolmonoside ainsi que d'autres glycosides de stéviol mineurs ont été identifiés dont certains ne sont pas accumulés chez *S. rebaudiana* (Ceunen et Geuns, 2013*a*). Enfin chez *A. keiskei*, un dérivé du rubusoside a été détecté (Ceunen et Geuns, 2013*a*).

Les glycosides de stéviol peuvent représenter jusqu'à 20 % de la teneur en matière sèche des feuilles (Brandle *et al.*, 1998). A l'état purifié, ce sont de fins cristaux ou une poudre hygroscopique blanche. Ils sont presque inodores ou ont une légère odeur caractéristique. Ils sont stables pendant des années quand ils sont sous forme anhydre (Geuns, 2010). Ils sont généralement analysés par CLHP (Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance) couplée à la détection UV (UltraViolet) ou SM (Spectrométrie de Masse). Le JECFA a publié une méthode de dosage CLHP-UV en 2010 (JECFA, 2008). D'autres méthodes d'analyses ont été développées comme la RMN ^{1}H (Résonnance Magnétique Nucléaire du proton) quantitative, La CCMHP (Chromatographie sur Couche Mince à Haute Performance), la CG (Chromatographie en phase Gazeuse) ou encore la SPI (Spectroscopie Proche Infrarouge) (pour revues voir Lemus-Mondaca *et al.* (2012); Wölwer-Rieck (2012); Ceunen et Geuns (2013*a*)).

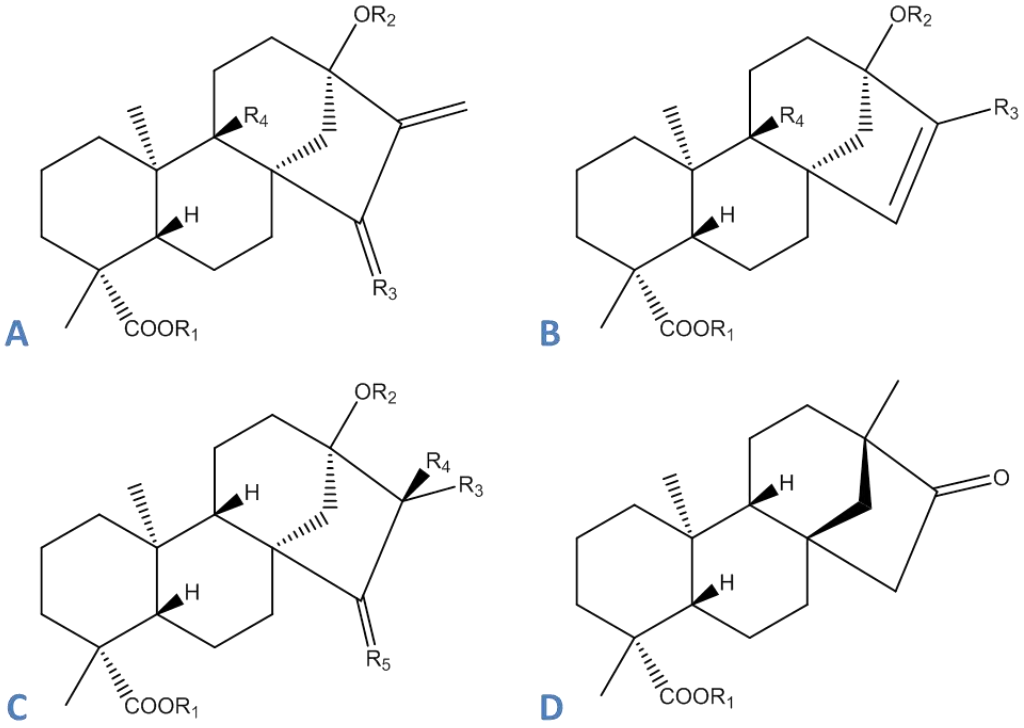


Figure I-39 Aglycones des principaux glycosides des *ent*-kaurane extraits de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Ceunen et Geuns, 2013*a*)

Tableau I-7 Glycosides de stéviol connus extraits de *Stevia rebaudiana* Bertoni, Fru = fructose, Glc = glucose, Rha = rhamnose, Xyl = xylose (Ceunen et Geuns, 2013*a*)

Nom	Aglycone	R_1	R_2	R_3	R_4
Stéviol	A	H	H	H_2	H
Stéviolmonoside	A	H	Glcβ1-	H_2	H
Stéviol-19-*O*-β-D-glucoside	A	Glcβ1-	H	H_2	H
Rubusoside	A	Glcβ1-	Glcβ1-	H_2	H
Stéviolbioside	A	H	Glcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
Stévioside	A	Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside E	A	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside B	A	H	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside A	A	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside D	A	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside I	A	Glcβ(1-3)Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside M	A	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	Glcβ(1-6)Glcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside L	A	Glcβ1-	Glcβ(1-6)Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Dulcoside A	A	Glcβ1-	Rhaα(1-2)Glcβ1-	H_2	H
Dulcoside B	A	H	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside C	A	Glcβ1-	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside H	A	Glcβ1-	Glcβ(1-3)Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside K	A	Glcβ(1-2)Glcβ1-	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside J	A	Rhaα(1-2)Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside N	A	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside O	A	Glcβ(1-3)Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside G	A	Glcβ1-	Glcβ(1-3)Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	Xylβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
Rébaudioside F	A	Glcβ1-	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Xylβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	Xylβ(1-6)Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Fruβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcα(1-2)Glcα(1-4)Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	Glcα(1-3)Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	Glcα(1-4)Glcβ(1-3)[Glcβ(1-2)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	6-deoxyGlcβ(1-2)Glcβ1-	H_2	H
-	A	Glcβ1-	6-deoxyGlcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H
-	A	6-deoxyGlcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	H_2	H

Tableau I-8 Isomères et formes glycosylées des stéviols oxydés connus extraits de *Stevia rebaudiana* Bertoni, Glc = glucose (Ceunen et Geuns, 2013*a*)

Nom	Aglycone	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
-	B	Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	CH_3	H	-
-	B	H	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	CH_3	H	-
-	B	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	CH_3	H	-
-	B	Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	CH_2OH	H	-
-	B	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	CH_2OH	H	-
-	B	Glcβ1-	Glcβ(1-2)Glcβ1-	CHO	H	-
-	C	H	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	OH	CH_3	H_2
-	C	Glcβ1-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]Glcβ1-	OH	CH_3	H_2
Isostéviol-19-*O*-β-D-glucoside	D	Glcβ1-	-	-	-	-

Parmi tous les glycosides de stéviol identifiés chez la Stévia, 8 ont été plus étudiés que les autres (Tableau I-9). Il s'agit du stévioside, des rébaudiosides A, C, D, E et F, du dulcoside A et du stéviolbioside, premiers composés identifiés chez la plante présents majoritairement dans les feuilles. Une composition moyenne de ces molécules est donnée dans le Tableau I-9, elle peut être variable, puisqu'elle dépend du génotype, du stade ontogénétique et des conditions de culture de la plante (Lemus-Mondaca *et al.*, 2012; Wölwer-Rieck, 2012; Ceunen et Geuns, 2013*a*). Le stévioside et le rébaudioside A (Figure I-40) sont les molécules les plus connues et les plus commercialisées. Généralement le *ratio* stévioside/rébaudioside A des espèces sauvages de Stévia est d'environ 2 (Dacome *et al*,. 2005).

Tableau I-9 Composition et propriétés des principaux glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* (Geuns, 2010; Ceunen et Geuns, 2013*a*)

Nom	Quantité (g/g de matière sèche)[a]	Pouvoir sucrant[b]	Solubilité (g/L)
Stévioside	10%	250-300	1,25
Rébaudioside A	2-5%	300-450	8,0
Rébaudioside C	1%	50-120	2,1
Dulcoside A	0,5%	50-120	5,8
Rébaudioside D	0,2%	250-400	10,0
Rébaudioside E	0,2%	150-300	17,0
Rébaudioside F	0,2%	N.D.	±1
Stéviolbioside	0,1%	100-125	0,03

[a]pour la composition la plus communément retrouvée au sein de l'espèce
[b]référence (pouvoir sucrant=1) : solution de saccharose à 0,4%
N.D. : non déterminé

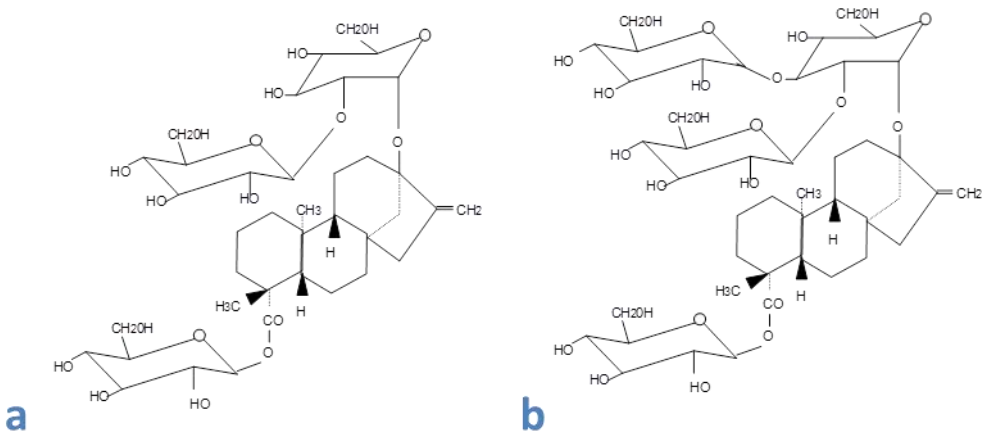


Figure I-40 Structures chimiques du stévioside (a) et du rébaudioside A (b)

Comme précédemment évoqué, le stévioside et le rébaudioside A sont stables pendant des années sous forme anhydre (Geuns, 2010). Le stévioside est stable pendant 1 heure jusqu'à des températures de 120°C et est totalement décomposé à une température de 200°C. En solution aqueuse (0,5 g/L) il est stable sur une gamme de pH de 2 à 10 pendant 2 heures à 60°C et une légère décomposition de l'ordre de 5% est observée si la solution est chauffée à 80°C. Dans des conditions très acides (pH=1) il est fortement dégradé et il est totalement décomposé après 2 heures d'incubation à 80°C (Kroyer, 2010)

Le stévioside purifié (pureté > 97 %) a été décrit comme possédant un arrière-goût amer, de réglisse voire métallique, comparé au sucre de table. Le rébaudioside A purifié (pureté > 97 %) a quant à lui de meilleures propriétés organoleptiques même si lui aussi possède un léger arrière-goût amer (DuBois et Stephenson, 1985; Crammer et Ikan, 1987; Tanaka, 1997; Abou-Arab *et al.*, 2010; Espinoza *et al.*, 2014). L'origine de cet arrière-goût pourrait être attribuable au noyau stéviol (Jakinovich *et al.*, 1990; Pasquel *et al.*, 2000) et/ou à des molécules résiduelles entraînées lors de la purification des glycosides de stéviol. Ces dernières pourraient être des labdanes (McGarvey *et al.*, 2003), des composés aromatiques volatils (en particulier le caryophyllène et le spathulénol), des tannins, ou encore des flavonoïdes (Pasquel *et al.*, 2000; Abou-Arab *et al.*, 2010; Chabot, 2013). Par ailleurs, les lactones sesquiterpéniques, composés volatils caractéristiques de la famille des Asteraceae, sont associés au goût amer (Rodriguez *et al.*, 1976). S'ils n'ont pas à ce jour été décrits chez *Stevia rebaudiana*, ils ont été isolés chez différentes espèce du genre *Stevia* (Soejarto, 2002). La confirmation de leur présence chez la Stévia pourrait donc également contribuer à expliquer l'amertume des extraits. Pour améliorer le goût des extraits de Stévia, différentes méthodes sont employées. Une association synergique des glycosides de stéviol pourraient mener à un produit final à l'arrière-goût moins prononcé. Les édulcorants commerciaux à base d'extraits de Stévia ont des compositions très variées (Espinoza *et al.*, 2014), les fabricants recherchant la recette idéale pour obtenir le meilleur profil organoleptique. L'ajout d'additifs tels que des sucres (le saccharose, le sucre de canne, les sirops de maïs à haute teneur en fructose et glucose) ou des alcools de sucre (érythritol, mannitol, xylitol et sorbitol) à des extraits de Stévia permet aussi d'améliorer le pouvoir sucrant et le goût du produit final (Carakotas *et al.*, 2011; Chabot, 2013). D'autres composés végétaux peuvent être ajoutés pour masquer l'arrière-goût comme la thaumatine, une protéine au goût sucré extraite du fruit de *Thaumatococcus danielli* (Benth) (Chabot, 2013). Les extraits de Stévia en conditions acides (associés aux acide citrique, acétique, malique ou tartrique) ont un goût sucré plus prononcé (Chabot, 2013). Par ailleurs, et de façon sans doute logique, le pouvoir sucrant des glycosides de stéviol augmente, leur amertume diminuant, plus le nombre de sucres liés à l'aglycone stéviol est élevé (Kovylyaeva *et al.*, 2007; Hellfritsch *et al.*, 2012). Ainsi des recherches ont été effectuées afin de conférer de meilleures propriétés organoleptiques au stévioside en lui greffant ou substituant des sucres (comme du glucose ou du fructose) (de Oliveira *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013*a*; Ye *et al.*, 2013; Musa *et al.*, 2014) ou des acides aminés par voie enzymatique (Khattab *et al.*, 2015). Enfin quelques travaux de recherches ont démontré que l'arrière-goût associé aux glycosides de stéviol pouvait être atténué voire supprimé en appliquant à l'extrait de Stévia des étapes de purifications adéquates, comme l'usage des procédés membranaires *(*Zhang *et al.*, *2000;* Kaushik *et al.*, 2010; Rao *et al.*, 2012).

I.2.2 Voie de biosynthèse, localisation et accumulation

Les glycosides de stéviol, s'ils sont majoritairement présents dans les feuilles de la Stévia, ont également été détectés dans une moindre mesure, et par ordre décroissant, dans les fleurs, les graines, les tiges et les racines de la plante. Le fait qu'ils soient présents en grande quantité dans les feuilles suggérerait que cet organe soit le siège principal de la biosynthèse et de l'accumulation primaire de ces molécules (Bondarev *et al.*, 2003). Cette hypothèse est appuyée par différentes observations, ayant permis à Brandle et Telmer (2007) de déduire que la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol est limitée aux tissus chlorophylliens : les transcrits de gènes codant pour deux enzymes de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol, sont uniquement localisés dans le parenchyme foliaire (Richman *et al.*, 1999) et les peptides signaux de ces enzymes ont été localisés dans les chloroplastes d'*Arabidopsis Thaliana*, une plante modèle en biologie végétale. Enfin, la voie de biosynthèse des précurseurs du stéviol (voie du méthylérythritol 4- phosphate (MEP)) est plastidiale (Brandle et Telmer, 2007).

Comme de nombreux diterpènes, les glycosides de stéviol sont synthétisés à partir du MEP. Les étapes menant jusqu'à la formation de l'acide ent-kaurénoïque sont identiques à celles de la synthèse de l'acide gibbérellique (une phytohormone) (Figure I-41 (1 à 13)) et se déroulent dans les chloroplastes. Le kaurène est ensuite oxydé en 3 étapes dans le réticulum endoplasmique, pour donner l'acide kaurénoique (Figure I-41 (14)) qui sera transformé en stéviol (Brandle et Telmer, 2007; Ceunen et Geuns, 2013*a*).

La glycosylation du stéviol, dans le cytoplasme, mène alors à la formation des glycosides de stéviol qui sont transportés jusque dans la vacuole (Figure I-41) (Brandle et Telmer, 2007; Ceunen et Geuns, 2013*a*).

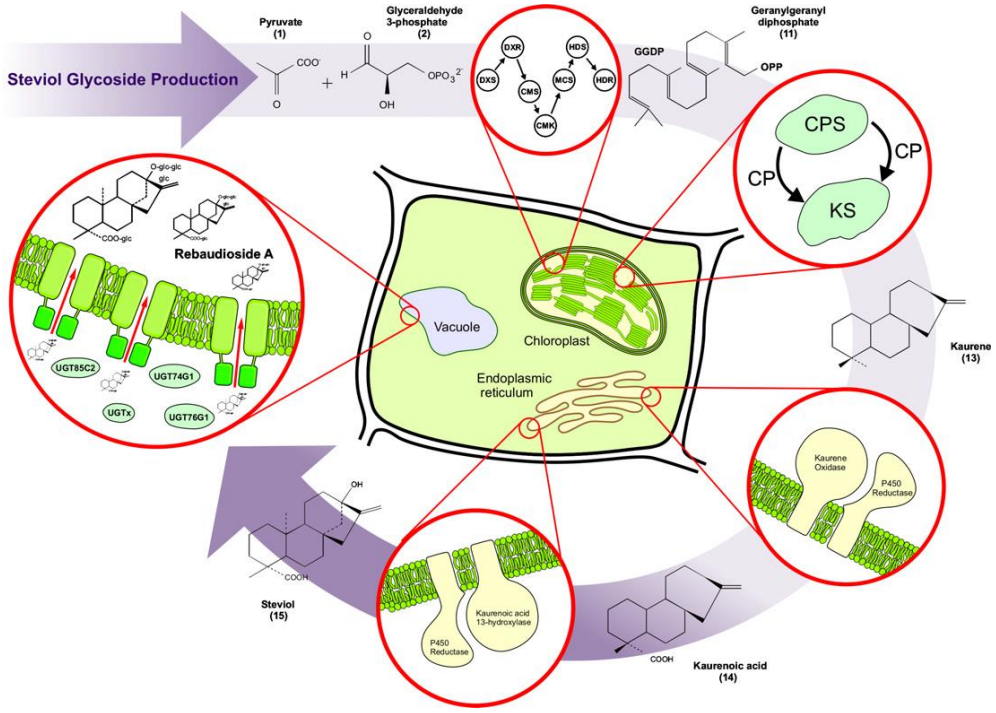


Figure I-41 Représentation schématique de la voie de biosynthèse des glycosides de stéviol montrant la localisation des différents composés (Brandle et Telmer, 2007).

Dans les feuilles, les molécules édulcorantes sont synthétisées pendant la croissance végétative, et leur teneur atteint un maximum entre la fin de la formation du bourgeon floral et le début de la floraison. Leur teneur est habituellement plus élevée dans les jeunes feuilles en pleine croissance près de l'apex que dans les feuilles âgées. Cependant, le phénomène opposé a pu être observé chez les plantes de jours courts. Outre la variabilité génétique intra-spécifique, les conditions de culture de la plante, et son stade ontogénétique, le photopériodisme a ainsi également une grande influence sur la quantité et la composition des glycosides de stéviol accumulés dans les feuilles. Les teneurs en glycosides de stéviol sont communément plus élevées chez les plantes qui ont une floraison sous des jours longs (16 h) que sous des jours courts (8 h). Enfin les récoltes successives ont aussi un impact sur l'accumulation des glycosides de stéviol, puisque leur teneur augmente après une première récolte (Ceunen et Geuns, 2013*a*).

I.2.3 Rôle dans la plante

Les glycosides de stéviol sont accumulés en grande quantité chez la Stévia et le coût métabolique de leur synthèse est considérable (Ceunen et Geuns, 2013*a*). Pourtant le rôle de ces métabolites secondaires n'a toujours pas été élucidé. Plusieurs hypothèses ont été formulées :

- Les glycosides de stéviol pourraient jouer un rôle dans les mécanismes de défense contre les insectes herbivores, conférant à la plante un caractère non appétant. Ce rôle a été confirmé pour certaines espèces comme des coccinelles ou des sauterelles, mais invalidé pour l'araignée rouge (*Tetranychus urticae*). De plus il a été montré que la Stévia possède des propriétés appétantes pour les mammifères herbivores, et qu'une alimentation enrichie en stévioside attire de nombreuses espèces aquatiques. Cette première hypothèse est donc plutôt controversée (Brandle et Telmer, 2007 ; Ceunen et Geuns, 2013*a*).

- Ils pourraient également être une réserve d'énergie à long-terme, une réponse au stress hydrique, jouant le rôle d'osmolytes, ou une réponse au stress oxydatif en étant de puissants piégeurs d'espèces réactives de l'oxygène (Ceunen et Geuns, 2013*a*). En effet il a été démontré que les glycosides de stéviol possèdent une activité antioxydante notoire (Hajihashemi et Geuns, 2013)

- Enfin plus simplement, les glycosides de stéviol pourraient ne pas avoir de rôle spécifique dans l'adaptation de la plante, mais les propriétés édulcorantes qu'ils lui confèrent ayant attiré l'Homme, cela aurait facilité sa propagation et sa survie (Brandle et Telmer, 2007; Ceunen et Geuns, 2013*a*).

I.3 L'extraction solide-liquide appliquée aux végétaux

L'extraction solide-liquide est une opération fondamentale dont le but est d'extraire, de séparer, ou de dissoudre par immersion dans un liquide ou par arrosage par un liquide, un ou plusieurs composants (solide ou liquide) mélangés à un solide. Le liquide d'extraction est appelé solvant, et le (ou les) composant à extraire est dénommé soluté. Une fois l'extraction réalisée il en résulte une solution ou extrait (solvant + soluté) et un solide épuisé contenant peu ou pas de soluté (Frémeaux et Leybros, 1990*a*).

Il existe de nombreuses méthodes d'extraction. Les plus anciennes, les méthodes conventionnelles regroupent : la percolation (le solvant coule sur un lit de solide), la décoction (le solide est mis à bouillir dans le solvant), l'infusion (le solide est mis en suspension dans le solvant chaud jusqu'au refroidissement du mélange), la macération (le solide est mis en contact avec le solvant à température ambiante pendant une durée plus ou moins longue), la digestion (macération à chaud) et l'élution (le soluté fixé à la surface du solide est enlevé par simple contact avec le solvant) (Frémeaux et Leybros, 1990*a*). Les progrès réalisés en termes de méthodes d'extraction ont abouti aux méthodes modernes, qui permettent de réduire la durée d'extraction et parfois la température d'extraction ainsi que la consommation de solvant. Elles sont ainsi plus respectueuses de l'environnement. Ces méthodes sont l'extraction par champs électriques pulsés, l'extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes, par induction thermomagnétique directe, par flash-détente, par fluides supercritiques, par eau subcritique ou encore par enzymes (Wang et Weller, 2006; Chemat, 2011; Azmir *et al.*, 2013).

L'extraction solide-liquide appliquée aux végétaux est une opération ancestrale qui consiste à récupérer des molécules d'intérêt ou à retirer des composés indésirables des plantes, pour des valorisations dans des secteurs tels que l'agroalimentaire (sucre, extrait de café décaféiné,…), la pharmaceutique (alcaloïdes, saponosides, hétérosides,…), la cosmétique (polyphénols, lipides,…) et la parfumerie (principalement des huiles essentielles). L'extraction est souvent réalisée après une ou plusieurs étapes de préparation de la matière végétale (telles que le séchage ou le broyage), qui permettront de stabiliser la matière et de faciliter l'accessibilité du soluté au solvant, par exemple en augmentant la surface d'échange (étape de broyage). Elle intervient avant les étapes de séparation solide-liquide et de purification des extraits et/ou du solide épuisé.

Dans les parties suivantes, le phénomène de transfert, ou d'échange de matière, qui opère lors de l'extraction entre la phase solide et la phase liquide sera abordé. Puis les méthodes d'extraction des glycosides de stéviol développées ces dernières années seront ensuite présentées. Enfin, nous conclurons ce chapitre par une description des principaux équipements industriels d'extraction solide-liquide qui pourraient s'appliquer à l'extraction des édulcorants à partir des feuilles de Stévia.

I.3.1 Le transfert de matière

L'équilibre du transfert du soluté dans le solvant est atteint après une durée d'extraction définie. La détermination de la vitesse à laquelle se déroule ce phénomène, la vitesse d'extraction, est un paramètre essentiel pour définir un appareil d'extraction. Cette vitesse est régie par trois processus élémentaires de l'échange de matière : la diffusion du solvant dans le solide (1) (Figure I-42 (1)), la « libération » du soluté dans le solvant (2) (Figure I-42 (2)) et la diffusion du soluté au travers de la porosité du solide jusqu'au film liquide entourant le solide, puis vers l'environnement global (3) (Figure I-42 (3)).

L'étape (1) n'est pas limitante et peut être assimilée à une simple opération de mélange dont la vitesse n'impacte pas ou peu la vitesse globale d'extraction.

L'étape (2) peut être limitante, puisqu'elle est fortement dépendante de la nature du soluté et de sa liaison avec le solide. Elle peut être contrainte par de nombreux phénomènes physiques et/ou physico-chimiques comme : la dissolution, la désorption, la diffusion au travers d'une barrière physique, ou encore la rupture de liaisons chimiques. Ces phénomènes peuvent être associés à des temps de réaction longs, des mises à l'équilibre lentes ou encore des saturations locales du solvant.

L'étape (3) est souvent l'étape limitante et peut être décrite à travers la théorie des films. C'est la résistance appliquée par le film mince entourant la particule qui détermine la vitesse de diffusion, généralement lente. L'épaisseur du film peut être réduite par le mouvement du solide et donc l'agitation du milieu d'extraction peut permettre d'augmenter la vitesse de cette étape. L'ordre de grandeur de cette étape est habituellement de plusieurs heures (Chemat, 2011).

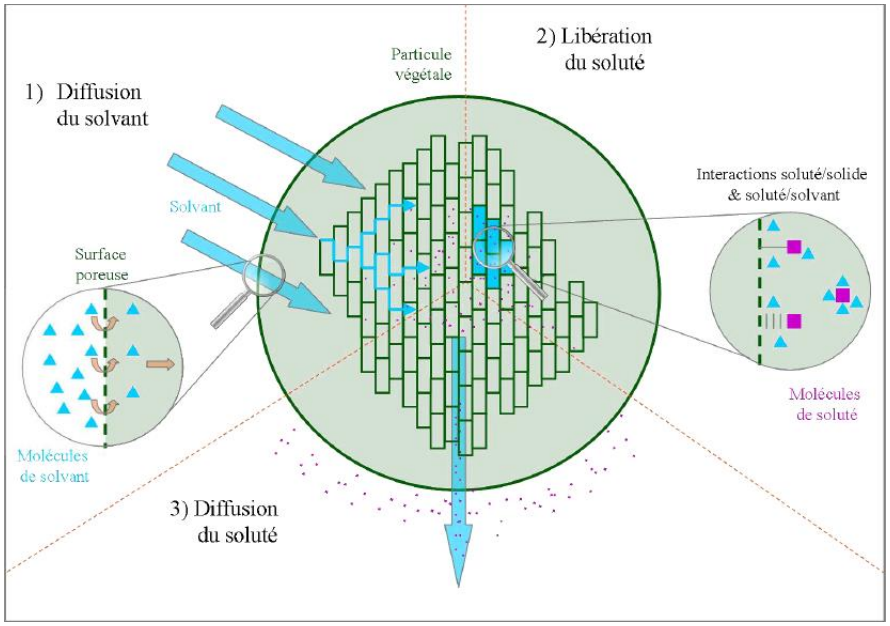


Figure I-42 Schéma des trois étapes élémentaires de l'extraction solide-liquide par un solvant dans un solide végétal (d'après :Celhay (2013))

I.3.2 Facteurs influençant le transfert

Le transfert de matière dépend de nombreux facteurs qui vont maintenant être développés. La connaissance de leurs impacts sur l'extraction sera déterminante pour comprendre et optimiser cette dernière.

I.3.2.1 Nature et état du solide et du soluté

La matière végétale est une matrice complexe formée de cellules avec des parois, des membranes, des espaces intercellulaires, des capillaires et des pores : autant d'attributs qui peuvent présenter un frein au transfert. Elle est caractérisable par la taille et la forme de ses particules, sa porosité, sa tortuosité et sa surface spécifique d'échange.

Plus la matière est divisée finement, plus la surface d'échange est grande et plus le parcours moyen du soluté est petit. Ainsi, plus la phase solide est morcelée en de petites particules, plus le transfert est efficace et rapide. Une taille de particules trop faible pourra cependant présenter une contrainte à la clarification de la solution après extraction (filtration ou décantation difficile par exemple).

Les facteurs influençant la diffusion du soluté au sein de la matière végétale sont sa structure moléculaire, sa taille, sa localisation, sa répartition et ses liaisons avec la matrice solide végétale ou d'autres composés. Le soluté peut être sous forme libre dans les cellules (cas des métabolites vacuolaires par exemple), ou participer à sa structure et se lier à d'autres composés (cas de la cellulose par exemple). Un prétraitement de la phase solide pourra être réalisé pour faciliter le transfert. Des méthodes de séchage, de broyage ou encore d'activation par ultrasons ou microondes peuvent ainsi fragiliser les barrières matricielles et donc faciliter la libération du soluté (Frémeaux et Leybros, 1990*a*; Poirot, 2007).

I.3.2.2 Nature du solvant

Le choix du solvant est très important. Il doit être sélectif vis-à-vis du soluté (pour limiter la co-extraction de composés indésirables), posséder une capacité élevée de dissolution du soluté (pour accélérer le transfert et permettre de réduire les volumes de solvant utilisées), une température d'ébullition peu élevée (pour faciliter son évaporation lors des étapes de séparation solide-liquide), et une faible viscosité (pour de meilleures pénétration dans le solide, diffusion du soluté au sein du solvant et agitation) et pour des questions de réglementation et de sécurité, il est souhaitable qu'il soit non toxique, stable et non explosif.

Les solvants actuellement les plus utilisés sont l'eau, les alcools (méthanol, éthanol), les hydrocarbures (hexane), les solvants halogénés et le CO_2 supercritique (Frémeaux et Leybros, 1990*a*).

I.3.2.3 Ratio liquide-solide

Le *ratio* liquide-solide est défini par le rapport de la masse ou le volume de solvant sur la masse de solide. La vitesse d'extraction est inversement proportionnelle au taux de saturation du solvant. Ainsi un *ratio* liquide-solide élevé est favorable au transfert. Il impliquera alors cependant une co-extraction plus importante de composés indésirables et s'il n'est pas régénéré, contribuera à augmenter l'impact économique et environnemental (Frémeaux et Leybros, 1990*a*).

I.3.2.4 Température

L'élévation de la température d'extraction permet d'augmenter la solubilité et la diffusivité du soluté, et de diminuer de la viscosité du solvant. Elle va cependant de pair avec la co-extraction de composés indésirables (par augmentation de la solubilité de ces composés, et de la perméabilité des parois/membranes cellulaires), peut induire la dégradation du soluté, et représenter un risque sécuritaire pour l'installation (incendie, explosion). Il s'agit donc d'établir un bon compromis entre l'amélioration du transfert et les nuisances engendrées (Frémeaux et Leybros, 1990*a*).

I.3.2.5 Agitation

L'agitation mécanique du solide dans le solvant permet son maintien en suspension et l'homogénéisation du milieu. Généralement, cette action a toujours un effet favorable sur l'opération (Frémeaux et Leybros, 1990*a*).

I.3.2.6 Humidité

Les matières végétales sont souvent séchées après récolte pour faciliter leur conditionnement et leur stockage. Un surplus d'humidité peut en effet contribuer à leur dégradation et à celle du soluté (et de ce fait les rendre inexploitables). De plus, la diffusivité étant inversement proportionnelle à la teneur en eau du solide, l'utilisation de solvants hydrophobes sur une matière humide limiterait l'efficacité de l'extraction (Frémeaux et Leybros, 1990*a*; Poirot, 2007).

I.3.3 Détermination du coefficient de diffusion

La diffusion moléculaire est un phénomène naturel qui implique l'homogénéisation de la concentration de molécules dans un système. Le mouvement de ces molécules s'effectue, par marche au hasard (pas de trajectoire prédéfinie pouvant être anticipée), de la zone la plus concentrée vers la zone la moins concentrée du fait de l'agitation thermique. Pour décrire le phénomène de diffusion d'un soluté dans un corps poreux rigide, en considérant que la structure soit quasi homogène et macroscopiquement isotrope, Fick a énoncé sa seconde loi :

$$\frac{\partial X}{\partial t} = -D_x \nabla^2 X$$

où :

- X est la concentration du soluté dans le solide
- t est la durée
- D_x est le coefficient de diffusion moléculaire du soluté

Le coefficient de diffusion moléculaire évalue la facilité d'une molécule à se mouvoir au hasard au sein du système. Ainsi, plus sa valeur est grande plus les molécules diffusent rapidement. Dans le cas de la matière végétale, c'est en fait un coefficient de diffusion apparent (D_{eff}) qui est utilisé. Il tient compte de la porosité et de la tortuosité de la matrice solide. Il est généralement déterminé à partir de la cinétique expérimentale.

En considérant un coefficient de diffusion constant et une diffusion monodirectionnelle la seconde loi de Fick donne l'équation suivante :

$$\frac{\partial C(t,x)}{\partial t} = D_{eff} \frac{1}{x^{\varphi-1}} \frac{\partial}{\partial x}\left(x^{\varphi-1} \frac{\partial C(t,x)}{\partial x}\right) \qquad \text{Equation (1)}$$

où :

- t est la durée
- x est la distance radiale dans la direction du transfert de matière
- C est la concentration du soluté dans le solide
- D_{eff} est le coefficient de diffusion moléculaire apparent du soluté
- φ est le facteur de forme (φ = 1, 2 ou 3 respectivement pour une forme plane, un cylindre infini ou une sphère)

Si la seule diffusion moléculaire ne permet pas de bien modéliser la cinétique expérimentale, d'autres facteurs sont à intégrer comme le gonflement de la matière, le changement de la structure de la matière ou encore le couplage avec la réaction chimique ou biochimique (Simeonov *et al.*, 1999; Wongkittipong *et al.*, 2004).

I.3.3.1 Résolution de l'équation de diffusion

Une résolution analytique ou numérique est possible. Dans cette étude, seule la résolution numérique a été utilisée, et sera donc détaillée par la suite.

Cette méthode a donné de très bons résultats pour déterminer le coefficient de diffusion de l'andrographolide (composé bioactif), extrait des feuilles et des racines de l'*Andrographis paniculata* (plante asiatique) (Wongkittipong *et al.,* 2004) et de la catharanthine et de la vindoline (alcaloïdes), extraits des feuilles de *Catharantus roseus* (la pervenche de Madagascar) (Poirot, 2007).

I.3.4 Extraction solide-liquide des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni

L'extraction des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* est étudiée depuis de nombreuses années (Tableau I-10). Aux côtés des méthodes conventionnelles, de plus en plus de méthodes alternatives sont utilisées comme l'extraction assistée par ultrasons, par micro-ondes ou encore par eau pressurisée, l'objectif étant toujours d'optimiser les rendements et les durées d'extraction tout en limitant l'apport excessif de solvant et d'énergie.

I.3.4.1 Les méthodes conventionnelles

L'infusion réalisée dans un réacteur batch agité (voir partie I.4.1) est la méthode la plus utilisée dans l'extraction des glycosides de stéviol des feuilles de Stévia, et plus généralement dans le domaine de l'extraction végétale car c'est une méthode très flexible et simple d'utilisation (Kassing *et al.*, 2010). Les premiers brevets qui font référence à cette technique sont ceux de Morita *et al.* (1978) et Giovanetto (1990). Ils sont cités par de nombreux brevets qui s'appuient sur ces travaux. L'extraction est réalisée à l'eau (65 à 100°C) et avec des feuilles séchées.

Un autre brevet fondateur (Persinos, 1973) utilise une méthode différente : la percolation. *Via* un extracteur Soxhlet (voir partie I.4.1), une première extraction est réalisée au chloroforme pour délipider les feuilles séchées et broyées de Stévia, puis les glycosides de stéviol sont extraits au cours d'une seconde extraction au dioxane ou à l'eau additionnée de carbonate de calcium.

Le Tableau I-10 regroupe les conditions opératoires, à l'échelle laboratoire, des méthodes conventionnelles d'extraction solide-liquide des glycosides de stéviol. Les températures d'extraction varient entre 25°C à 100°C, pour des durées de 50 minutes à 12 heures, avec des *ratios* solvant/feuilles de 10 à 300. Le solvant le plus utilisé est l'eau. Les feuilles sont sèches et broyées la plupart du temps.

Une seule publication (Das *et al.*, 2014) fait mention d'un rendement d'extraction, défini comme le rapport de la masse totale du composé d'intérêt présent dans l'extrait sur sa masse totale présente dans les feuilles avant extraction. Dans les conditions optimales définies par les auteurs, ce rendement d'extraction est de 73 % pour le rébaudioside A. Le rendement d'extraction du stévioside n'est pas précisé.

L'optimisation de l'extraction à l'eau du stévioside, en système batch à l'échelle laboratoire, a été étudiée par la méthodologie du plan d'expérience composite centré rotatif de second ordre à trois variables par Rai *et al.* (2012). Les facteurs étudiés étaient la température d'extraction, variant de 30 à 90°C, la durée d'extraction (9 à 120 min) et le *ratio* eau/feuilles (5 à 20 mL/g). Cette étude a mené à différentes conclusions : les trois facteurs ont un effet positif sur l'extraction du stévioside, il n'existe pas d'interaction entre les paramètres température et *ratio* feuilles/eau, l'interaction durée-température a un effet négatif sur l'extraction de la molécule cible (dégradation des molécules suite à une exposition trop longue à des températures trop élevées) tandis que l'interaction durée-*ratio* est positive (durée de diffusion plus long et dilution améliorant la diffusion). Les conditions d'extraction optimales ont été obtenues pour une température de 78°C, un *ratio* eau/feuilles de 14 (mL/g) et une durée d'extraction de 56 minutes. Des travaux similaires ont été réalisés pour le rébaudioside A (Das *et al.*, 2014). Les conditions d'extraction optimales obtenues sont une température de 71°C, un *ratio* eau/feuilles de 42 mL/g et une durée 51 minutes. La comparaison des résultats obtenus par les deux équipes mène à la conclusion que le *ratio* feuilles/eau doit être trois fois plus élevé pour l'extraction du rébaudioside A, qui semblerait ainsi plus difficile à extraire que le stévioside.

Les travaux de Periche *et al.* (2015*a*) ont quant à eux mis en évidence qu'un *ratio* solide/liquide très élevé (100 mg de feuilles sèches par litre d'eau) permettait encore d'améliorer l'accessibilité des molécules.

Tableau I-10 Conditions opératoires des méthodes conventionnelles d'extraction des feuilles de Stévia relevées dans la littérature

Référence	Température D'extraction	Durée d'extraction	*Ratio* solvant/feuilles (mL/g)	Taille des particules	Solvant	Rendement d'extraction
Periche *et al.* (2015*a*)	50°C	5min	100	N.D.	eau	N.D.
Lorenzo *et al.* (2014)	100°C	30min	40	Non broyé	eau	N.D.
Das *et al.* (2014)	71°C	51 min	42	N.D.	eau	73%[a]
Rai *et al.* (2012)	78°C	56 min	14	N.D.	eau	N.D.
Liu *et al.* (2010)	100°C	2h	10	1 mm	eau	N.D.
Teo *et al.* (2009)	100°C	60 min	300	0,5 mm	eau	N.D.
Jaitak *et al.* (2009)	TA°C	12h	100	250 µm	méthanol:eau (80:20)	N.D.
Erkucuk *et al.* (2009)	100°C	N.D. (2 cycles soxhlet)	10	500 µm	Eau	N.D.
	78°C				éthanol	N.D.
Pasquel *et al.* (2000)	100 à 25°C (infusion)	1h	20	N.D.	eau	N.D.
Liu *et al.* (1997)	64°C	7h	N.D.	N.D.	méthanol	N.D.

[a]Pour le rébaudioside A
N.D. : non déterminé

I.3.4.2 Les méthodes alternatives

Afin d'améliorer les rendements d'extraction et la sélectivité des méthodes, mais également de réduire les dépenses énergétiques et les consommations de solvant, de nouvelles méthodes d'extraction ont été étudiées sur les feuilles de Stévia. Il s'agit de l'extraction assistée par ultrasons ou par micro-ondes, l'extraction par eau subcritique, l'extraction par CO_2 supercritique, ou encore l'extraction enzymatique.

I.3.4.2.1 L'extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes sonores non audibles par l'oreille humaine, de par leur fréquence élevée comprise entre 20 kHz et 100 MHz. Comme les autres ondes, elles traversent un milieu créant de la compression et de l'expansion. Elles induisent ainsi un phénomène appelé cavitation, qui génère la production et la croissance de bulles de gaz. Certaines de ces bulles, dans un état transitoire, sont soumises à des conditions internes de température et de pression extrêmes. Elles finissent par imploser, libérant une importante quantité d'énergie. Il en résulte des macro-turbulences, des collisions inter-particulaires à très haute vitesse, ainsi que des perturbations dans les micropores des particules de biomasse, accélérant la diffusion turbulente et la diffusion interne. Les parois cellulaires

peuvent aussi se dégrader, facilitant le relargage des composés internes dans le solvant. Les ultrasons permettent d'améliorer le rendement des composés extraits, de réduire les durées d'extraction et les consommations d'énergie (Vilkhu *et al.*, 2008; Chemat, 2011; Azmir *et al.*, 2013).

L'effet des ultrasons et de la température sur l'extraction à l'eau des glycosides de stéviol des feuilles de Stévia a été étudié par Periche *et al.* (2015*a*). Les meilleurs rendements ont été obtenus pour une température de 50°C après une minute d'extraction aux ultrasons ; après 5 minutes d'une extraction conventionnelle, à la même température, le rendement optimal n'était pas atteint. Les ultrasons ont généralement permis de réduire la durée et la température d'extraction pour un meilleur rendement en stévioside et en rébaudioside A (Liu et al. 2010), un rendement équivalent (Alupului *et al.*, 2009), ou un rendement plus faible en stévioside et plus élevé en rébaudioside A par rapport à celui obtenu en extraction conventionnelle (Jaitak *et al.*, 2009). L'utilisation des ultrasons, telle que décrite dans deux brevets, permettrait enfin l'obtention de rendements en glycosides supérieurs à 90 % (Sun *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011).

I.3.4.2.2 L'extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques se situant dans la gamme de fréquence de 300 MHz à 300 GHz. Elles sont le produit d'un champ électrique et d'un champ magnétique oscillants, perpendiculaires entre eux. L'action des micro-ondes est expliquée par deux mécanismes : elles induisent une conduction ionique ainsi qu'une polarisation par orientation dipolaire qui provoquent un échauffement au sein de la matière végétale. La conduction ionique représente le déplacement des ions à cause du champ électrique créé ; ces composés s'entrechoquent avec les molécules fixes de la matrice végétale, résultant en un dégagement de chaleur. La polarisation par orientation dipolaire représente la capacité des molécules polaires à s'orienter en fonction du sens du champ électrique. Ce dernier étant oscillant, ces composés sont aussi mis en mouvement, et les collisions résultantes induisent également un échauffement. Il est important de souligner que les molécules d'eau présentes dans les cellules végétales sont aussi chauffées, ce qui implique le gonflement de la cellule, et dans certains cas la rupture de sa paroi. Ainsi le relargage des composés intracellulaires peut être facilité. Les extractions assistées par micro-ondes mènent ainsi à un rendement d'extraction plus élevé, et permettent une réduction du temps d'extraction, de la consommation d'énergie et de solvant (Chemat, 2011; Tatke et Jaiswal, 2011; Azmir *et al.,* 2013).

L'extraction du stévioside et du rébaudioside A assistée par micro-ondes a été étudiée par différents auteurs (Alupului *et al.*, 2009; Jaitak *et al.*, 2009; Periche *et al.*, 2015*a*). Elle a permis d'augmenter le rendement en molécules d'intérêt, tout en diminuant la durée d'extraction par rapport à une extraction conventionnelle ou aux ultrasons.

I.3.4.2.3 L'extraction par fluide supercritique

L'état supercritique correspond à l'état d'un composé qui est chauffé au-delà de sa température critique (Tc) et comprimé au-dessus de sa pression critique (Pc) (Figure I-43). Cet état est équivalent à un état dans lequel gaz et liquide sont indiscernables l'un de l'autre ou d'un fluide compressible. Cela se traduit par le fait que la densité d'un fluide supercritique est similaire à celle d'un fluide, sa viscosité est similaire à celle d'un gaz et sa diffusivité est entre les deux états. Ainsi, la viscosité d'un fluide supercritique est faible, mais sa diffusivité reste assez haute, ce qui lui confère de meilleures propriétés de transport qu'un liquide. Il peut diffuser facilement à travers les matériaux solides et ainsi réduire la durée d'extraction. L'une des caractéristiques principales d'un fluide supercritique est sa capacité à modifier sa densité en changeant sa pression et/ou sa température (la densité est directement reliée à la solubilité). Au vu de ses conditions modérées de température critique (31,3°C) et de pression critique (72,9 atm), le CO_2 est le fluide le plus utilisé pour les extractions par fluide supercritique. Il est cependant faiblement polaire, et doit de ce fait souvent être associé à un co-solvant (eau, méthanol, éthanol,…) pour l'extraction de composés polaires. L'extraction par fluide supercritique peut ainsi présenter de nombreux avantages : meilleures sélectivités, durée d'extraction plus courtes, et substitution aux solvants organiques toxiques (Herrero *et al.*, 2006; Chemat, 2011).

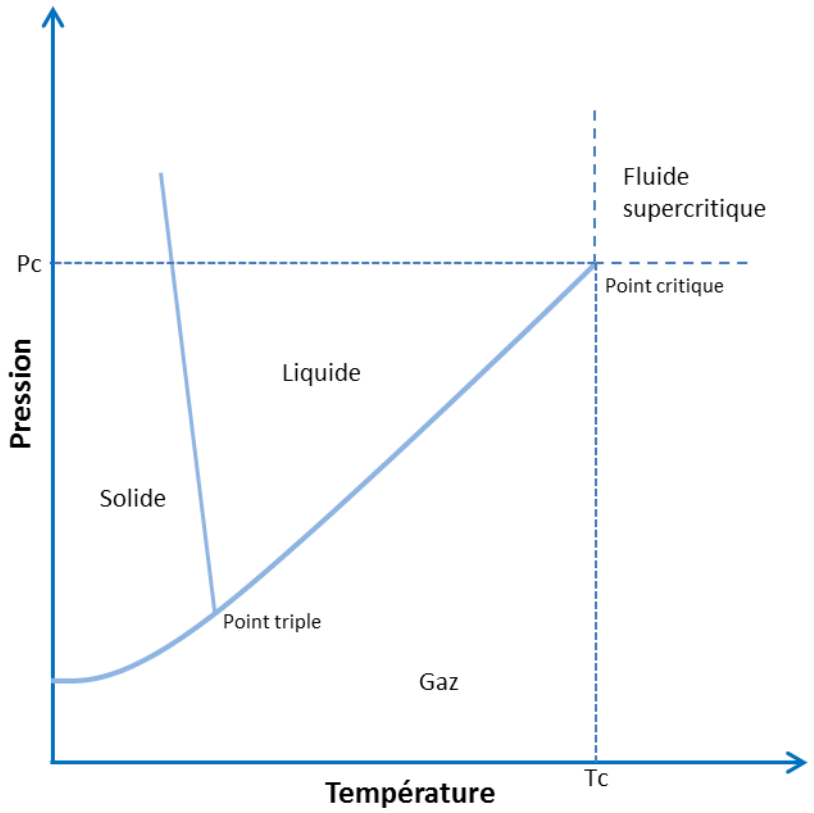


Figure I-43 Diagramme de phase typique d'un corps pur

Cette méthode d'extraction a été appliquée comme préalable à l'extraction conventionnelle à l'eau des glycosides de stéviol. Le CO_2 supercritique permet en effet l'extraction des composés apolaires des feuilles de Stévia, facilitant par la suite l'extraction des glycosides de stéviol polaires. Les extraits obtenus sont enrichis en rébaudioside A (*ratio* stévioside/rébaudioside A de 11/1 pour une extraction conventionnelle contre *ratio* de 3/1 pour une extraction au fluide supercritique (Pasquel *et al.*, 2000)) ce qui leur confère de meilleures qualités organoleptiques (Kienle, 1992; Pasquel *et al.,* 2000; Yoda *et al.,* 2003). L'extraction des glycosides de stéviol au CO_2 supercritique nécessite l'ajout d'un ou de plusieurs co-solvants comme l'eau, l'éthanol ou le méthanol, jusqu'à des proportions de 20% molaire. De meilleurs résultats, en comparaison avec des extractions conventionnelles, ont pu être observés, en particulier quand l'eau était le co-solvant (Pasquel *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2002; Yoda *et al.,* 2003; Erkucuk *et al.,* 2009)

I.3.4.2.4 L'extraction par eau subcritique

L'extraction au solvant subcritique pressurisé a été décrite pour la première fois par Richter *et al.*, en 1996. Elle est maintenant connue sous différentes appellations : extraction par fluide pressurisé, extraction accélérée au solvant, ou encore extraction au solvant sous haute pression (Nieto *et al.*, 2010). Appliquée à l'eau, cela fait d'elle la méthode d'extraction la plus favorable à l'environnement. L'état subcritique de l'eau, en phase liquide à des températures comprises entre 100°C (point d'ébullition) et 374°C (point critique) (Figure I-43) abaisse la polarité du solvant, favorisant ainsi, dans une certaine mesure, l'extraction de composés non-polaires ou organiques. L'explication du mécanisme en est la suivante : la constante diélectrique (ε) de l'eau diminue quand la température augmente, de 80 à 25°C sous 1 bar de pression, elle passe à 27 à 250°C sous 50 bar de pression. Dans ces dernières conditions, la permittivité, la viscosité et la tension de surface de l'eau diminuent mais ses caractéristiques de diffusivité augmentent. De la sorte, l'eau se comporte comme un solvant organique de type méthanol (ε=33) ou de type éthanol (ε=24) à 25°C (Herrero *et al.*, 2006; Teo *et al.*, 2010).

Pól *et al.* (2007) ont étudié l'extraction des glycosides de stéviol par eau subcritique, seule ou en mélange avec le méthanol. Dans les deux cas, les conditions optimales d'extraction ont été atteintes à 110°C et 50 bar après 10 minutes. Au-delà de 110°C, le stévioside était soit dégradé, soit moins bien extrait. *Teo et al.* (2009) ont par ailleurs mis en évidence une moins bonne efficacité de l'extraction par eau subcritique comparée à l'extraction assistée par ultrasons. Enfin, les travaux de Yildiz-Ozturk *et al.* (2014) ont permis de mettre en évidence que les glycosides de stéviol étaient extraits de façon optimale à l'eau subcritique à une température de 125°C durant 45 minutes, ajoutant que la température était le paramètre principal influençant l'efficacité de l'extraction.

I.3.4.2.5 L'extraction assistée par enzymes

Les enzymes sont des catalyseurs idéaux pour aider à l'extraction, la modification ou la synthèse de substances bio fonctionnelles complexes d'origine naturelle. L'extraction assistée par enzymes repose principalement sur la capacité des enzymes à dégrader les parois cellulaires, rendant ainsi les composés intracellulaires et pariétaux plus accessibles. Elle peut par conséquence minimiser l'usage de solvant ou tout simplement améliorer les rendements d'extraction. Les enzymes les plus utilisées sont les cellulases, les pectinases et les hémicellulases, cibles des principaux composants pariétaux. Elles peuvent être utilisées séparément ou en mélanges (Puri *et al.*, 2011; Özkan et Ersus Bilek, 2015).

Puri *et al.* (2012) ont démontré la faisabilité et l'efficacité de cette méthode pour l'extraction des glycosides de stéviol. Les rendements d'extraction obtenus après prétraitement de la matière végétale par un mélange de pectinase, cellulase et hémicellulase à 2 % (m/m) chacune, sont en effet supérieurs à ceux obtenus avec des méthodes conventionnelles d'extraction. Les rendements obtenus dans ces conditions sont par ailleurs trois fois supérieurs à ceux obtenus avec une seule enzyme, l'hémicellulase.

I.4 Les équipements d'extraction solide-liquide appliquée à la matière végétale

Il existe une multitude de contacteurs se différenciant par leur mode de mise en contact et leur type de fonctionnement. Dans cette dernière partie, qui ne se veut pas exhaustive, seront présentés les équipements discontinus et continus les plus connus et utilisés dans l'industrie.

I.4.1 Extracteurs discontinus

Au sein de ces dispositifs, le solide peut être immobile et arrosé par le solvant ou dispersé par agitation mécanique ou pneumatique. Ils sont utilisés le plus souvent lorsque l'extraction des solutés est simple et les quantités à traiter assez faibles. Ces contacteurs nécessitent des temps d'arrêt pour soutirer l'extrait, décharger le solide épuisé puis, recharger en solide et solvant frais, c'est pourquoi ils sont appelés discontinus.

Les extracteurs à simple agitation sont des mélangeurs dans lesquels le solide et le solvant sont mis en contact par agitation mécanique ou pneumatique. Ils sont généralement équipés d'un système de contrôle de la température, et d'un filtre dans leur partie basse qui permettra de réaliser la séparation solide-liquide. En l'absence de ce dernier, l'ajout de séparateurs solide-liquide, comme des décanteurs ou des filtres, est nécessaire. L'extracteur à agitation mécanique (Figure I-44), plus communément appelé réacteur batch ou cuve agitée, est un procédé ancestral. Sa flexibilité et sa simplicité d'utilisation en font une technologie toujours très répandue (Kassing *et al.*, 2010).

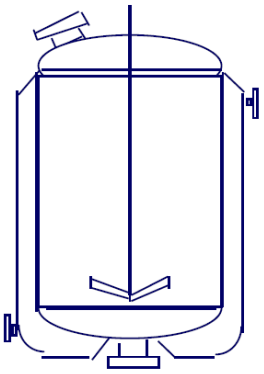
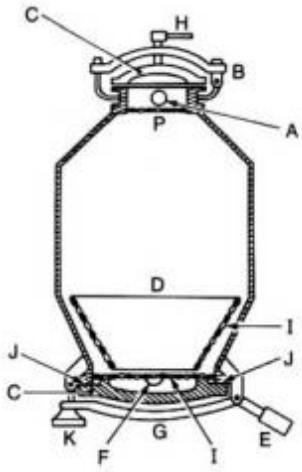


Figure I-44 Réacteur batch (d'après Poirot (2007))

D'autres dispositifs ne disposent pas de système d'agitation. C'est le cas du diffuseur Robert (Figure I-45). Ce dernier est utilisé pour l'extraction à chaud du sucre de betterave, des tannins et de certains produits pharmaceutiques (Frémeaux et Leybros, 1990*b*).

Dans ces deux systèmes, l'extraction solide-liquide atteint souvent un état d'équilibre qui ne correspond pas à l'épuisement total de la matière végétale. C'est pourquoi dans l'industrie ces réacteurs sont fréquemment installés en batterie (exemple du dispositif Shanks constitué de diffuseurs Robert en série (Figure I-46)). Il est donc alors possible de fonctionner de façon semi-continue en chargeant et déchargeant les extracteurs périodiquement (Frémeaux et Leybros, 1990*b*; Kassing *et al.*, 2010).



A trou d'alimentation en solvant
B dispositif d'introduction du solide
C couvercles
D panier contenant le solide à traiter (cossettes, en général)
E contrepoids
F trou de sortie de la solution
G dispositif de vidange du résidu
H levier de serrage
I passoires ou tamis
J joints
K vis de serrage

Figure I-45 Diffuseur Robert (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

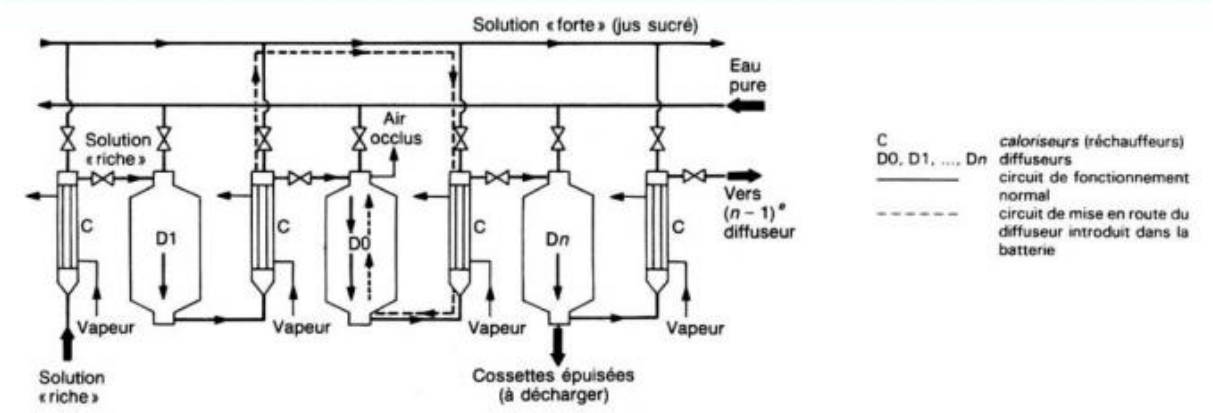


Figure I-46 Batterie de diffuseurs Robert selon le dispositif Shanks (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

Un autre équipement bien connu, et le plus utilisé en laboratoire, est l'extracteur Soxhlet (Figure I-47) dans lequel le solvant est vaporisé puis condensé, et percole sur le lit de solide. La solution résultante est siphonnée périodiquement et s'enrichit ainsi au cours du temps. Le solide est toujours extrait par du solvant frais, ce qui permet son épuisement au bout de quelques cycles. Ce dispositif est bien sûr transposable à l'échelle industrielle (Figure I-48) (Frémeaux et Leybros, 1990*b*; Wang et Weller, 2006).

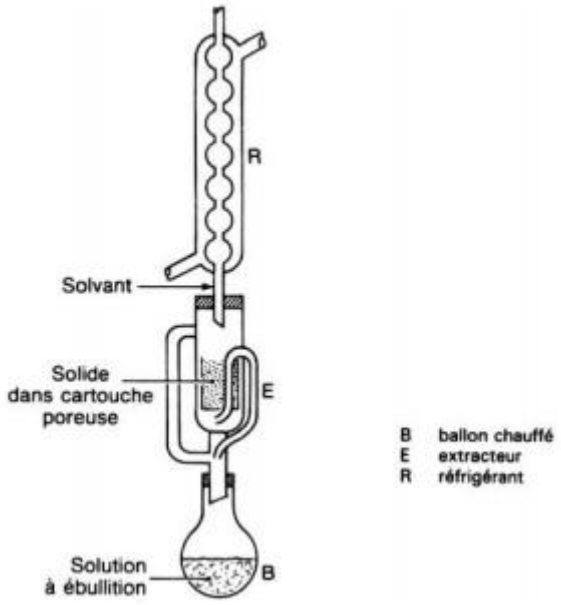


Figure I-47 Extracteur Soxhlet (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

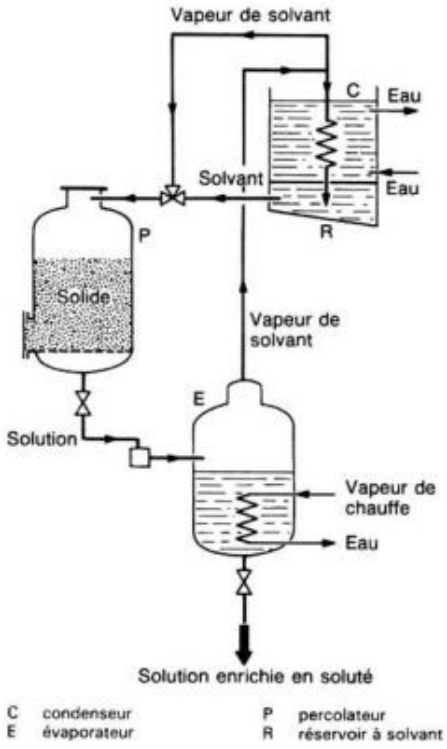


Figure I-48 Percolateur simple (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

I.4.2 Extracteurs continus

Ce sont les contacteurs les plus utilisés dans l'industrie, notamment pour traiter d'importantes quantités de matière végétale. Ils permettent de mieux contrôler la production et d'éviter de grosses pertes si un incident survient. Ils ont également l'avantage d'être compacts et de petites dimensions. Le système de contre-courant est souvent utilisé, car il permet d'augmenter les rendements d'extraction (faible quantité résiduelle de solutés dans le solide extrait) et de réduire la durée d'extraction. Si la littérature évoque une multitude d'équipements continus d'extraction solide-liquide appliquées à la matière végétale, nombre d'entre eux ne sont pas encore reconnus et donc peu utilisés, ou au contraire déjà obsolètes. D'autres n'ont été utilisés que de façon sporadique. Nous les avons classés par mode de convoyage du solide et distinguerons donc les extracteurs à lits mobiles (compartiments ou paniers), à chaînes de convoyage, ou à vis de convoyage.

I.4.2.1 Les extracteurs à lits mobiles

Les extracteurs à compartiment mobile sont principalement constitués de différentes cellules tournant autour d'un axe. Elles sont soit à fond perforé, soit munies d'un tamis à leur base. Le solide frais est chargé par un distributeur à un endroit fixe. Du solvant frais percole sur chaque cellule, et les extraits sont récupérés et recyclés pour percoler sur les cellules suivantes. L'extrait final et le solide épuisé sont recueillis à endroit fixe. Les modèles les plus connus sont l'extracteur Rotocel™ de Dravo (Figure I-49), l'extracteur Carousel™ de Harburg-Freudenberger et l'extracteur Reflex™ de De Smet.

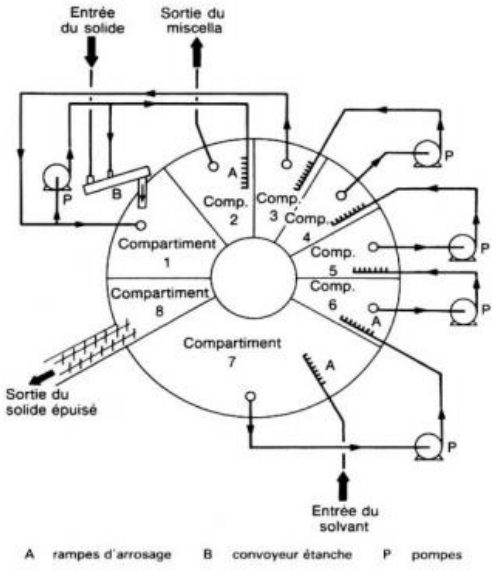


Figure I-49 Extracteur Rotocel™ de Dravo (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

D'autres installations sont plutôt équipées de paniers à fonds perforés contenant le solide. Ils fonctionnent sur le même principe : du solvant frais percole sur une section définie du dispositif sur les paniers en mouvement. Les paniers étant les uns au-dessus des autres, les extraits des paniers supérieurs percolent sur les paniers inférieurs. Ces extracteurs sont par exemple l'extracteur Sliding Cell™ de Lurgi (Figure I-50) ou l'extracteur de Bernardini™ (Figure I-51).

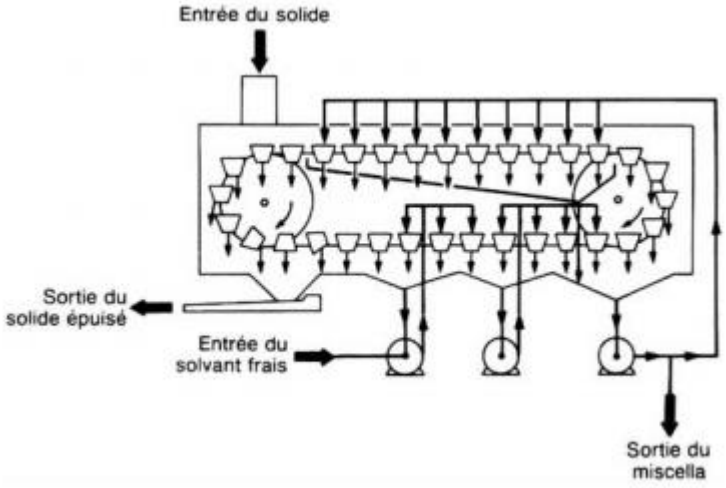


Figure I-50 Extracteur Sliding Cell™ de Lurgi (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

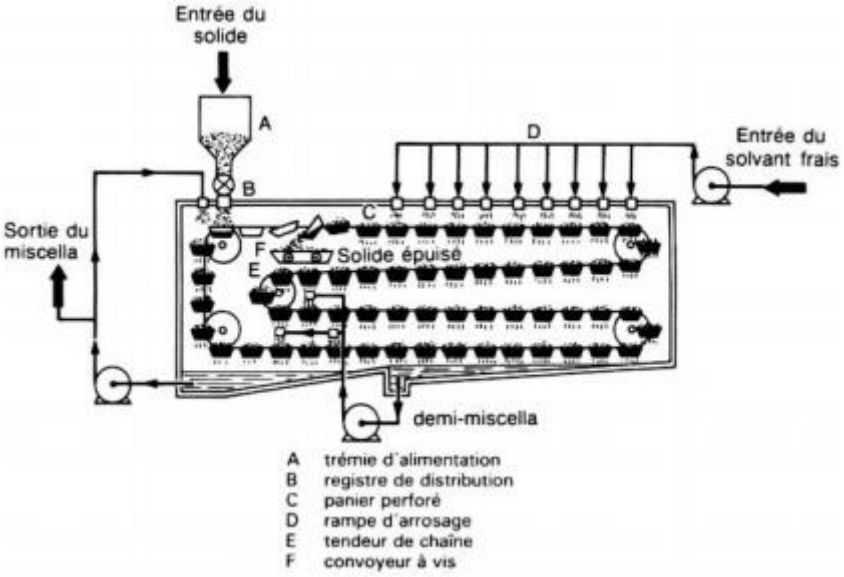


Figure I-51 Extracteur de Bernardini (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

I.4.2.2 Les extracteurs à chaîne de convoyage

Ce sont des extracteurs dans lesquels le solide, sur lequel percole le solvant, est transporté au moyen d'une bande. Les extraits peu chargés sont récupérés pour être recyclés sur le lit de solide. Les équipements les plus connus sont l'extracteur de type percolation de Crown (Figure I-52) ou l'extracteur LM™ De Smet (Figure I-53). Ces équipements ont été utilisés pour l'extraction du sucre de canne ou de betterave, et de l'huile de graines oléagineuses (Frémeaux et Leybros, 1990*b*)

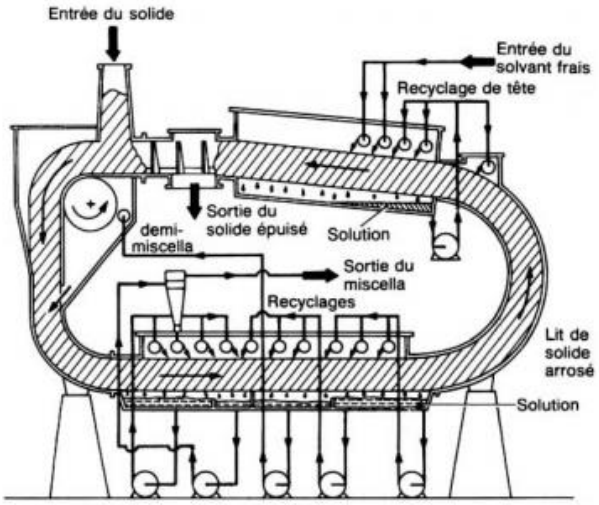


Figure I-52 Extracteur de type percolation de Crown (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

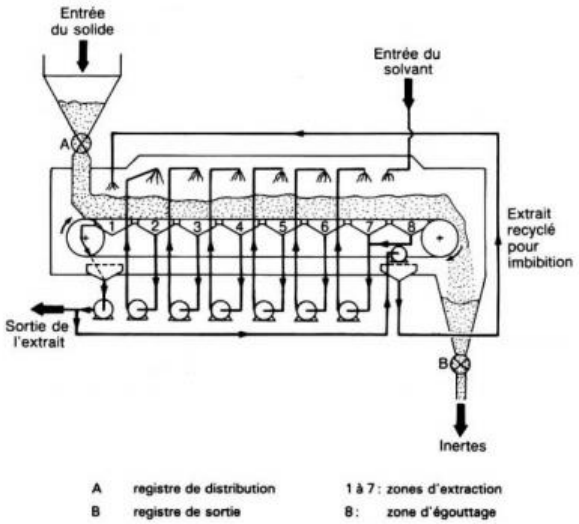


Figure I-53 Extracteur LM™ De Smet (d'après Frémeaux et Leybros (1990*b*))

I.4.2.3 Les extracteurs à vis de convoyage

Ces contacteurs fonctionnent essentiellement à contre-courant. Le solide est transporté par la ou les vis et peut être en immersion dans le solvant, introduit lui à contre-courant comme dans la tour d'extraction de BMA (Figure I-54), ou à co-courant comme dans l'extracteur bi-vis de Clextral (Figure I-55). Dans un deuxième cas de figure, le solvant est aspergé sur le solide avec possibilité de recycler les extraits (exemples de l'extracteur Vatron Mau (Figure I-56) ou de l'extracteur Contex™ de GEA Niro (Figure I-57)). L'extracteur BMA a été utilisé pour l'extraction du sucre de betterave (Frémeaux et Leybros, 1990*b*) et le Vatron Mau pour l'extraction des alcaloïdes des feuilles de *Catharanthus roseus* (Poirot, 2007).

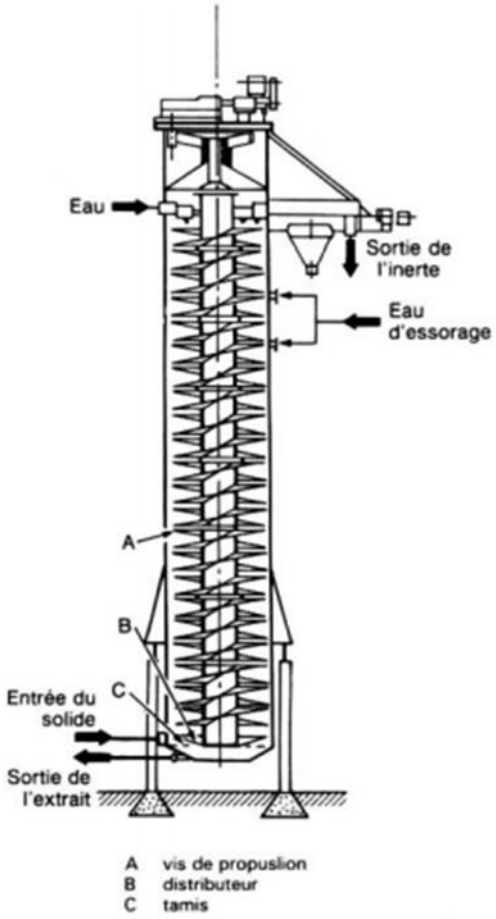


Figure I-54 Tour d'extraction de BMA (d'après Frémeaux and Leybros (1990*b*))

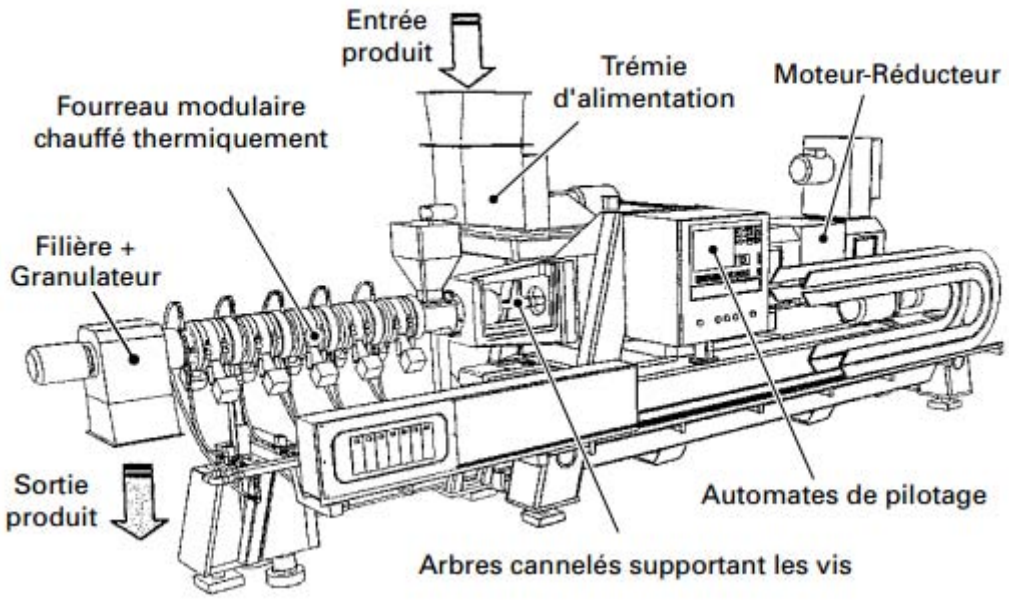


Figure I-55 Extracteur bi-vis (d'après Roustel *et al.* (2000))

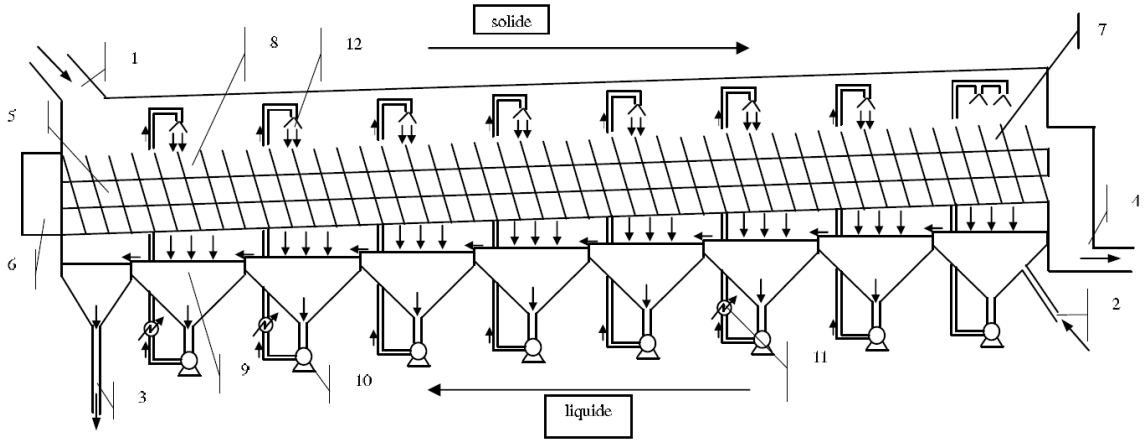


Figure I-56 Extracteur Vatron Mau (d'après Poirot (2007)) : (1) entrée solide, (2) entrée solvant, (3) sortie du soluté, (4) sortie des marcs, (5) vis, (6) moteur, (7) zone d'égouttage, (8) zone de percolation, (9) bac, (10) pompe, (11) échangeur de chaleur, (12) distributeur de solvant

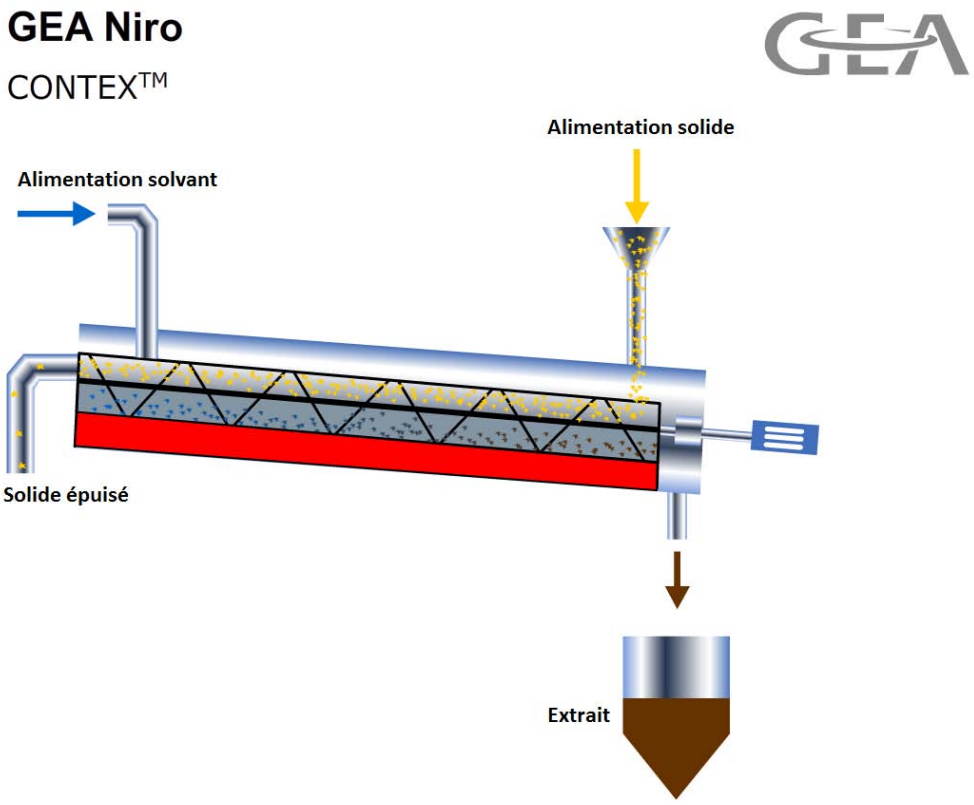


Figure I-57 Schéma de principe de l'extracteur Contex™ de GEA Niro
Source : www.niro.com, modifié

La technologie bi-vis est un cas particulier. Historiquement elle est utilisée en extrusion, pour transformer physiquement et chimiquement un matériau. De nos jours ses domaines d'application sont principalement dans l'industrie de l'alimentation, des matières plastiques et du papier (Celhay, 2013; Colas *et al.*, 2013). Le Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle a étendu son utilisation au fractionnement de la matière végétale comme l'extraction d'huile essentielle (Nourredine, 1995), de pigments (Orosco, 1998), de protéines du tournesol (Evon, 2008) ou encore l'extraction d'hémicelluloses de la paille et du son de blé (Zeitoun, 2011). Cet équipement est capable de réaliser des actions chimiques (points d'injection de liquides avec ou sans réactifs), thermiques (régulation thermique du fourreau) et mécaniques (configuration des profils de vis) en une seule étape, c'est pourquoi le terme de réacteur TMC (Thermo-Mécano-Chimique) lui est attribué (Evon, 2008).

L'extracteur bi-vis possède deux vis sans fin co-roratives et co-pénétrantes entourées d'un fourreau équipé de modules régulés thermiquement (Figure I-58). Ces deux vis sont segmentées en tronçons modulables afin d'adapter le profil de vis pour chaque application. Ces tronçons sont divisés en trois catégories :

- Les vis de convoyage, à « pas » plus ou moins grands, qui transportent la matière et permettent sa compression et sa détente,

- Les disques malaxeurs, qui donnent lieu à un broyage de la matière,
- Les contre-filets, à pas inverses, qui imposent une restriction au passage de la matière.

A l'extrémité du fourreau, une tôle perforée permet la séparation solide-liquide (Figure I-58). La configuration du profil de vis est élaborée par l'opérateur afin d'imposer à la matière végétale les trois principales opérations unitaires suivantes :

- Réduction de la taille des particules par broyage ou défibrage,
- Extraction solide-liquide par injection de liquides et mise en contact sous cisaillement,
- Séparation solide-liquide par pressage et filtration du liquide.

L'extracteur bi-vis est un procédé continu qui favorise la pénétration du solvant dans la matière végétale et la rupture des parois végétales. Il facilite donc l'extraction solide-liquide des solutés contenus dans les matières premières. C'est un procédé autonettoyant car le mouvement des vis, l'une par rapport à l'autre, détache la matière et la transporte. Il permet aussi de travailler dans des conditions abrasives, ou corrosives, les alliages du fourreau et des vis étant conçus pour résister à de telles conditions (Evon, 2008; Colas, 2012; Celhay, 2013).

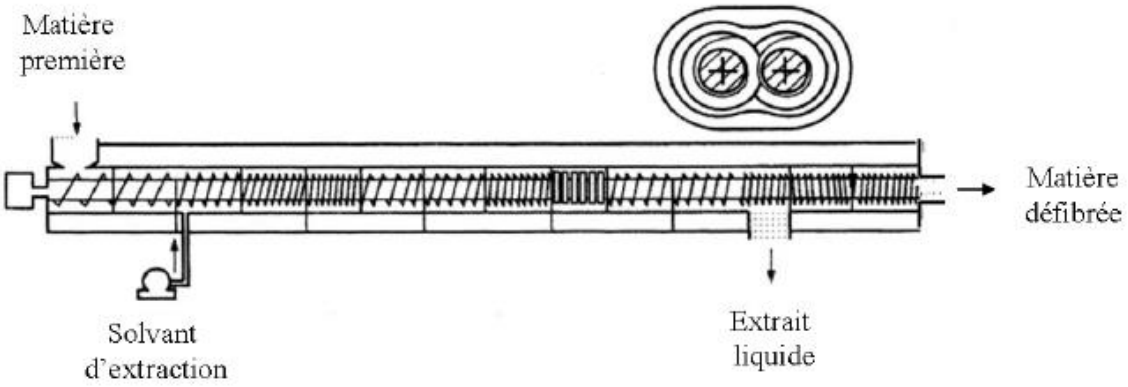


Figure I-58 Extracteur bi-vis (source : (Celhay, 2013))

I.4.2.1 Quelques données industrielles

Le Tableau I-11 précise quelques données de fonctionnement d'équipements évoqués dans la partie précédente. Nous pouvons constater que ces installations permettent d'obtenir des rendements d'extraction et des capacités de production élevés. Leur coût cependant, quelques centaines de milliers d'euros, peut être dissuasif pour de petites structures ou si le retour sur investissement n'est pas suffisant.

Tableau I-11 Données de fonctionnement de quelques extracteurs continus à contre-courant (d'après Kassing *et al.* (2010))

N.D. : non déterminé

Extracteur			Capacité (T/jour)	Rendement	*Ratio* L/S	Temps de séjour (min)
Mode de transport	**Constructeur**	**Modèle**				
Lits mobiles	Harburg-Freudenberger (Allemagne)	Extracteur Carousel™	50-5000	92-98	0,85-1	30-90
	De Smet (Belgique)	Extracteur Reflex™	5000-12000	99	~1	30-120
	Lurgi (Allemagne)	Extracteur Sliding Cell™	100-5000	98-99	N.D.	N.D.
Chaîne de convoyage	Crown Iron (Etats-Unis)	Model III™ de type percolation	0-12000	80-99	0,8-8	30-180
	De Smet (Belgique)	Extracteur LM™	500-5000	99	~1	60-120
Vis de convoyage	BMA (Allemagne)	Tour d'extraction de BMA	4000-17000	99	3-5	90-150
	GEA Niro (Danemark)	Extracteur Contex™	12-24	>90	~6	30-120

I.5 Synthèse

Nous avons vu que le phénomène d'extraction solide-liquide à partir de matière végétale dépend de nombreux facteurs et phénomènes physico-chimiques. Les trois étapes primaires de l'extraction sont la pénétration du solvant dans la matière végétale, la libération du soluté de la cellule et la diffusion de celui-ci à travers la matière végétale jusque dans la phase continue de solvant. Les glycosides de stéviol se présentent sous forme libre dans la vacuole des cellules chlorophylliennes. La matière végétale est une matrice complexe qui, de par sa structure, peut ralentir considérablement la diffusion du solvant ou du soluté. Une étude sur le transfert de matière en système batch à l'échelle laboratoire est donc indispensable pour déterminer les facteurs limitants de l'extraction solide-liquide des édulcorants des feuilles de Stévia.

Le transfert à l'échelle pilote peut souligner des limites qui n'existaient pas ou qui n'étaient pas visibles à l'échelle laboratoire. La géométrie et le mode d'agitation des contacteurs pilotes ont souvent de grandes influences sur le transfert de matière. Le passage du batch au continu apporte aussi de nouvelles problématiques. Le mode de contact (immersion, percolation), le type de transport (compartiments mobiles, chaînes de transport, vis), le mode de fonctionnement (co-courant, contre-courant, courant-croisé) peuvent aussi influencer l'extraction solide-liquide. L'étude de ces paramètres est donc primordiale pour le choix d'un appareillage d'extraction solide-liquide.

Une unité d'extraction ne se résume pas à un seul contacteur. Elle comprend également le stockage et le transport des matières (matière première, extrait, matière épuisée), le prétraitement de la matière végétale (séchage, broyage), la séparation solide-liquide (presse, centrifugeuse) et le traitement de la matière finale (concentration, séchage, conditionnement, stockage). Réussir à assembler en un seul équipement différents procédés peut ainsi représenter un gain de temps et d'argent, de manipulation et limiter l'espace occupé par les équipements. C'est pourquoi la seule efficacité des installations n'est pas le seul critère à prendre en compte lors de la mise au point d'une unité d'extraction.

Les édulcorants de *Stevia rebaudiana* sont un sujet d'actualité qui suscite l'intérêt des consommateurs, du secteur industriel et de la recherche. Dans un monde où le caractère naturel et le respect de l'environnement des procédés de transformation sont des critères de plus en plus importants dans le choix d'un produit, les glycosides de stéviol semblent être une alternative prometteuse aux édulcorants synthétiques. Depuis leur autorisation aux Etats-Unis en 1995 et surtout en Europe en 2011, leur marché ne fait que croître, et les grands groupes industriels (même sucriers) les incorporent de plus en plus à leurs formulations. Le souhait d'implanter la culture et les procédés de transformation en Europe est très fort. Les premiers essais en champs sont très prometteurs, et montrent la faisabilité du transfert de la culture.

Pour répondre aux objectifs du projet STEVIANOV, qui est d'établir une filière tracée de *Stevia rebaudiana* Bertoni en France, la mise au point d'un procédé d'extraction solide-liquide des édulcorants contenus dans les feuilles de la plante devra mener à un procédé continu, respectueux de

l'environnement, au moins aussi efficace qu'un système batch et d'un coût accessible à une petite coopérative agricole.

Chapitre II
Extraction aqueuse des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni



L'objectif de nos travaux est de développer un procédé de fractionnement des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni pour produire un extrait riche en édulcorant, dont les glycosides de stéviol, et en particulier le stévioside et le rébaudioside A, sont considérés comme traceurs de qualité et d'activité. Dans ce chapitre, après avoir caractérisé la matière première, nous étudierons les principaux processus et mécanismes de l'extraction de ces composés permettant d'élaborer le schéma du procédé de fractionnement en vue de son transfert à l'échelle pilote.

De façon générale, le fractionnement de la matière végétale par extraction solide-liquide peut être résumé, de façon simplifiée, par le schéma suivant (Figure II-1) :

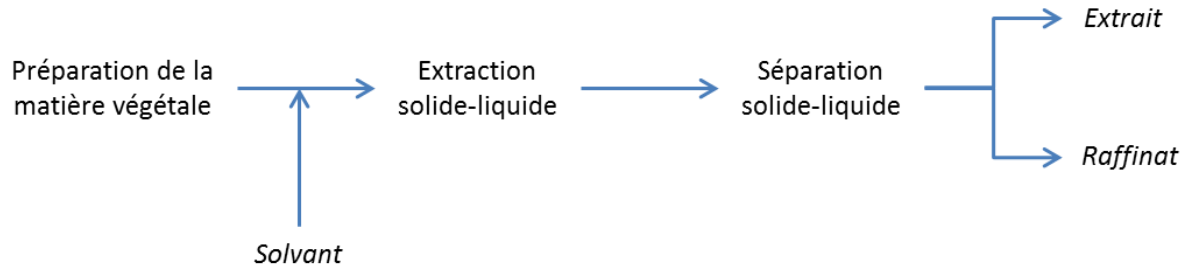


Figure II-1 Schéma simplifié du fractionnement de la matière végétale par extraction solide-liquide

La préparation de la matière végétale regroupe principalement les étapes de séchage et de broyage. Souvent réalisées lors de la récolte et du conditionnement pour son stockage, ces étapes peuvent aussi être réalisées préalablement à l'extraction solide-liquide :

- pour ajuster le taux d'hydratation des matières, comme par exemple dans le cas de l'extraction par un solvant organique,
- pour homogénéiser les dimensions et formes des matières, voire les classer, modifier leur densité apparente (volume occupé par le solide dans l'extracteur), et faciliter le transport et l'écoulement à l'introduction et dans l'extracteur solide-liquide,
- pour augmenter les surfaces d'échange solide-liquide par diminution de la granulométrie (paramètre diffusionnel),
- pour déstructurer les assemblages des tissus cellulaires (défibrage par cisaillement à taux d'hydratation contrôlé) et augmenter l'accessibilité des contenus cellulaires.

Les feuilles de Stévia utilisées pour notre étude, fournies par la société Stevia Natura SAS (Riom, France), proviennent d'une population de plantes, de la population « Criolla » cultivée au Paraguay. Elles sont séchées au soleil puis effeuillées manuellement. Les feuilles sont ensuite compactées dans des sacs de 40 kg pour l'expédition. L'étude de l'effet de ces prétraitements a été réalisée à partir d'échantillons de feuilles de la population « Criolla » cultivée à Toulouse et fournies par le Laboratoire d'Agronomie de Purpan (Toulouse, France).

L'extraction solide-liquide correspond à la mise en contact de la matière végétale (solide) et du solvant (liquide) pour la diffusion de ce dernier dans la matrice solide, la solubilisation des solutés dans le solvant et la diffusion des solutés vers l'extérieur du solide. La nature du solvant est le facteur prépondérant de cette étape. Son choix doit répondre à des critères d'affinité pour la matière végétale (diffusion aux interfaces et dans la matrice solide), mais aussi aux contraintes liées à la purification des extraits, à son recyclage, et à la sécurité de mise en œuvre. Bien que l'éthanol et le méthanol soient cités par plusieurs auteurs (Chapitre I Partie I.3.4.1, Liu *et al.*, 1997 ; Erckucuk *et al.*, 2009 ; Jaitak *et al.*, 2009), c'est l'eau qui a été retenue pour notre étude car elle répond le mieux à l'ensemble des critères compte tenu de la polarité des glycosides de stéviol, de son affinité pour la matière végétale, de sa disponibilité, de sa facilité de mise en œuvre et de son innocuité.

La séparation solide-liquide permet, comme son nom l'indique, de séparer la phase solide (raffinat) de la phase liquide (extrait). Cette étape peut être réalisée en même temps que l'extraction solide-liquide (cas de la percolation par exemple), ou être une opération à part entière nécessitant une action mécanique (pressage, essorage centrifuge, *etc.*), en particulier si l'affinité du solvant pour le solide est trop élevée, ou si la déstructuration du solide génère des particules ou des colloïdes entrainés avec le solvant.

L'étude de l'influence des principaux facteurs sur l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia sera donc menée dans la double perspective d'augmenter les rendements en glycosides de stéviol, mais aussi d'identifier les verrous technologiques posés par la mise en œuvre des conditions opératoires au stade pilote du procédé.

II.1 Caractérisation des matières premières et des produits de l'extraction aqueuse des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni

II.1.1 Caractérisation des feuilles

Les feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni en provenance du Paraguay, utilisées pour notre étude, sont récoltées manuellement après séchage des plantes au soleil et conditionnées en sac de 40 kg par compactage. Elles se présentent sous forme d'un mélange de feuilles, de morceaux de feuilles et de particules, de couleur vert-marron foncé (Figure II-2). Les contenus des différents sacs de feuilles utilisés au cours de notre étude n'ont pas présenté de différences visuelles significatives, soulignant ainsi l'homogénéité physique de la matière première utilisée.



Figure II-2 Photographie des feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

II.1.1.1 Caractéristiques physiques

L'analyse de la distribution granulométrique par tamisage des feuilles séchées et compactées du Paraguay (Partie expérimentale IV.1, Figure II-3) fait apparaître plusieurs populations de taille décroissante (Figure II-4). En effet, les feuilles de Stévia fraîches (Figure II-5) ont généralement une longueur de 3 à 5 cm pour une largeur de 1 à 2 cm (Chapitre I Partie I.1.6.1, Brandle *et al.*, 1998 ; Soejarto, 2002 ; Muanda, 2010 ; Tadav *et al.*, 2011 ; Martini *et al.*, 2015). Après séchage et conditionnement, seulement 20 % de la matière est refusée au tamis de 4 mm, et près de 60 % au tamis de 1,25 mm, dans lesquels des feuilles ou morceaux de feuilles sont identifiables. Mais en dessous, une population importante de particules (près de 35 % de 1,25 à 0,25 mm) et de fines (5% < 250 µm) est présente. Il apparait donc que le séchage et surtout le conditionnement par compactage

pourrait avoir un effet de broyage générateur de moyennes et de fines particules. La présence de ces dernières devra être prise en considération pour l'opération de séparation solide-liquide après extraction aqueuse.

Malgré le compactage des feuilles séchées opéré pour leur conditionnement, la densité apparente des échantillons prélevés est faible (84,8 ± 6,3 kg/m^3, mesurée par pesée dans une éprouvette graduée, n = 15), traduisant bien le caractère foisonnant des empilements de feuilles séchées. Remarquons que la présence d'une forte proportion de particules et de fines dans les feuilles compactées (et transportées) traduit aussi le caractère fragile du matériau végétal séché.

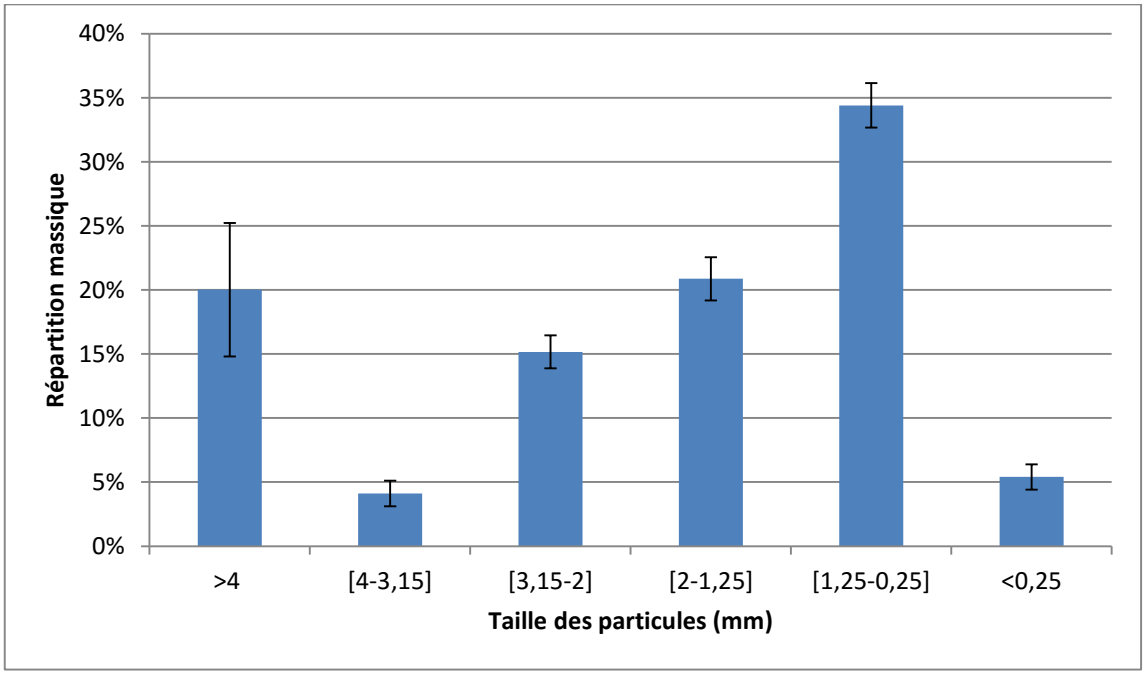


Figure II-3 Granulométrie des feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (n = 3)

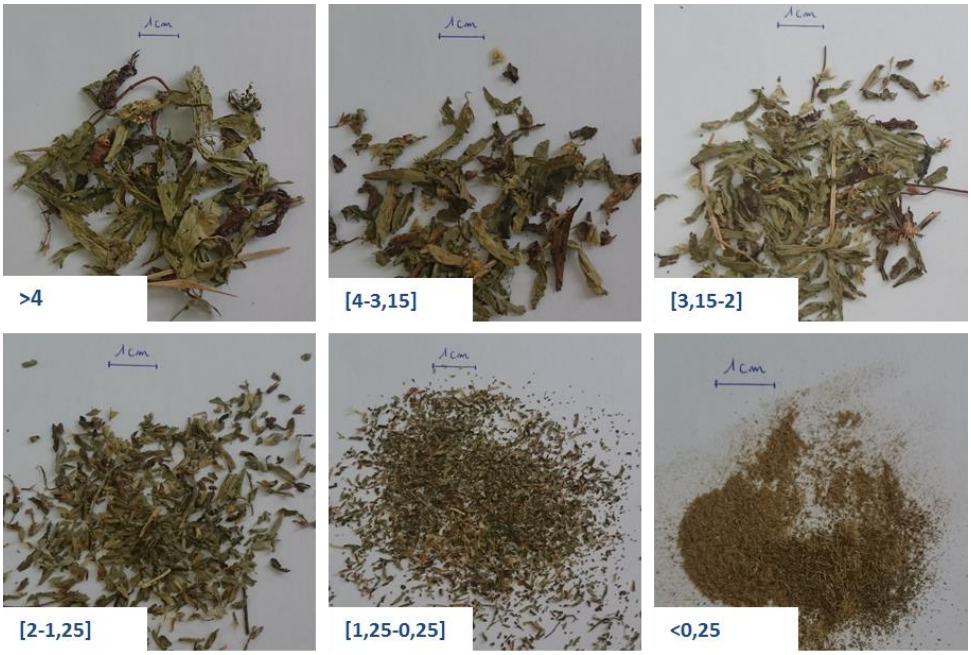


Figure II-4 Photographie des différentes tailles de particules (en mm) des feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)



Figure II-5 Photographie d'une plante en pot de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Toulouse)

Le broyage au broyeur à couteau (Pulvérisette 19, Fritsh, France) équipé d'une grille de refus de 1 mm, permet d'homogénéiser la distribution des particules (Figure II-6 et Figure II-7 : 80 % de particules comprises entre 800 et 200 µm), augmente de plus de trois fois la masse volumique apparente (271,3 ± 5,8 kg/m^3, n=15) et facilite l'écoulement du mélange. La mise en œuvre d'une grille de refus de 0,5 mm au broyage déplace la répartition granulométrique des particules (Figure II-8 et Figure II-9 : 80 % de particules de tailles comprises entre 200 et 40 µm et 55 % inférieures à 120 µm) vers une taille inférieure à la valeur moyenne mesurée pour l'épaisseur des feuilles (184 ± 30 µm, n = 15).



Figure II-6 Photographie des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

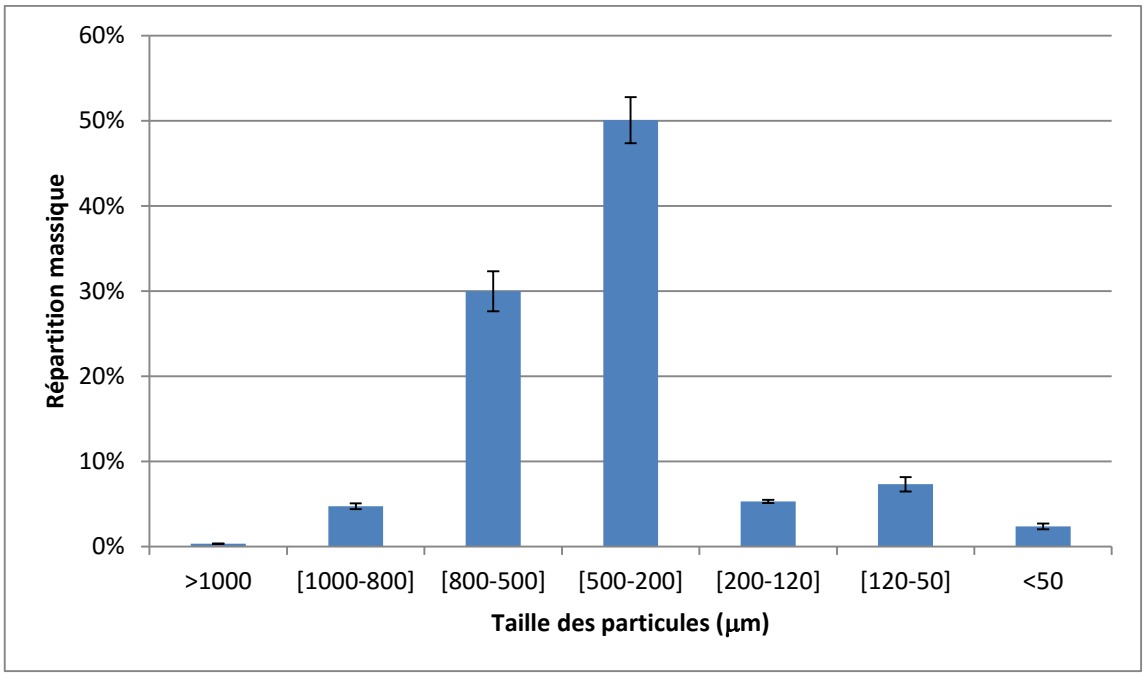


Figure II-7 Granulométrie des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (n = 3)



Figure II-8 Photographie des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 0,5 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

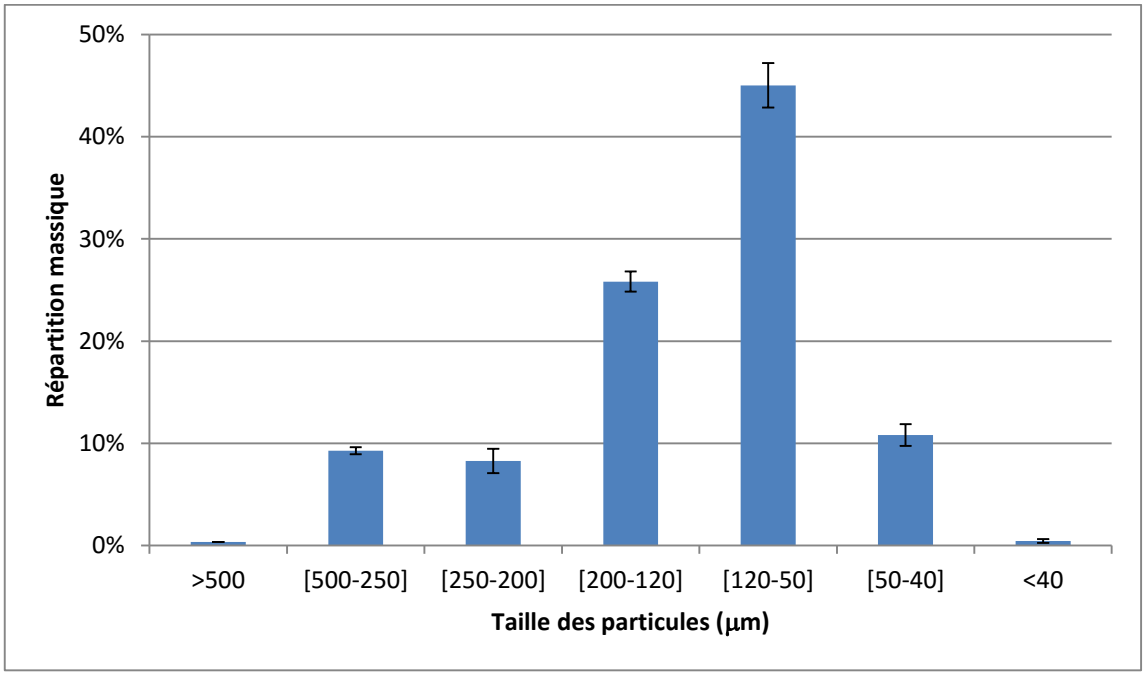


Figure II-9 Granulométrie des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 0,5 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (n = 3)

Le broyage avec une grille de refus de 0,5 mm s'apparente donc à une micronisation dont l'effet de déstructuration atteindrait les tissus cellulaires dans l'épaisseur des feuilles. Dans la perspective du transfert d'échelle, cette opération pose le double problème d'une part de la manipulation de très fines particules et de son impact sur les coûts de fonctionnement (coût en énergie, coût des installations de transport aéraulique, sécurité des poussières) et d'autre part de la séparation raffinat-extrait après extraction solide-liquide qui devra être adaptée à la présence en forte

proportion (<10 %) de particules solides de taille inférieure à 50 µm. C'est pourquoi seul le broyage avec la grille de refus de 1 mm a été retenu pour évaluer l'apport d'une réduction de taille sur le transfert de matière lors de l'extraction solide-liquide.

II.1.1.2 Composition chimique des feuilles de Stévia du Paraguay

II.1.1.2.1 Teneur en matière sèche

La teneur en matière sèche a été déterminée par séchage à l'étuve selon la norme française NF V 03-903 (Partie expérimentale IV.2). Elle a été mesurée tout au long de l'étude, sur 46 échantillons, et nous avons déterminé une valeur moyenne de 92,0 ± 0,7 % très proche de la valeur moyenne des teneurs obtenues par différents auteurs (92,2 ± 2,2 %) (Chapitre I partie I.1.7, Savita *et al.*, 2004 ; Tadhani *et al.*, 2006 ; Abou-Arab *et al.*, 2010 ; Goyal *et al.*, 2010 ; Kaushik *et al.*, 2010 ; Wölwer-Rieck, 2012 ; Shivanna *et al.*, 2013).

II.1.1.2.2 Teneur en composés hydrosolubles totaux

Comme nous le verrons ultérieurement (Partie II.4.1), la teneur en hydrosolubles totaux a été déterminée par extractions aqueuses successives sur des feuilles séchées et broyées avec une grille de refus de 1 mm. La valeur moyenne obtenue de 43,4 ± 6,1 g de composés hydrosolubles pour 100 g de matière sèche est voisine de la valeur obtenue par Kinghorn et Soeajarto (1985) (42 g pour 100 g de matière sèche).

II.1.1.2.3 Teneur en cendres minérales

La teneur en cendres minérales a été déterminée par combustion selon la norme française NF V03-322 (Partie expérimentale IV.3). La mesure réalisée sur deux échantillons de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, conduit à des valeurs de 9,2 et 9,4 g de cendres minérales pour 100 g de matière sèche similaires à la valeur moyenne des teneurs relevées dans la littérature (8,7 ± 2,2 g pour 100 g de matière sèche) (Chapitre I partie I.1.7, Savita *et al.*, 2004 ; Tadhani *et al.*, 2006 ; Abou-Arab *et al.*, 2010 ; Goyal *et al.*, 2010 ; Kaushik *et al.*, 2010 ; Wölwer-Rieck, 2012 ; Shivanna *et al.*, 2013).

II.1.1.2.4 Teneurs en principaux composés pariétaux

La cellulose, les hémicelluloses et les lignines sont les principaux composés des parois des cellules végétales et leur composition a été déterminée sur deux échantillons de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, selon la méthode développée par Van Soest et Wine (Partie expérimentale IV.4, Van Soest et Wine 1967, 1968). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 Teneur en principaux composés pariétaux des feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) par la méthode de Van Soest et Wine

	Teneurs (g/100g de matière sèche)			
	Cellulose	**Hémicelluloses**	**Lignines**	**Total**
Echantillon 1	14,9	2,1	4,2	21,2
Echantillon 2	14,3	3,0	3,9	21,2

La teneur en fibres insolubles définie comme la somme cellulose-hémicelluloses-lignines est proche de 21 %, plus élevée que la teneur en fibres brutes déterminée par plusieurs auteurs (près de 15 % Chapitre I, Partie I.1.7.1.1, Savita *et al.*, 2004 ; Abou-Arab *et al.*, 2010 ; Goyal *et al.*, 2010 ; Serio, 2010 ; Wölwer-Rieck, 2012 ; Shivanna *et al.*, 2013) mais selon une méthode d'analyse différente (extractions successives, acide et basique, à chaud, de la matière végétale) sous-estimant la quantité totale des composés pariétaux d'une matière végétale selon Baker (1977). La répartition de cellulose (70 %), d'hémicelluloses (10 %) et de lignines (20 %) dans les fibres insolubles est cohérente avec le caractère peu lignifié des feuilles de Stévia au stade de leur récolte.

II.1.1.2.5 Teneurs en protéines

La teneur en protéines a été déterminée à partir du dosage de l'azote total par la méthode Kjeldahl selon la norme française NF V 18-100 (Partie expérimentale IV.5, Kjeldahl 1883). La mesure réalisée sur trois échantillons de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, conduit à une valeur de 14,4 ± 0,2 g de protéines pour 100 g de matière sèche. Cette valeur est voisine de la valeur moyenne des teneurs obtenues par différents auteurs (13,3 ± 3,2 g pour 100 g de matière sèche) (Chapitre I, Partie I.1.7.1.2, Savita *et al.*, 2004 ; Tadhani *et al.*, 2006 ; Abou-Arab *et al.*, 2010 ; Goyal *et al.*, 2010 ; Kaushik *et al.*, 2010 ; Serio, 2010 ; Wölwer-Rieck, 2012 ; Shivanna *et al.*, 2013).

II.1.1.2.6 Teneurs en lipides

La teneur en lipides a été déterminée par extraction au cyclohexane selon la norme française NF V03-908 (Partie expérimentale IV.6). La mesure réalisée sur 3 échantillons de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, conduit à la valeur de 4,5 ± 0,5 g de lipides pour 100 g de matière sèche, comparable à la valeur moyenne des teneurs obtenues par différents auteurs (3,6 ± 1,2 g de lipides pour 100 g de matière sèche) (Chapitre I, Partie I.1.7.1.3, Savita *et al.*, 2004 ; Tadhani *et al.*, 2006 ; Abou-Arab *et al.*, 2010 ; Goyal *et al.*, 2010 ; Kaushik *et al.*, 2010 ; Serio, 2010 ; Wölwer-Rieck, 2012 ; Shivanna *et al.*, 2013).

II.1.1.2.7 Teneur en huile essentielle

La teneur en huile essentielle a été déterminée par hydrodistillation, sur cinq échantillons de feuilles séchées et broyées, avec une grille de 1 mm, selon le protocole de la pharmacopée française (Partie expérimentale IV.8). Les résultats obtenus sont présentés sur le Tableau II-2.

Tableau II-2 Teneurs en huile essentielle obtenues pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

Répétition	Teneur en huile essentielle (g / 100 g de matière sèche)	Teneur moyenne en huile essentielle (g / 100 g de matière sèche)
1	0,061	0,053 ± 0,009
2	0,051	
3	0,046	
4	0,043	
5	0,063	

Ces valeurs sont proches de celle déterminée par Martelli *et al.* (1985) : 0,025 g pour 100 g de matière sèche. Rappelons que de nombreux facteurs peuvent influencer l'accumulation des composés définissant ces huiles essentielles dans les feuilles, et qu'outre le génotype et le stade ontogénétique de la plante le séchage et le stockage des feuilles peut influencer négativement ces teneurs (Chapitre I, Partie I.1.7.2.2, Can Baser et Buchbauer, 2009 ; Ceunen et Geuns, 2013).

II.1.1.2.8 Teneur en composés phénoliques totaux et mesure de la capacité antioxydante

Pour déterminer la teneur en composés phénoliques totaux des feuilles, un dosage de Folin-Ciocalteu a été réalisé (Partie expérimentale IV.8) sur les extraits obtenus par deux méthodes d'extraction (Tableau II-3, Partie expérimentale IV.10) avec des feuilles broyées avec une grille de refus de 0,5 mm.

Tableau II-3 Conditions d'extractions pour le dosage des composés phénoliques totaux

Méthode d'extraction	Température (°C)	Durée (min)	Masse de feuilles (g)	Solvant	Volume de solvant (mL)
Macération	20	120	1	Ethanol 80%	50
ASE[a]	100	4	0,5	Eau Milli-Q	10

[a]ASE = Accelerated Solvent Extraction

Les résultats : 51,5 et 69,2 mg d'équivalent acide gallique / g de matière sèche (Tableau II-4), pour les extraits obtenus par macération (extrait éthanolique) et par ASE (extrait aqueux) respectivement, sont cohérents avec ceux trouvés par Periche *et al.* (2015*a*) dont la teneur en composés phénoliques totaux maximale de 93,4 mg d'équivalent acide gallique / g de matière sèche avec une extraction conventionnelle à l'eau.

L'activité antioxydante élevée des extraits de Stévia décrite par plusieurs auteurs (Chapitre I Partie I.1.7.2.3, Tadhani *et al.*, 2007 ; Shukla *et al.*, 2009 ; Kim *et al.*, 2011 ; Criado *et al.*, 2015 ; Periche *et al.*, 2015a) a par ailleurs été confirmée par piégeage des radicaux libres à l'aide du radical $DPPH^{\cdot}$ (Partie expérimentale IV.9). Les valeurs faibles de CI_{50} déterminées, 31 et 24 mg/L, pour les extraits obtenus par macération (extrait éthanolique) et par ASE (extrait aqueux) respectivement (Tableau II-4) sont proches de celles mesurées sur un extrait éthanolique (45 mg/L) et sur un extrait aqueux (17 mg/L) de Romarin (Rodríguez-Rojo *et al.* (2012)), reconnu comme puissant antioxydant.

Tableau II-4 Teneur en composés phénoliques totaux de feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)et activité antioxydante des extraits

Méthode d'extraction	Teneur en composés phénoliques totaux (mg d'équivalent acide gallique / g de matière sèche)	Capacité antioxydante (DPPH) CI_{50} (mg/L)
Macération	51,5	31
ASE[a]	69,2	24

[a]ASE = Accelerated Solvent Extraction

II.1.1.2.9 Teneur en glycosides de stéviol

Le dosage des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni a fait l'objet d'une mise au point de la méthode d'extraction en ASE (Partie expérimentale IV.10), dont les résultats ont été publiés dans le journal Food Chemistry (Jentzer *et al.*, 2015). Les deux glycosides majoritaires (stévioside et rébaudioside A) sont dosés dans les extraits aqueux par CLHP-UV (Partie expérimentale IV.11). Trois extractions ont été réalisées sur 6 lots différents de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 0,5 mm. Une valeur de 2,35 ± 0,27 g de rébaudioside A pour 100 g de matière sèche et de 6,00 ± 0,40 g de stévioside pour 100 g de matière sèche ont été obtenues. Bien que Brandle *et al.* (1998) indiquent que la teneur en glycosides de stéviol puisse représenter jusqu'à 20% de la matière sèche des feuilles de Stévia, les valeurs obtenues pour les feuilles de Stévia de notre étude sont cohérentes avec celles relevées dans la littérature (Chapitre I Partie I.2.1, Dacome *et al.*, 2005 ; Geuns, 2010 ; Ceunen et Geuns, 2013a), avec un *ratio* stévioside / rébaudioside A de 70% et 30%.

II.1.1.2.10 Tableau récapitulatif

L'ensemble des constituants dosés, autres que les hydrosolubles, (Tableau II-5) représente près de 60 % de la matière sèche des feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay). Certains auteurs complètent ce bilan par des glucides totaux (Chapitre I Partie I.1.7, Savita *et al.*, 2004 ; Abou-Arab *et al.*, 2010 ; Serio, 2010 ; Shivanna *et al.*, 2013), mais d'autres composés comme des acides organiques, des vitamines, des saponines, des alcaloïdes ou encore des anthraquinones sont également évoqués dans la littérature (Chapitre I Partie I.1.7, Kennelly, 2002 ; Savita *et al.*, 2004 ; Tadhani et Subhash, 2006 ; Hossain *et al.*, 2011 ; Kim *et al.*, 2011 ; Sheeja et Lawrence, 2015)). L'analyse d'un extrait aqueux des feuilles pourrait aussi permettre de compléter ce bilan.

Tableau II-5 Composition des feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

	Valeur (g/100 g de matière sèche)
Hydrosolubles totaux	43,4 ± 6,1
Cellulose + Hémicelluloses + Lignines	21,2 ± 0,0
Protéines	14,4 ± 0,2
Lipides	4,5 ± 0,5
Matières minérales	9,3 ± 0,1
Composés volatiles	0,053 ± 0,009
Glycosides de stéviol (stévioside + Rébaudioside A)	8,4 ± 0,7

II.1.2 Caractérisation d'un extrait aqueux des feuilles de Stévia provenant du Paraguay

L'extraction des composés hydrosolubles d'une matière végétale est largement dépendante du mode d'extraction (macération, batch agité, percolation, extraction assistée, *etc.*) et des conditions opératoires (température, *ratio* liquide-solide, durée de contact, *etc.*). Pour ces analyses, les conditions opératoires (température de 60°C, *ratio* liquide-solide de 11 et agitation magnétique de 600 tr/min) ont été choisies à partir des études réalisées pour l'extraction des glycosides de stéviol (Chapitre I Partie I.3.4.1 Pasquel *et al.*, 2000 ; Teo *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2010 ; Rai *et al.*, 2012 ; Das *et al.*, 2014 ; Lorenzo *et al.*, 2014 ; Periche *et al.*, 2015a) selon le protocole décrit en partie expérimentale IV.12.

Le bilan matière établi selon ces conditions d'extraction (Tableau II-6) permet d'estimer à 32,5% le rendement d'extraction en matière sèche, sans tenir compte d'une perte de 4% de la matière sèche introduite liée principalement aux conditions de séparation liquide-solide par filtration.

Tableau II-6 Répartition massique et matière sèche des phases solides et liquides, avant et après extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

		Masse (g)	Matière sèche (g/100g)
Avant extraction	Eau	599,2	0,0
	Feuilles	60,4	92,0
Après extraction et séparation	Extrait	502,8	3,6
	Raffinat	134,0	26,2

Les teneurs en azote, soufre et en phosphore, ainsi que celles de certains acides organiques, sucres, anions et de cations ont été déterminées par le Service Central d'Analyse de l'Institut des Sciences Analytiques du CNRS de Villeurbanne (France). Les résultats présentés de façon exhaustive en Annexe 1, sont commentés ci-après.

II.1.2.1 Teneur en azote

Le dosage de l'azote par analyse élémentaire de l'extrait révèle une concentration de 1,7 g/L, soit près de 4,7 % (g/g) de l'extrait sec. Cet azote se retrouve sous forme d'anion nitrate ($[NO_3^-]$ = 251 mg/L) et de cation ammonium ($[NH_4^+]$ = 36,8 mg/L) dans l'extrait, mais n'expliquent pas à eux seuls la teneur en azote. L'extraction de protéines et de peptides contenus dans les feuilles de Stévia (2,31 g d'azote protéique pour 100 g de matière sèche, déterminé par la méthode de Kjeldahl, Partie expérimentale IV.5) est une hypothèse cohérente avec la teneur en azote de l'extrait sec, qui correspondrait à 66 % des protéines de la feuille.

II.1.2.2 Teneur en phosphore

Le dosage du phosphore par microanalyse (146 mg/L) est cohérent avec la concentration en anion phosphate ($[PO_4^{3-}]$ = 401 mg/L). Bien que le phosphore soit un constituant de nombreux composés biochimiques, qu'il participe à différentes réactions fondamentales (respiration, métabolisme des glucides) et qu'il intervienne dans les transports d'énergie (ATP ou Adénosine TriPhosphate), il ne représente que 0,4 % de la matière sèche de l'extrait.

II.1.2.3 Teneur en acides organiques

Seuls l'acide quinique et l'acide tartrique (Figure II-10) ont pu être détectés et quantifiés. L'acide quinique est un composé largement présent dans les plantes (Wolinsky *et al.*, 1964). Il est reconnu pour avoir des propriétés astringentes (Rubico et McDaniel, 1992). Sa forte concentration dans l'extrait (1300 mg/L), cohérente avec celle de l'anion quinate (1324 mg/L), pourrait donc être à l'origine de l'arrière-goût associé aux extraits de Stévia. L'acide tartrique est aussi un constituant classiquement retrouvé dans les plantes (Stafford, 1959), sa teneur (126 mg/L) n'équivaut qu'à 0,4 % de la matière sèche de l'extrait.

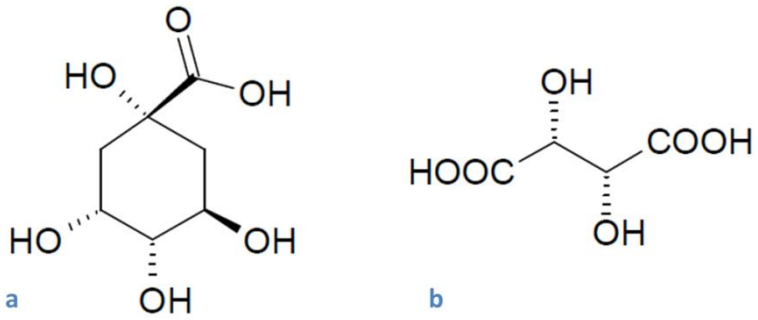


Figure II-10 Structures chimiques de l'acide quinique (a) et du L(+) acide tartrique (b)

II.1.2.4 Teneur en sucres

Le galactose (471 mg/L), le fructose (297 mg/L) et le ribose (261 mg/L) (Figure II-11) sont les sucres majoritaires de l'extrait. D'autres sucres en quantités inférieures ont été dosés comme le cellobiose (36,2 mg/L), l'inositol (20,9 mg/L) et le mannitol (17,4 mg/L). Au total, leurs teneurs représentent 3 % de la matière sèche de l'extrait.

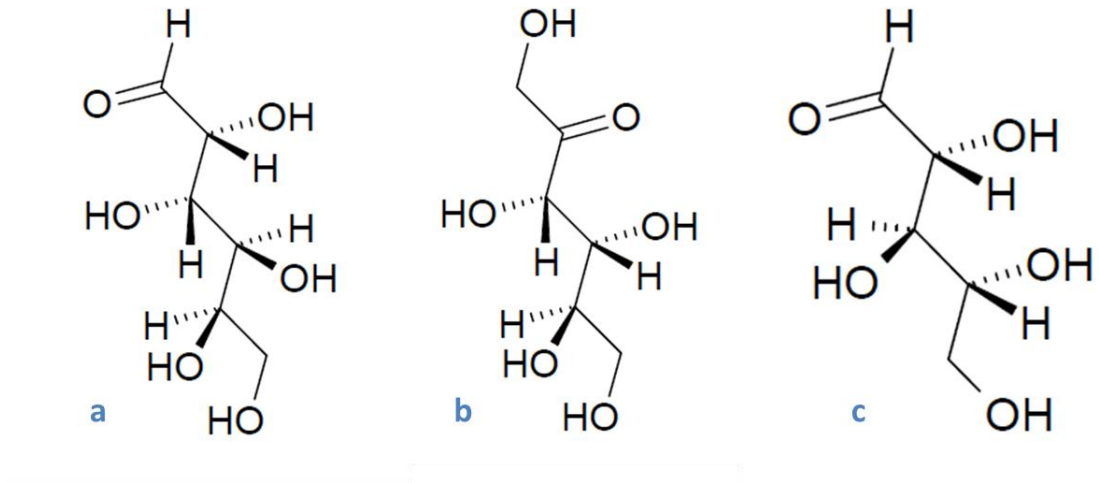


Figure II-11 Structures chimiques (formes linéaires) du D-galactose (a), du D-fructose (b) et du D-ribose (c)

II.1.2.5 Teneur en anions

Les principaux anions dosés sont le quinate (1324 mg/L), le citrate (672 mg/L) (Figure II-12), le chlorure ($[Cl^-]$ = 499 mg/L), le phosphate ($[PO_4^{3-}]$ = 401 mg/L) et le nitrate ($[NO_3^-]$ = 251 mg/L). L'ensemble des anions dosés équivaut à 10 % de la matière sèche de l'extrait.

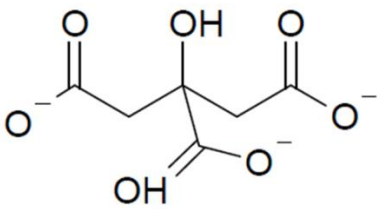


Figure II-12 Structure chimique de l'anion citrate

II.1.2.6 Teneur en cations

Le potassium ($[K^+]$ = 1810 mg/L) a été identifié comme le cation majoritaire de l'extrait, suivi du calcium ($[Ca^{2+}]$ = 423 mg/L), du magnésium ($[Mg^{2+}]$ = 236 mg/L) et dans une moindre mesure de l'ammonium ($[NH_4^+]$ = 36,8 mg/L) et du sodium ($[Na^+]$ = 6,4 mg/L). Ces résultats sont en accord avec ceux de différents auteurs (Chapitre I Partie I.1.7.2.4, Savita *et al.*, 2004 ; Tadhani *et al.*, 2006 ; Goyal *et al.*, 2010 ; Kaushik *et al.*, 2010 ; Serio, 2010). Ces cations représentent au total 7 % de la matière sèche de l'extrait.

Au final, environ 25 % de la matière sèche de l'extrait a pu être identifié au travers de ces différents dosages. La teneur en matière sèche de l'extrait représente environ 33 % de la matière sèche des feuilles, ainsi environ 8 % de composés (acides organiques, sucres, anions et cations) des feuilles de Stévia ont pu être dosés. Cela nous a donc permis de compléter un peu plus le bilan de matière : environ 70 % de la matière sèche des feuilles a pu être caractérisé.

II.2 Modélisation de l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol

II.2.1 Représentation des processus d'extraction

Rappelons que dans les feuilles, les glycosides de stéviol sont localisés dans les vacuoles des cellules des parenchymes (Figure II-13) (Chapitre I Partie I.2.2, Bondarev *et al.*, 2003 ; Brandle et Telmer, 2007 ; Ceunen et Geuns, 2013a).

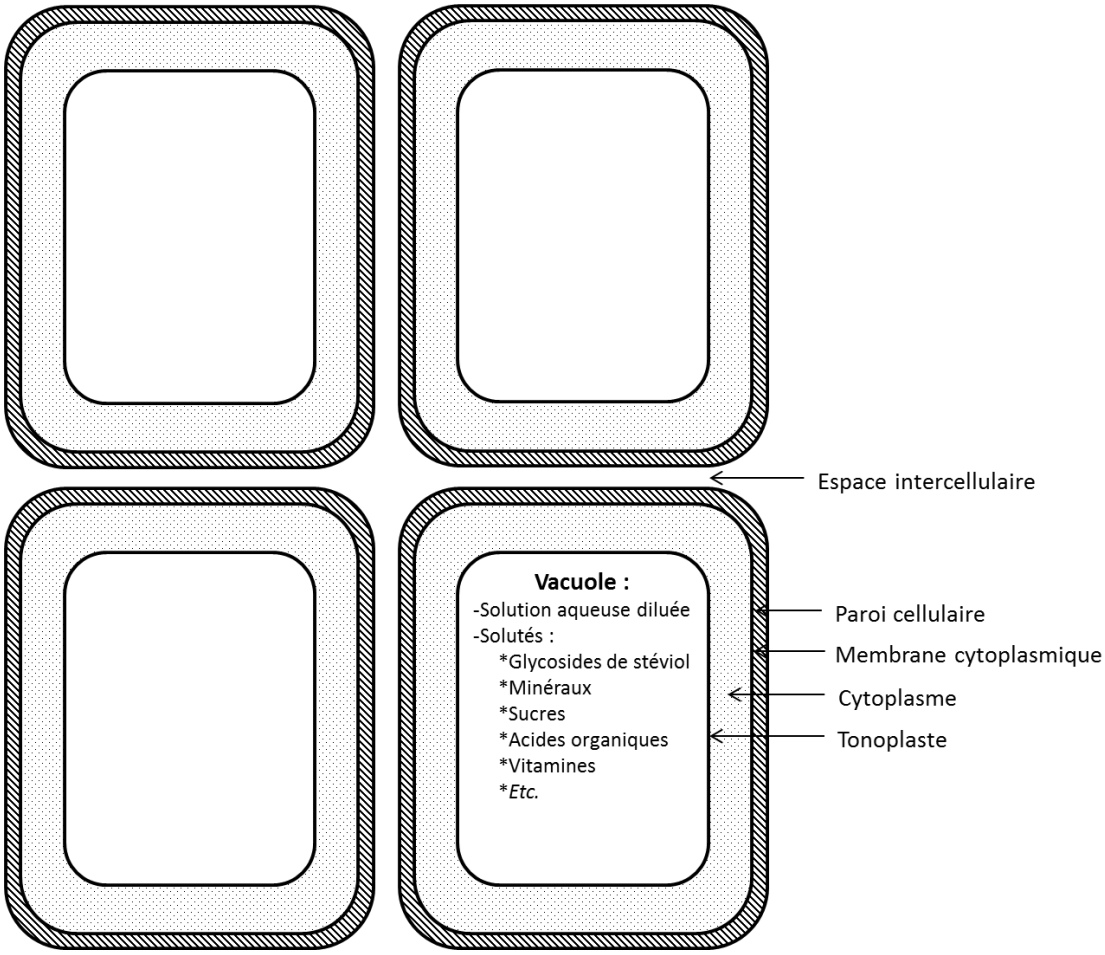


Figure II-13 Représentation schématique de cellules parenchymateuses de feuille de Stévia (d'après Marcotte *et al.* (1991))

L'extraction aqueuse de ces glycosides suppose donc que l'eau puis les solutés qu'elle entraine franchissent plusieurs barrières définissant les différents compartiments cellulaires et leurs assemblages tissulaires selon plusieurs processus (Figure II-14) :

- le transport apoplasmique, qui s'effectue à l'extérieur des membranes cellulaires et qui peut être considéré comme la diffusion des molécules dans la paroi cellulaire et les espaces intercellulaires,
- le transport symplasmique, qui a lieu à l'intérieur de la membrane cytoplasmique, et qui est caractérisé par le mouvement des molécules d'une cellule à une autre à travers de petits canaux, les plasmodesmes,
- le transport transmembranaire qui représente l'échange entre le protoplasme (cytoplasme + vacuole) et l'espace libre qui comprend la paroi cellulaire et l'espace intercellulaire.

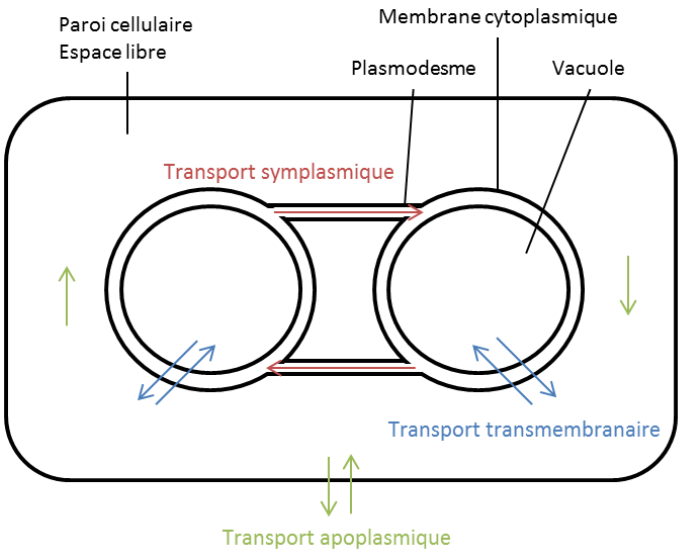


Figure II-14 Représentation schématique des voies de transport de solutés ou de solvant dans un tissu végétal (d'après Marcotte *et al.* (1991))

Ainsi pour sortir de la cellule, le soluté devrait traverser le tonoplaste, la membrane cytoplasmique et la paroi cellulaire, selon un processus d'osmose sous l'effet de la concentration en eau dans les différents compartiments. En particulier, la membrane plasmique, qui sépare la paroi cellulaire du cytoplasme, a pour fonction de réguler ce qui entre et sort de la cellule végétale (Marcotte *et al.*, 1991). Elle est souvent considérée comme la principale barrière au transport de solutés et de solvants dans et hors de la cellule. Ainsi, par exemple, les membranes des cellules parenchymateuses de tubercules de pomme de terre sont imperméables au saccharose (Marcotte *et al.*, 1991). Il pourrait en être de même pour les glycosides de stéviol dans le cas des feuilles de Stévia.

L'extraction aqueuse de feuilles fraîches entières de Stévia sous agitation magnétique (600 tr/min) avec un facteur de dilution élevé (L/S = 70), à 25°C n'a pas permis d'observer l'apparition des glycosides de stéviol dans l'extrait. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce phénomène :

- soit l'eau n'a pas pu pénétrer dans la feuille à cause de la barrière hydrophobe que constitue la cuticule, de la couche limite formée par les trichomes à la surface, ou de la fermeture des stomates (Chapitre I Partie I.1.6.1),

- Soit les membranes sont effectivement imperméables aux glycosides de stéviol.

Une augmentation de la température d'extraction à 60°C, dans les mêmes conditions, permet de limiter ces effets de barrières, autorisant la libération progressive et relativement lente des glycosides (Figure II-15 et Figure II-16). Outre le fait qu'elle favorise le gonflement par l'eau de la matière végétale, l'élévation de la température est connue pour modifier les structures élémentaires (éclatement des vacuoles, déstructuration des protéines, solubilisation des phospholipides membranaires, gonflement des fibres, *etc*. (Teo *et al.*, 2010 ; Pardo-Rueda *et al.*, 2015))

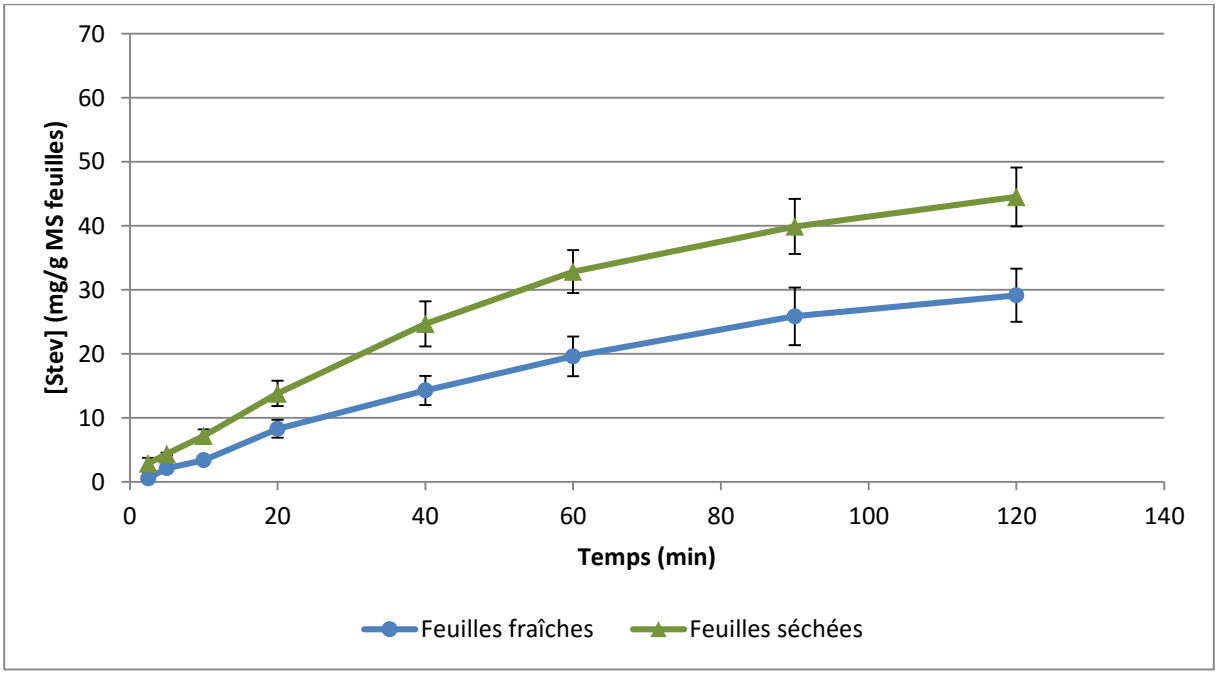


Figure II-15 Influence du séchage des feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Toulouse) sur la cinétique d'extraction du stévioside (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, L/S = 70, n = 3)

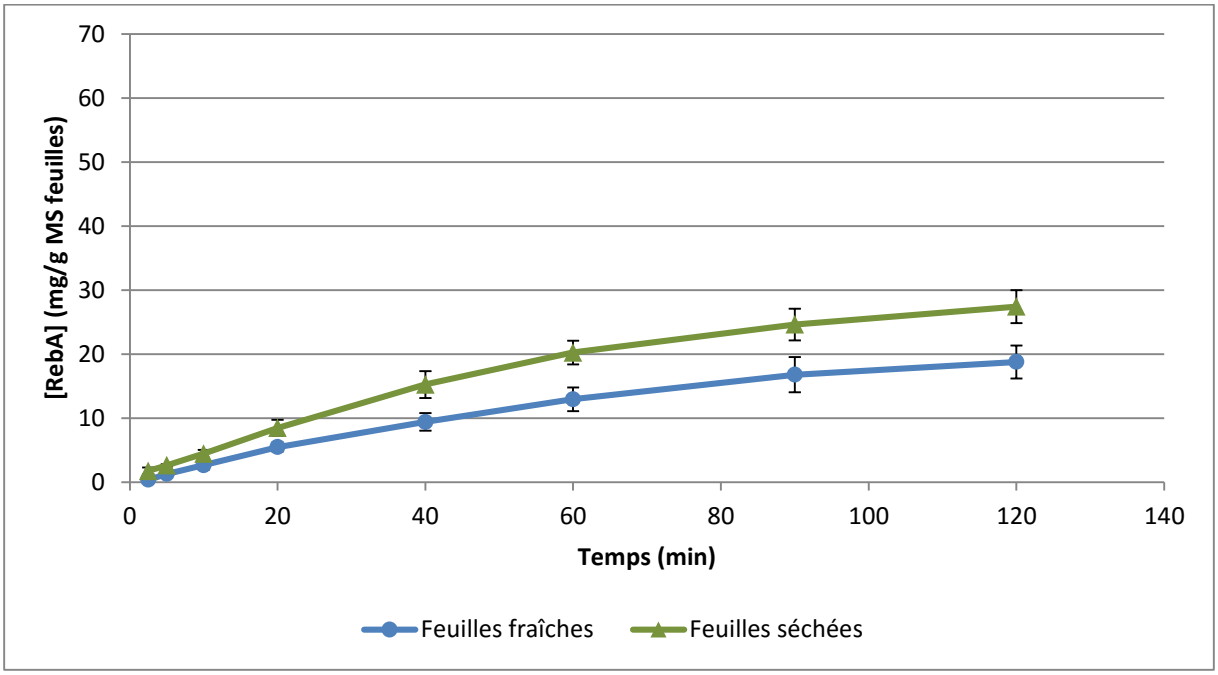


Figure II-16 Influence du séchage des feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Toulouse) sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, L/S = 70, n = 3)

De façon analogue, le séchage des feuilles fraîches de Stévia (à 40°C jusqu'à masse constante) préalablement à l'extraction favorise nettement l'extraction des glycosides de stéviol, qui devient plus rapide et efficace (Figure II-15 et Figure II-16). Bien que Periche *et al.* (2015b) aient obtenus des rendements en stévioside par extraction assistée aux ultrasons avec un solvant éthanol-eau plus élevés à partir de feuilles fraîches qu'à partir de feuilles séchées (lyophilisation pendant 24h, séchage à 100 et 180 °C pendant 3 min, ou à l'ombre à 20°C pendant 30 jours), aucune différence significative n'est observée pour les rendements en rébaudioside A. Ces résultats apportent plus d'indication sur l'effet des ultrasons sur le rendement d'extraction (1 min à 50°C sur feuilles broyées) que sur l'effet du séchage sur la cinétique de l'extraction.

L'effet du séchage des feuilles est confirmé dans le cas des feuilles en provenance du Paraguay. Rappelons que les plantes sont séchées au champ après récolte, et préalablement à la séparation des feuilles, et que leur humidité est alors voisine de 8%. L'extraction aqueuse des glycosides de stéviol, menée à 25°C sous agitation avec un *ratio* L/S de 44, est efficace avec un équilibre atteint au bout d'une heure (Figure II-17 et Figure II-18), ce qui n'était absolument pas le cas pour les feuilles fraîches. De même, l'élévation de la température d'extraction à 60°C accélère nettement l'extraction (Figure II-17 et Figure II-18) par comparaison à la cinétique relativement lente observée pour les feuilles fraîches (Figure II-15 et Figure II-16) et ce malgré un *ratio* liquide/solide plus faible (respectivement 44 et 70). Ces résultats sont en accord avec ceux de Das *et al.* (2014) et de Rai *et al.* (2012) qui ont travaillé respectivement sur l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia du rébaudioside A et du stévioside. Bien que la différence de granulométrie des feuilles séchées compactées du Paraguay et des feuilles fraîches entières séchées de Toulouse puisse aussi contribuer à l'écart entre les cinétiques à 60°C, il n'en

demeure pas moins que le séchage préalable de la matière a un effet très important sur la diffusion des glycosides à travers les membranes et parois cellulaires.

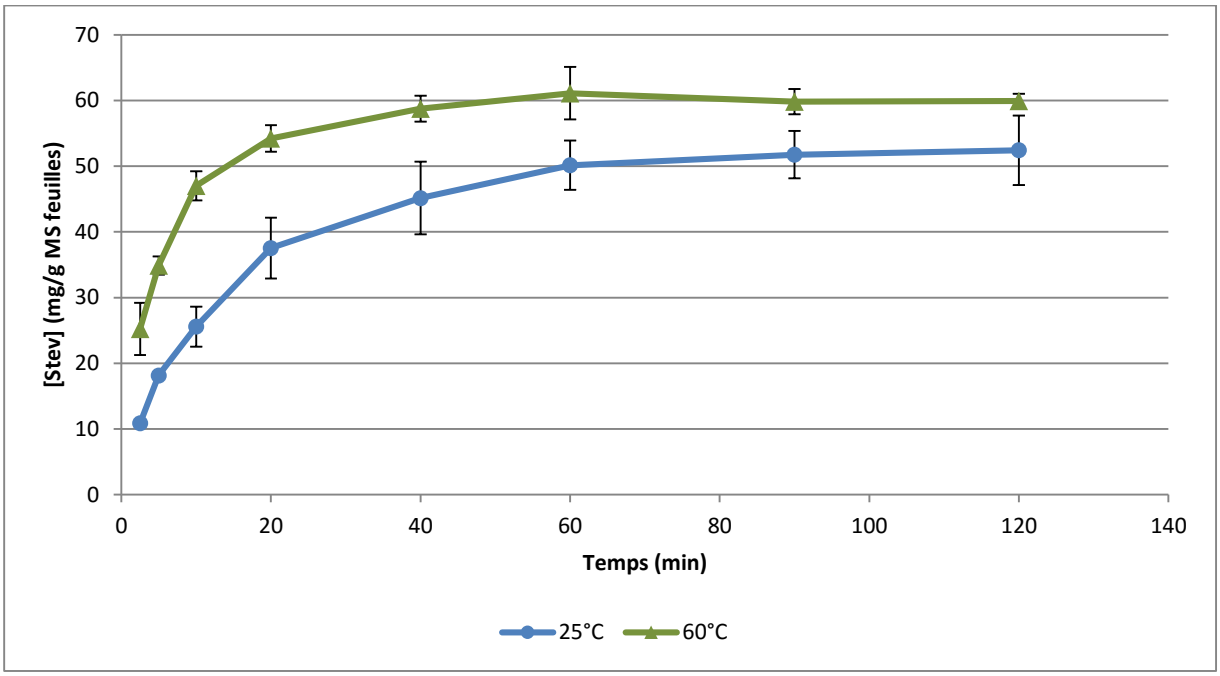


Figure II-17 Influence de la température sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (600 tr/min, L/S = 44, n = 3)

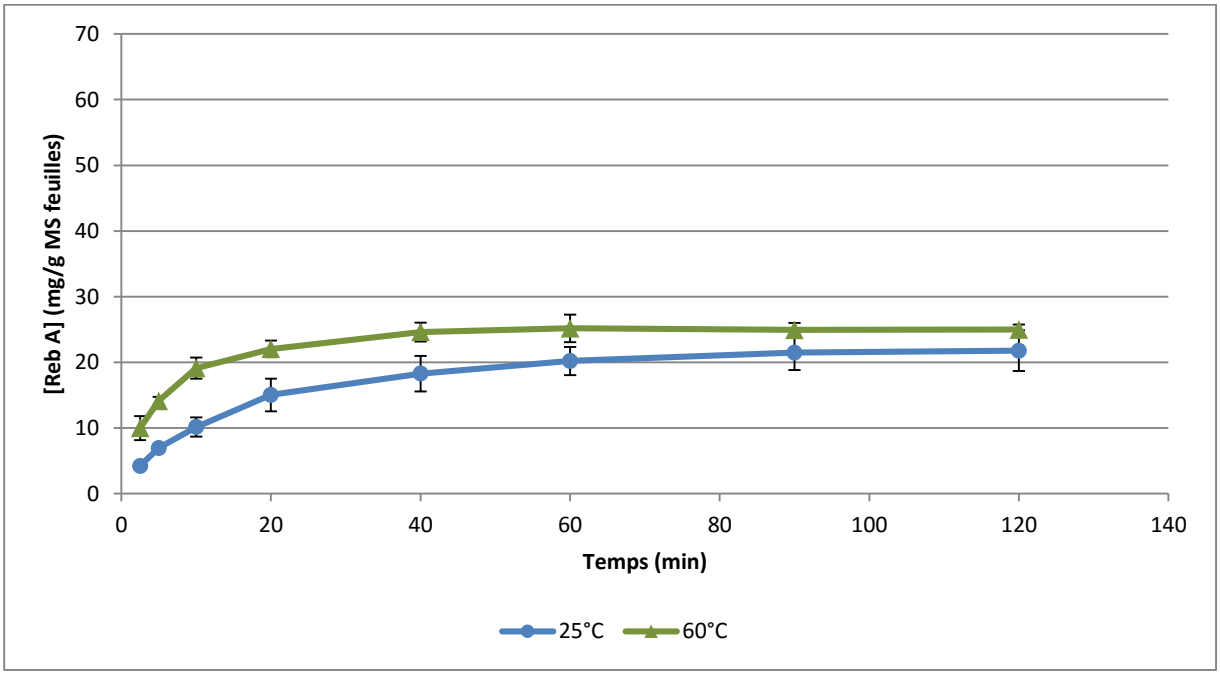


Figure II-18 Influence de la température sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (600 tr/min, L/S = 44, n = 3)

Les feuilles fraîches de Stévia contiennent environ 75% d'eau. Après séchage, elles n'en contiennent plus que 8%. Cette déshydratation ne laisse (pratiquement) pas d'eau libre dans les structures cellulaires, provoquant la précipitation des solutés dans les vacuoles et le cytoplasme, la rétractation des membranes voire leur coagulation, des assemblages pariétaux et des liants intercellulaires (Karunasena *et al.*, 2015). Les contraintes mécaniques qui en résultent se traduisent probablement par l'apparition de fissures dans les membranes, dont la taille pourrait s'amplifier lors de l'extraction avec la pénétration de l'eau et le gonflement de la matière.

Pour confirmer cette déstructuration de la matière végétale, nous avons effectué des observations au microscope électronique à balayage sur des feuilles fraîches et séchées de Stévia. Comme le montre la Figure II-19, il y a un changement radical de la structure de la feuille après séchage. La déshydratation a bel et bien provoqué la rétractation des cellules. Cependant ces observations ne peuvent pas attester de la dégradation des parois et/ou des membranes cellulaires. C'est pourquoi nous avons poursuivi nos observations avec un microscope confocal à balayage laser (Figure II-20) qui nous a permis de visualiser l'intérieur des feuilles de Stévia. Pour les feuilles fraîches, les vacuoles des cellules sont turgescentes et plaquent les chloroplastes contre les parois cellulaires, alors que pour les feuilles séchées il y a une désorganisation des chloroplastes à l'intérieur des cellules, synonyme d'une dégradation des membranes cellulaires. Ainsi le séchage des feuilles de Stévia engendre une déstructuration de la matière végétale, la rendant fragile et friable, ainsi que la dégradation des membranes cellulaires.

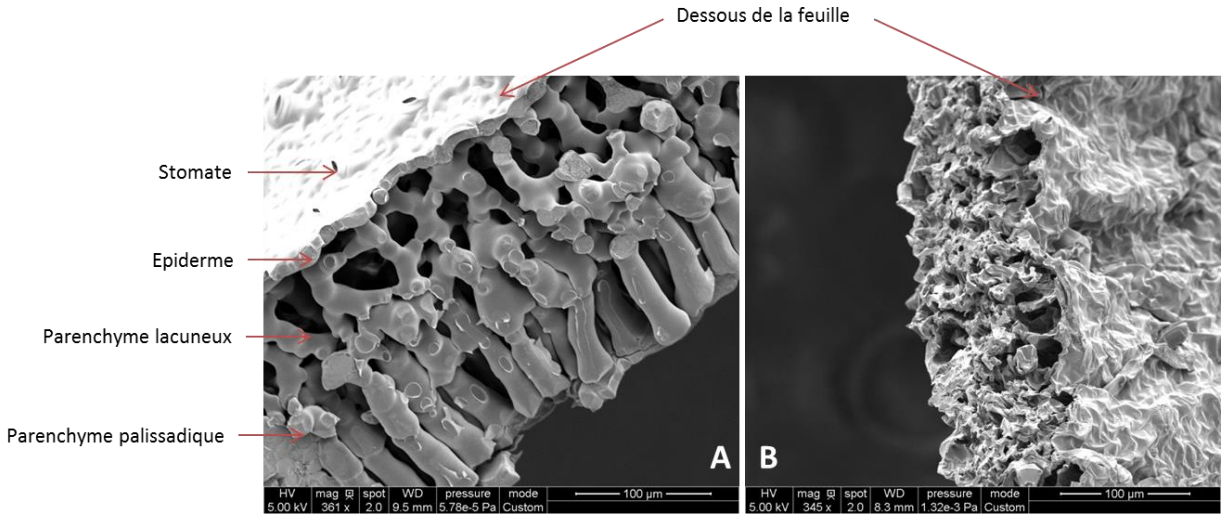


Figure II-19 Effet du séchage sur la structure des feuilles de Stévia. Observation réalisées au microscope électronique à balayage (Ultracut E, Leica) sur des feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Toulouse) fraîches (A) et séchées (B).

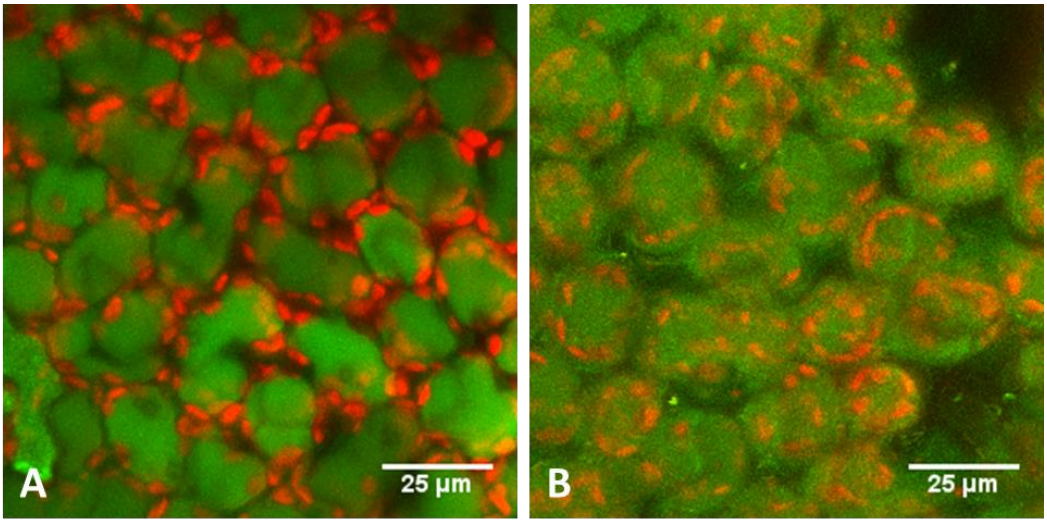


Figure II-20 Effet du séchage sur les membranes des cellules parenchymateuses des feuilles de Stévia. Observations réalisées au microscope confocal à balayage laser (TCS SP2-SE, Leica) sur des feuilles de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) fraîches (A) et séchées (B). Les constituants qui émettent une couleur verte sont principalement des composés phénoliques alors que ceux qui émettent une couleur rouge sont des chloroplastes.

Dans ces conditions, il apparait raisonnable de représenter l'extraction des feuilles séchées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) comme résultant essentiellement d'une diffusion de l'eau et des glycosides de stéviol dans un solide poreux considéré comme homogène.

II.2.2 Modélisation de la cinétique d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol dans les feuilles de Stévia séchées du Paraguay

Bien que, du fait de leur faible densité, les feuilles séchées et compactées du Paraguay aient une tendance à flotter à la surface de l'eau (Figure II-21), leur dispersion dans ce solvant peut être aisément obtenue sous agitation, et leur imbibition avoir lieu après quelques minutes de temps de contact. La teneur en eau élevée de la matière après séparation solide-liquide (environ 75 %, Partie II.1.2, Tableau II-6) est un indicateur de son affinité pour l'eau. Il apparait donc raisonnable de considérer que l'étape de pénétration de l'eau dans le solide n'est pas limitante par rapport aux autres étapes.



Figure II-21 Photographie de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) à l'introduction dans l'eau

Par ailleurs, le stévioside et le rébaudioside A sont des molécules fortement hydroxylées par la présence de motifs glucopyranoses (Figure II-22), ce qui assure leur affinité pour l'eau, même si les solubilités relevées dans la littérature sont relativement faibles (1,25 g/L pour le stévioside et 8,0 g/L pour le rébaudioside A (Geuns, 2010 ; Ceunen et Geuns, 2013a)). La saturation et la solubilisation dans l'eau de ces composés devrait ainsi ne pas être une étape limitante de la cinétique d'extraction.

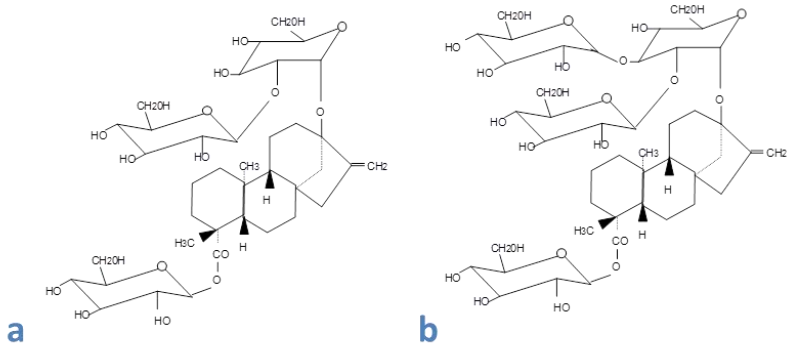


Figure II-22 Structures chimiques du stévioside (a) et du rébaudioside A (b)

Dans ces conditions, la diffusion des solutés dans le solide, qui est en quelque sorte le chemin inverse que l'eau a emprunté pour pénétrer dans la matière végétale, et la diffusion des solutés de l'interface solide-liquide vers le liquide, qui apparait dans le cas d'une couche de liquide immobile formée à l'interface solide, sont les processus de transfert de matière qui régissent la cinétique d'extraction. La formation d'une couche de solvant autour du solide pourra cependant être limitée par une agitation efficace du milieu, et la résistance au transfert à l'interface solide-liquide sera alors considérée comme négligeable.

II.2.2.1 Equation du transfert de matière

Dans ces conditions, et aux hypothèses suivantes :

- les particules sont sous trois formes possibles : plane, cylindrique ou sphérique (Figure II-23),
- la diffusion est unidirectionnelle. Elle a lieu dans la direction transversale de la particule,
- chaque particule est un milieu pseudo-homogène,
- l'influence de la taille des particules sur le coefficient de diffusion est négligeable,
- le coefficient de diffusion est constant au cours de l'expérience. La concentration du soluté dans le solide ne dépend que de la position et du temps,
- le solvant dans le réacteur batch est suffisamment agité pour que la résistance au transfert à l'interface solide-liquide soit négligeable. La concentration du soluté en phase liquide ne dépend que du temps,
- il n'y a pas de réaction chimique,

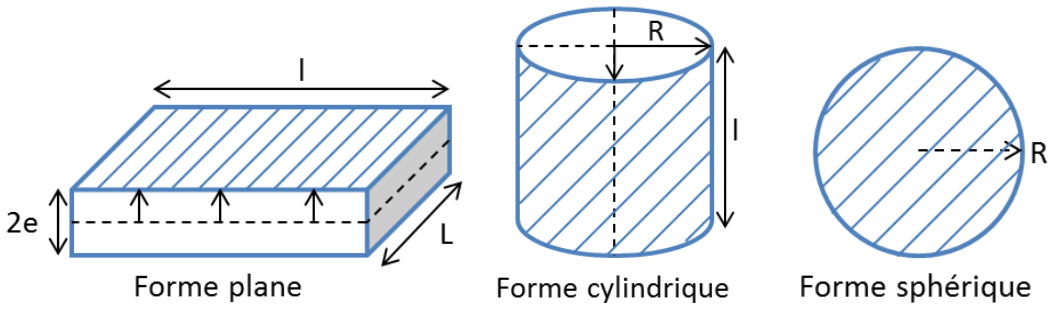


Figure II-23 Formes géométriques des particules (l = longueur, L = largeur, e = demi-épaisseur, R = rayon, ▨ = surface de diffusion)

le transfert de matière à l'intérieur d'une particule solide peut être décrit par la seconde loi de Fick :

$$\frac{\partial C(t,x)}{\partial t} = D_{eff}\,\frac{1}{x^{\varphi-1}}\,\frac{\partial}{\partial x}\left(x^{\varphi-1}\,\frac{\partial C(t,x)}{\partial x}\right) \qquad \text{Equation (1)}$$

où :

- t est la durée,
- x la distance radiale dans la direction du transfert de matière,
- C la concentration du soluté dans le solide,
- D_{eff} le coefficient de diffusion moléculaire apparent du soluté,
- φ le facteur de forme (φ = 1, 2 ou 3 respectivement pour une forme plane, un cylindre infini ou une sphère),

et les conditions aux limites suivantes :

- **CL1** : A l' instant initial (*i.e.* t = 0) le soluté est réparti de façon uniforme dans les particules de solide, ainsi la concentration en soluté :
  - dans le liquide est nulle : $C_{sL} = 0$,
  - dans les particules est égale à une concentration initiale : $C_{sS} = C_{s0}$,
- **CL2** : Au centre de la particule (x = 0) : $\frac{\partial C}{\partial x} = 0 \; \forall t$,
- **CL3** : A l'interface (x = e ou x = R) il y a égalité des flux :
  - Le flux sortant du solide s'écrit : $F = -D_{eff} A \left(\frac{\partial C(t,x)}{\partial x}\right)_{x=e \; ou \; R}$
  - Le flux entrant dans le liquide s'écrit : $F = V_L \frac{dC_{sL}(t)}{dt}$

    où V_L est le volume de solvant et A l'aire spécifique des particules.

    L'égalité des flux s'écrit donc : $\frac{dC_{sL}(t)}{dt} = -D_{eff} \frac{A}{V_L} \left(\frac{\partial C(t,x)}{\partial x}\right)_{x=e \; ou \; R}$

La résolution numérique de l'équation (1) devient possible à partir des données cinétiques d'extraction des feuilles de Stévia.

II.2.2.2 Résolution numérique de l'équation de transfert

La résolution numérique de l'équation de transfert de matière consiste à discrétiser la dimension caractéristique (diamètre ou demi-épaisseur) de la particule solide dans l'espace avec des différences finies de second ordre. Une différence finie de même ordre est utilisée pour les équations des conditions limites. La méthode de Crank-Nicholson sera employée pour son efficacité et sa simplicité d'utilisation. Le coefficient de diffusion sera ajusté pour que la courbe modélisée et les points expérimentaux concordent le mieux.

Dans notre cas nous avons considéré que les feuilles de Stévia séchées et compactées du Paraguay étaient de forme plane carrée ($\varphi = 1$), de côté de 2 mm et de demi-épaisseur de 92 µm.

L'équation (1) devient :

$$\frac{\partial C(t,x)}{\partial t} = D_{eff}\left(\frac{\partial^2 C(t,x)}{\partial x^2}\right) \qquad \text{Equation (2)}$$

L'équation (2) est une équation différentielle linéaire, une méthode numérique de type Cranck-Nicholson a été utilisée :

- La demi-épaisseur est découpée en nx pas Δx
- L'intervalle de temps est découpé en m pas Δt
- I et j sont respectivement les indices de pas de temps t de position x

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{C(i,j) - C(i-1,j)}{\Delta t}$$

$$\frac{\partial C}{\partial x} = \frac{C(i,j) - C(i,j-1)}{\Delta x}$$

$$\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = \frac{C(i-1,j+1) - 2C(i-1,j) + C(i-1,j-1)}{\Delta x^2}$$

Ainsi l'équation (2) devient :

$$C(i,j) = C(i-1,j) + D_{eff}\frac{\Delta t}{\Delta x^2}(C(i-1,+j+1) - 2C(i-1,j) + C(i-1,j-1))$$

Les conditions aux limites deviennent :

- $\boldsymbol{CL1}$: $i = 1 \quad C(1,j) = C_{S0} \quad et \quad C_L = 0 \quad \forall j$
- $\boldsymbol{CL2}$: $j = 2 \quad \frac{C(i,2)-C(i,1)}{\Delta x} = 0 \quad i.e. \quad C(i,1) = C(i,2) \quad \forall i$

Le bilan matière est vérifié à chaque instant :

$$m_{sS} + m_{sL} = m_{s0} \quad \forall t$$

où m_{sS} et m_{sL} sont respectivement la quantité totale de soluté dans le solide et dans le liquide et m_0 la quantité initiale de soluté dans le système.

La quantité initiale de soluté peut aussi s'écrire :

$$m_{s0} = C_{s0} V_S = C_{s0} \frac{m_S}{\rho_S}$$

où V_S est le volume total du solide, m_S la masse totale du solide et ρ_S la masse volumique du solide.

La quantité totale de soluté dans le solide est définie par :

$$m_{sS}(t) = \int C(x,t) dV$$

ainsi pour t=i :

$$m_{SS} = \sum_j \left(\frac{m_S}{\rho_s e} \Delta x \right) C(i,j)$$

Enfin la concentration en soluté dans le liquide s'écrit :

$$C_{sL}(t) = \frac{m_0 - m_{sS}(t)}{V_L}$$

où V_L est le volume total de solvant,

donc :

$$C_{sL}(i) = \frac{1}{V_L} \frac{m_S}{\rho_S} \left[C_{s0} - \frac{\Delta x}{e} \sum_j C(i,j) \right]$$

Le coefficient de diffusion D_{eff} (contenu dans le terme *C(i,j)*) est donc le seul paramètre à identifier en effectuant une méthode de dichotomie grâce à la cinétique expérimentale.

Nous avons utilisé le logiciel Scilab. 5.5.0© pour réaliser la programmation de cette résolution.

La méthode de résolution numérique a été appliquée aux résultats obtenus pour la cinétique d'extraction du stévioside et du rébaudioside A dans des conditions cohérentes avec l'application du modèle de transfert de matière (température de 25°C, sous agitation magnétique (600 tr/min), avec un rapport L/S = 44 : Figure II-24 et Figure II-25). La comparaison des courbes obtenues par le modèle et des courbes expérimentales (Figure II-26 et Figure II-27) illustre la bonne adéquation du modèle de diffusion intraparticulaire et confirme que, dans les conditions opératoires choisies (forte dilution sous

agitation efficace), la cinétique d'extraction est principalement limitée par la diffusion des solutés dans la matrice végétale, en l'absence de contribution significative d'une réaction chimique (les solutés sont présents sous forme libre dans la vacuole), de gonflement de la matière ou de modification de la porosité pendant le processus d'extraction.

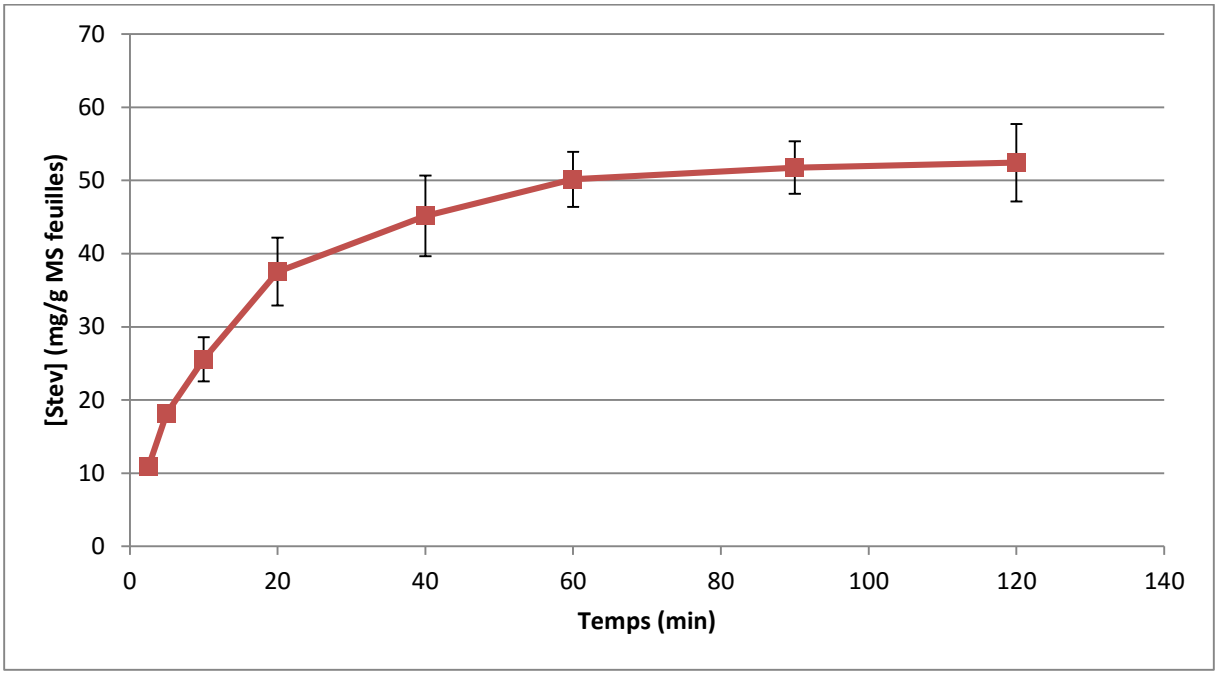


Figure II-24 Evolution expérimentale de la teneur moyenne en stévioside extraite au cours du temps par rapport à la matière sèche de feuilles introduites (feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay), T = 25°C, agitation = 600 tr/min, L/S = 44, n = 3)

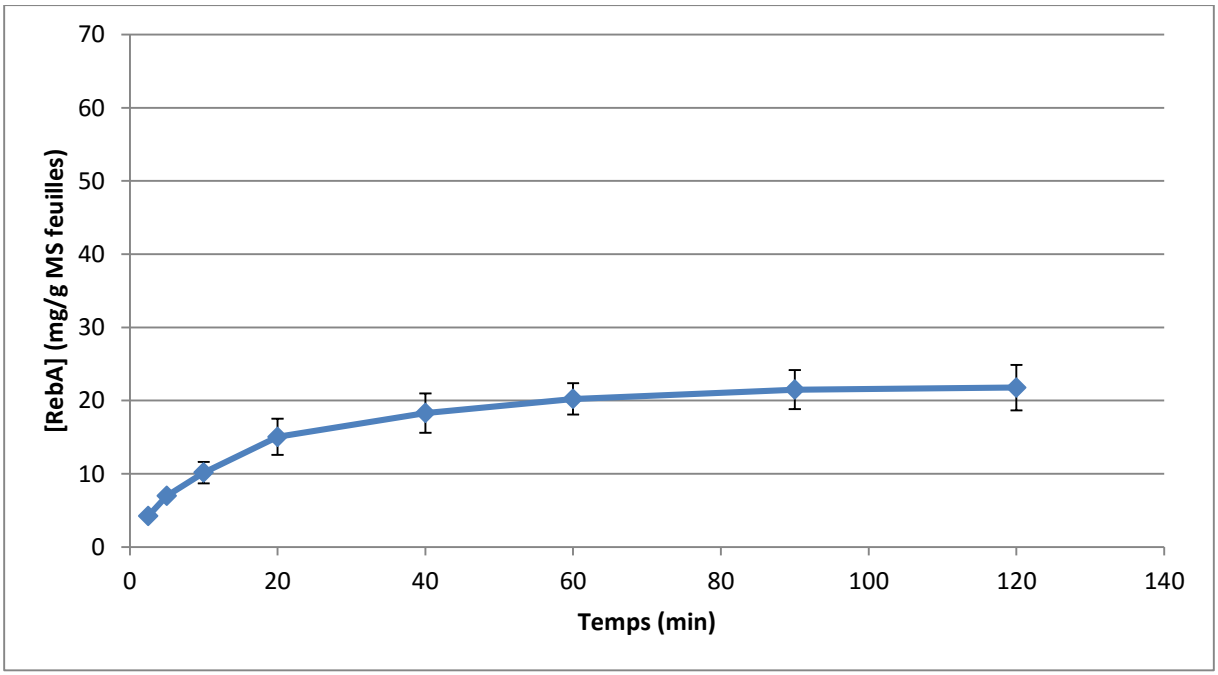


Figure II-25 Evolution expérimentale de la teneur moyenne en rébaudioside A extraite au cours du temps par rapport à la matière sèche de feuilles introduites (feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay), T = 25°C, agitation = 600 tr/min, L/S = 44, n = 3)

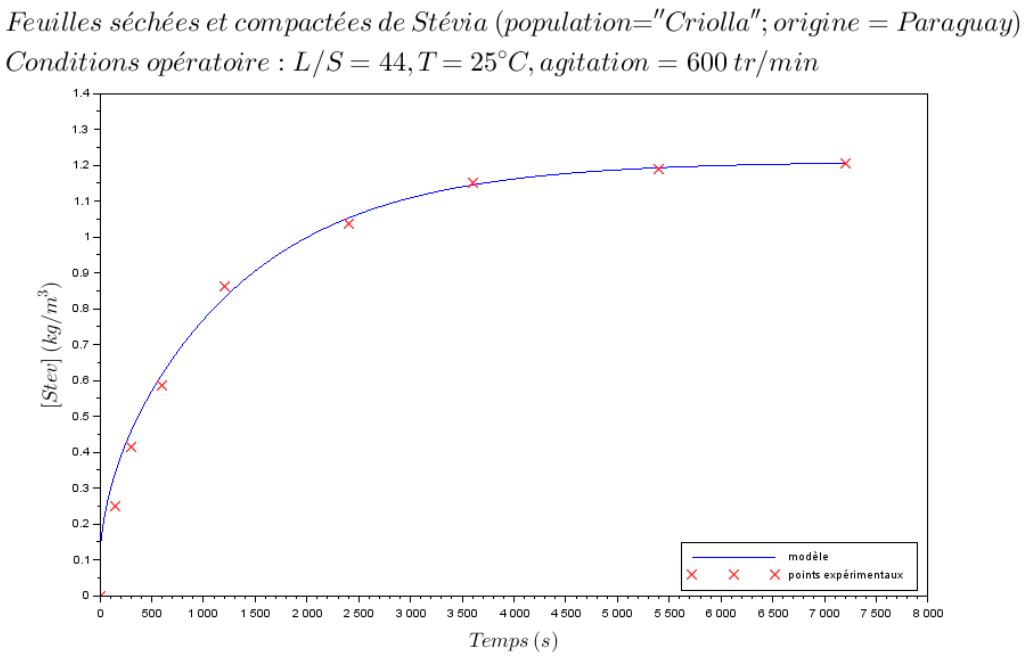


Figure II-26 Comparaison de l'évolution théorique (trait bleu) de la concentration en stévioside dans la phase liquide au cours du temps avec les valeurs expérimentales (croix rouges)

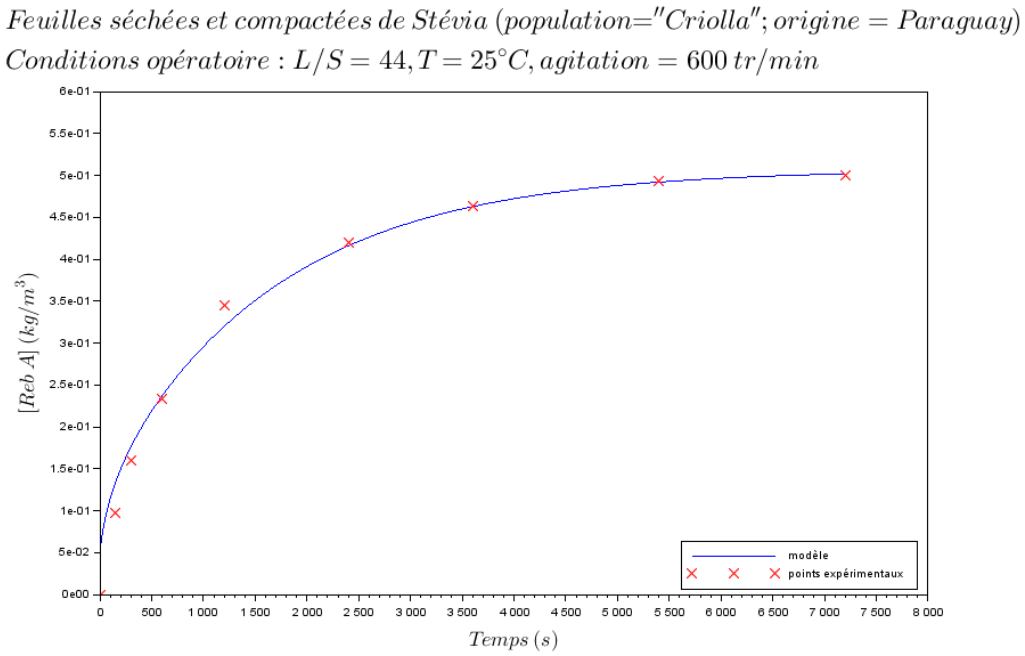


Figure II-27 Comparaison de l'évolution théorique (trait bleu) de la concentration en rébaudioside A dans la phase liquide au cours du temps avec les valeurs expérimentales (croix rouges)

II.2.2.3 Comparaison de l'extraction du stévioside et du rébaudioside A

Que ce soit à 25 ou 60°C, les cinétiques d'extraction du stévioside et du rébaudioside A à partir de feuilles séchées et compactées du Paraguay apparaissent différentes (Figure II-17 et Figure II-18). La comparaison des valeurs des coefficients de diffusion obtenues pour les cinétiques d'extraction à 25°C ou 60°C (Tableau II-7) confirme cette différence. Ces valeurs sont de même ordre de grandeur (entre 10^{-14} et 10^{-11} m²/s) que celles calculées pour d'autres solutés de matière végétales comme l'andrographolide des feuilles et branches d'*Andrographis paniculata* (Wongkittipong *et al.*, 2004), la vindoline et la catharanthine des feuilles de *Catharanthus roseus* (Poirot, 2007) ou encore les hydrosolubles et les lipides des graines de tournesol (Evon, 2008).

Tableau II-7 Valeurs des coefficients de diffusion effectifs du rébaudioside A et du stévioside pour les cinétiques d'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (L/S = 44, agitation = 600 tr/min, T = 25 ou 60°C)

Température	25°C	60°C
	Coefficients de diffusion effectifs (m²/s)	
Rébaudioside A	$(1,80 \pm 0,15).10^{-12}$	$(5,0\pm 0,4).10^{-12}$
Stévioside	$(2,20 \pm 0,15).10^{-12}$	$(6,2 \pm 0,4).10^{-12}$

Le coefficient de diffusion du rébaudioside A est plus petit que celui du stévioside dans tous les cas. La diffusion du rébaudioside A est donc plus lente que celle du stévioside. Plusieurs explications sont possibles :

- l'affinité des solutés avec le solvant est différente. Cependant le rébaudioside A est plus soluble dans l'eau que le stévioside (8,0 g/L pour le rébaudioside A et 1,25 g/L pour le stévioside (Geuns, 2010 ; Ceunen et Geuns, 2013a)) ce qui va à l'encontre de cette hypothèse,
- les solutés sont répartis différemment dans la matrice végétale. Mais d'après la littérature, les deux molécules sont situées au même endroit dans la vacuole des cellules parenchymateuses (Chapitre I Partie I.2.2, Bondarev *et al.*, 2003 ; Brandle et Telmer, 2007 ; Ceunen et Geuns, 2013a),
- les solutés ont des interactions différentes avec la matrice végétale. Dans ce cas l'affinité du rébaudioside A avec la matrice végétale par rapport à celle avec l'eau serait plus forte que pour le stévioside,
- les solutés ont un encombrement stérique différent. Dans cette situation la configuration de la molécule de rébaudioside A serait plus volumineuse que celle du stévioside.

Pour approfondir cette dernière hypothèse, nous avons modélisé les représentations spatiales du stévioside et du rébaudioside A dans leur conformation la plus stable dans l'eau afin de déterminer les dimensions caractéristiques de ces molécules.

Pour ce faire, dans un premier temps nous avons cherché la conformation la plus stable du stévioside et du rébaudioside A, dans le vide, en faisant varier les angles de torsion des molécules, grâce à l'algorithme de mécanique moléculaire MM3 du logiciel SCIGRESS 2.4. Nous avons ensuite affiné ces conformations à l'aide d'une modélisation semi-empirique avec l'algorithme PM7/COSMO du logiciel MOPAC 2009, en simulant l'eau de façon implicite. Puis, nous avons observé ces conformations en représentant l'eau, à 25°C, de façon explicite dans le logiciel VEGAZZ 3.0.5. Enfin, au moyen du logiciel NAMD 2.9, nous avons minimisé l'énergie des systèmes (molécule + eau) pour obtenir la conformation la plus stable du stévioside (Figure II-28a) et du rébaudioside A (Figure II-29a) dans l'eau. Nous avons alors pu suivre l'évolution de la trajectoire de ces molécules dans l'eau à 25°C, pendant 1000 ps, avec une dynamique de Langevin, grâce à l'algorithme CHARMM. Cela nous a permis d'obtenir l'évolution du volume occupé par le stévioside et le rébaudioside A (Figure II-30) au cours du temps dans l'eau à 25°C.

Le stévioside a une forme allongée et dépliée tandis que le rébaudioside A est replié sur lui-même en forme sphérique. Le stévioside a donc deux dimensions caractéristiques principales, une longueur et une largeur, qui ont une valeur d'environ 10 Å et 20 Å. Le rébaudioside A, quant à lui, possède une seule dimension caractéristique principale, un diamètre, évalué à environ 14 Å. Ainsi, comme la plus petite dimension caractéristique du stévioside (10 Å) est plus petite que celle du rebaudioside A (14 Å), le stévioside pourrait passer au travers de pores de taille inférieure à ceux accessibles au rébaudioside A. De plus le volume moyen, dans l'eau à 25°C, occupé par le stévioside (environ 639 $Å^3$, Figure II-30) est plus petit que celui du rébaudioside A (environ 767 $Å^3$, Figure II-30), il semble donc logique que le flux de molécules de stévioside puisse être plus élevé que celui du rébaudioside A lors de leur extraction.

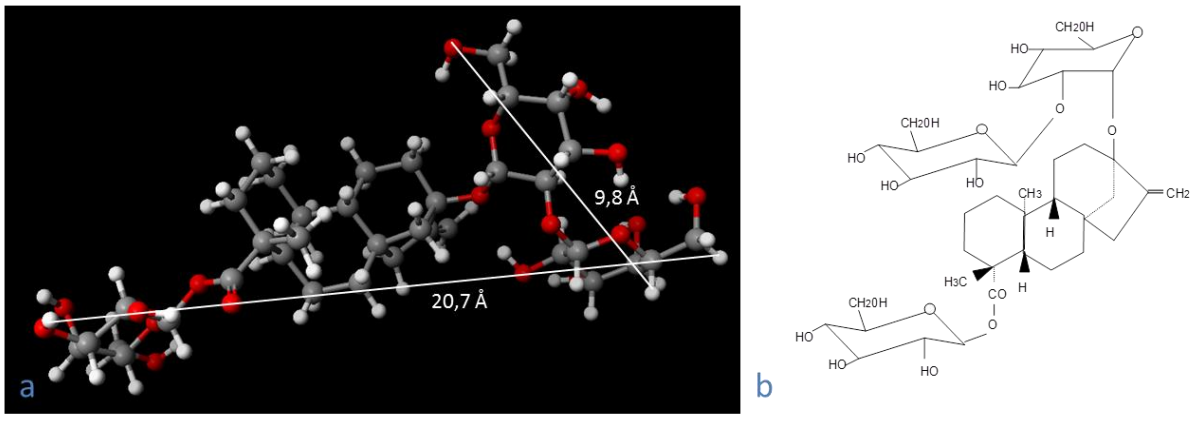


Figure II-28 (a) Représentation de la conformation stabilisée dans l'eau de la molécule de stévioside avec le logiciel MOPAC 2009 (sphère rouge = atome d'oxygène, sphère blanche = atome d'hydrogène et sphère grise = atome de carbone), (b) formule topologique du stévioside

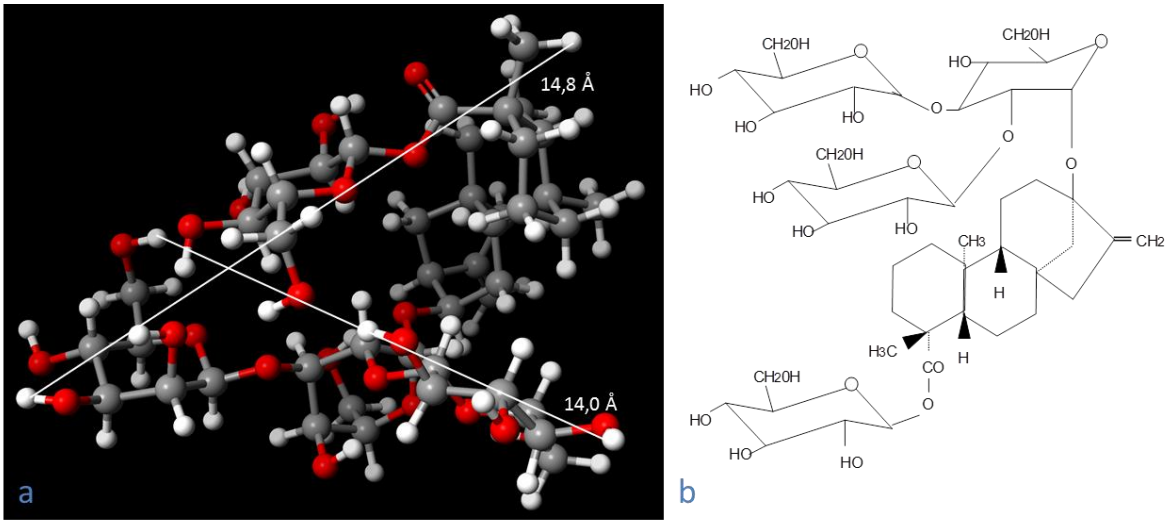


Figure II-29 (a) Représentation de la conformation stabilisée dans l'eau de la molécule de rébaudioside A avec le logiciel MOPAC 2009 (sphère rouge = atome d'oxygène, sphère blanche = atome d'hydrogène et sphère grise = atome de carbone), (b)formule topologique du rébaudioside A

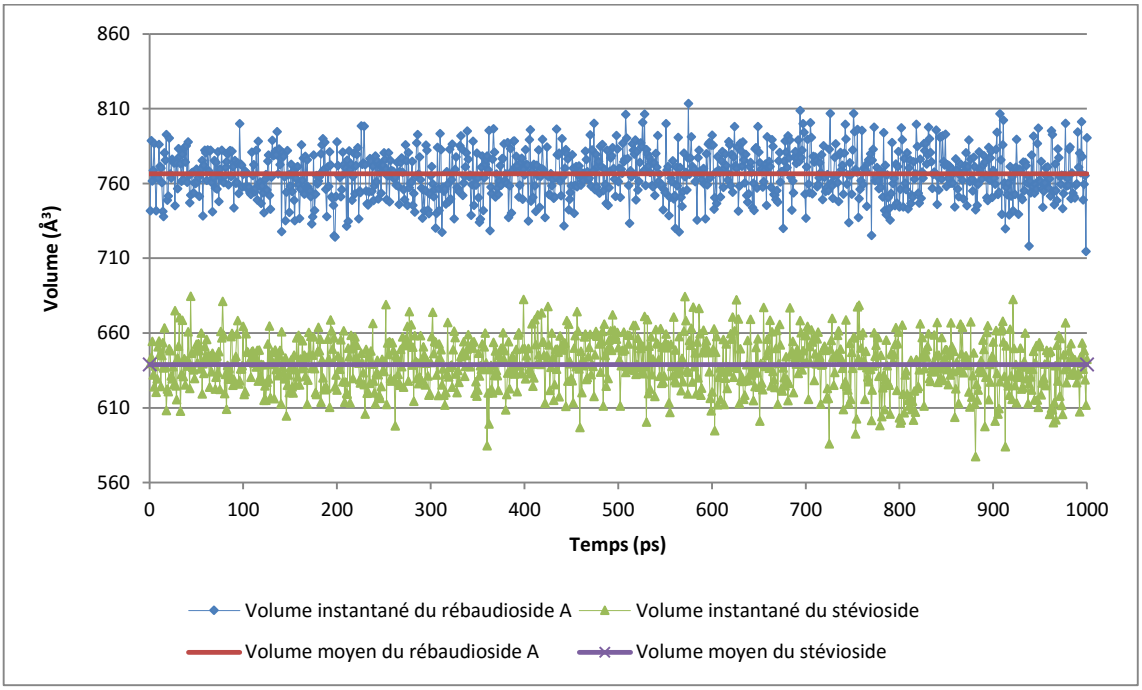


Figure II-30 Evolution du volume occupé par une molécule de stévioside et de rébaudioside A, dans l'eau à 25°C

En conclusion, le rébaudioside A serait extrait moins rapidement que le stévioside à cause d'une affinité différente avec la matrice végétale et/ou un encombrement stérique plus important. Remarquons cependant que cette différence est peu sensible quant à son effet sur le temps de contact nécessaire pour atteindre le maximum d'extraction, voisine de 1h à 25°C.

Ainsi, un premier étage d'un procédé d'extraction des glycosides de stéviol peut être défini :

- A partir des feuilles séchées de Stévia du Paraguay à la granulométrie correspondant à leur compactage,
- Dans un contacteur batch agité, à 25°C avec un rapport liquide-solide de 44.

Dans ces conditions 5,2 g de stévioside et 2,1 g de rébaudioside A pour 100 g de feuilles sèches seront extraits en une heure, correspondant à 87 % de la teneur en glycosides de stéviol dosés dans les feuilles (Chapitre II Partie II.1.1.2.9). Cependant, de telles conditions, avantageuses pour la simplicité de conception (pas de prétraitement des feuilles outre le séchage et le compactage, réacteur batch agité en cascade pour un recyclage des extraits et en parallèle pour un fonctionnement d'installation en continu, pas ou peu de chauffage), risquent d'être pénalisées par les coûts liés à la forte dilution du milieu (concentration en glycosides de stéviol inférieure à 1,7 g/L en sortie de l'extracteur), au volume utile de l'extracteur nécessaire et à l'énergie mécanique pour l'agitation efficace du milieu.

L'étude de l'influence des principaux facteurs sur les cinétiques d'extraction des glycosides de stéviol va nous permettre d'améliorer ces conditions.

II.3 Influence des principaux facteurs sur l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol

II.3.1 Effet de l'agitation et de la dilution

La modélisation des cinétiques d'extraction des glycosides de stéviol à partir des feuilles entières séchées et compactées de Stévia du Paraguay, comme résultant essentiellement d'une diffusion intraparticulaire des solutés, satisfaisant à la seconde loi de Fick, repose sur l'hypothèse de l'absence d'une limitation diffusionnelle à l'interface solide-liquide. Cette hypothèse est confirmée dans des conditions opératoires de forte agitation du milieu (600 tr/min) et d'une dilution élevée par le solvant d'extraction (L/S = 44). Cependant, les résultats obtenus pour une extraction même en l'absence d'agitation (macération simple, Figure II-31 et Figure II-32) ou de plus faible dilution (L/S = 22, Figure II-33 et Figure II-34) pourraient remettre en cause la validité de cette hypothèse : dans les deux cas, la cinétique d'extraction est nettement ralentie et l'équilibre d'extraction est atteint pour des valeurs plus faibles de rendement :

- dans le cas de l'absence d'agitation, à forte dilution (L/S = 44), l'évolution de la courbe cinétique plaide effectivement en faveur d'une limitation de la diffusion par formation d'une couche limite à l'interface solide-liquide : le transfert de matière est plus lent qu'avec agitation, mais l'extraction se poursuit au-delà d'une heure de temps de contact. L'agitation accélère l'extraction des feuilles séchées et compactées, mais en conditions de macération simple, avec un facteur de dilution élevé, l'extraction ne semble pas bloquée, même si elle nécessite des temps de contact beaucoup plus élevés,

- dans le cas d'un facteur de dilution deux fois plus faible (L/S = 22), l'extraction est plus lente, mais l'équilibre obtenu pour une valeur plus faible de rendement qu'à *ratio* L/S de 44, est cependant atteint pour des temps de contact équivalents. La forte agitation du milieu limite la formation d'une couche interfaciale, mais la diffusion intraparticulaire serait surtout limitée par la solubilité des glycosides de stéviol.

Ainsi, dans le cas des feuilles séchées et compactées, l'agitation du milieu associée à une dilution élevée seront nécessaires pour minimiser les temps de contact et atteindre des rendements maximaux. L'impact de ces deux facteurs est cependant nettement amoindri par un broyage préalable des feuilles.

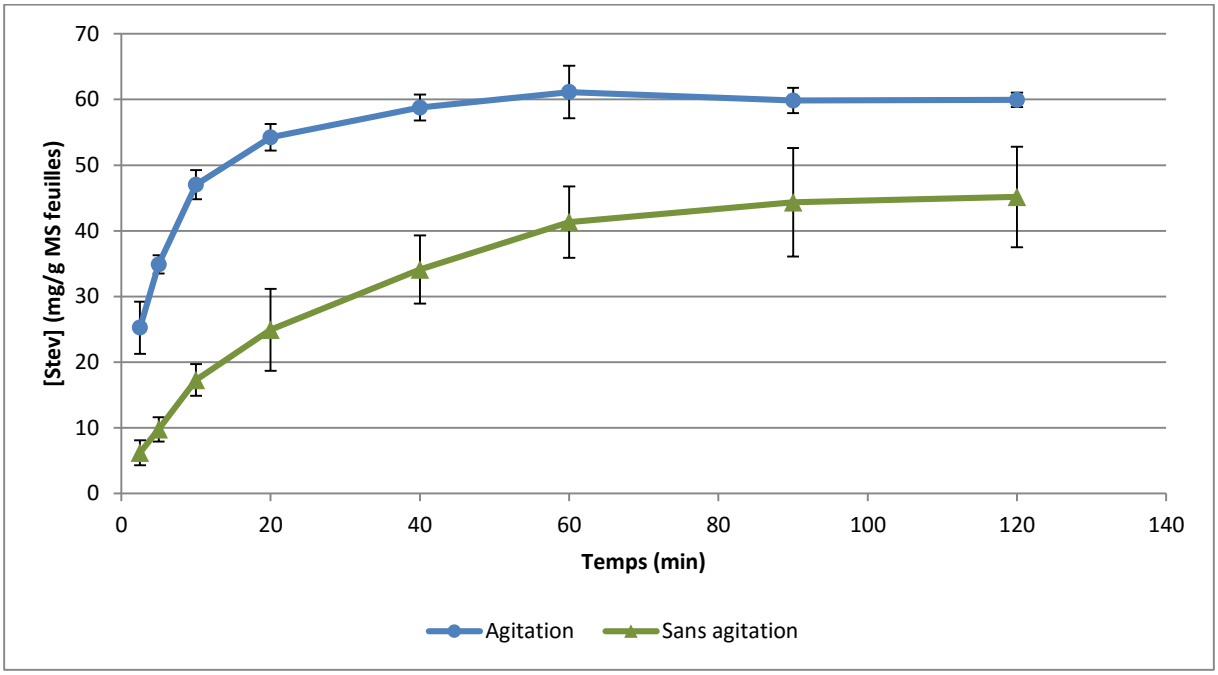


Figure II-31 Influence de l'agitation (600 tr/min) sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, L/S = 44, n = 3)

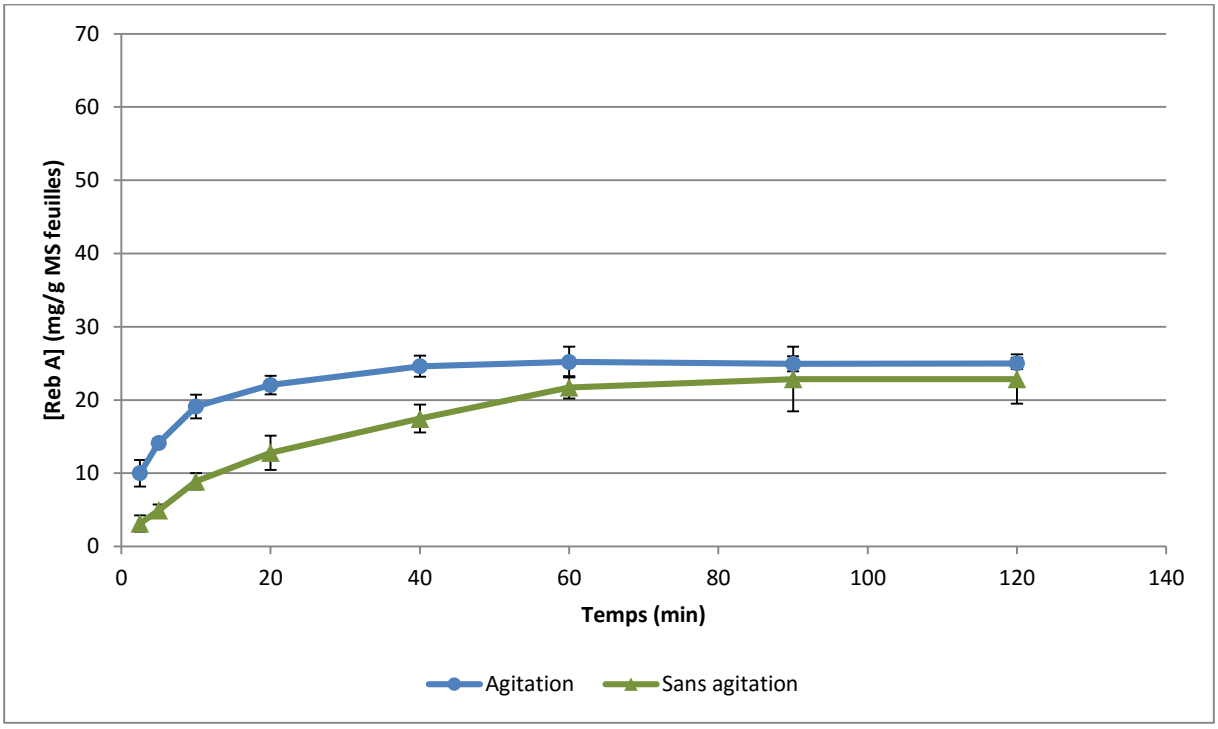


Figure II-32 Influence de l'agitation (600 tr/min) sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, L/S = 44, n = 3)

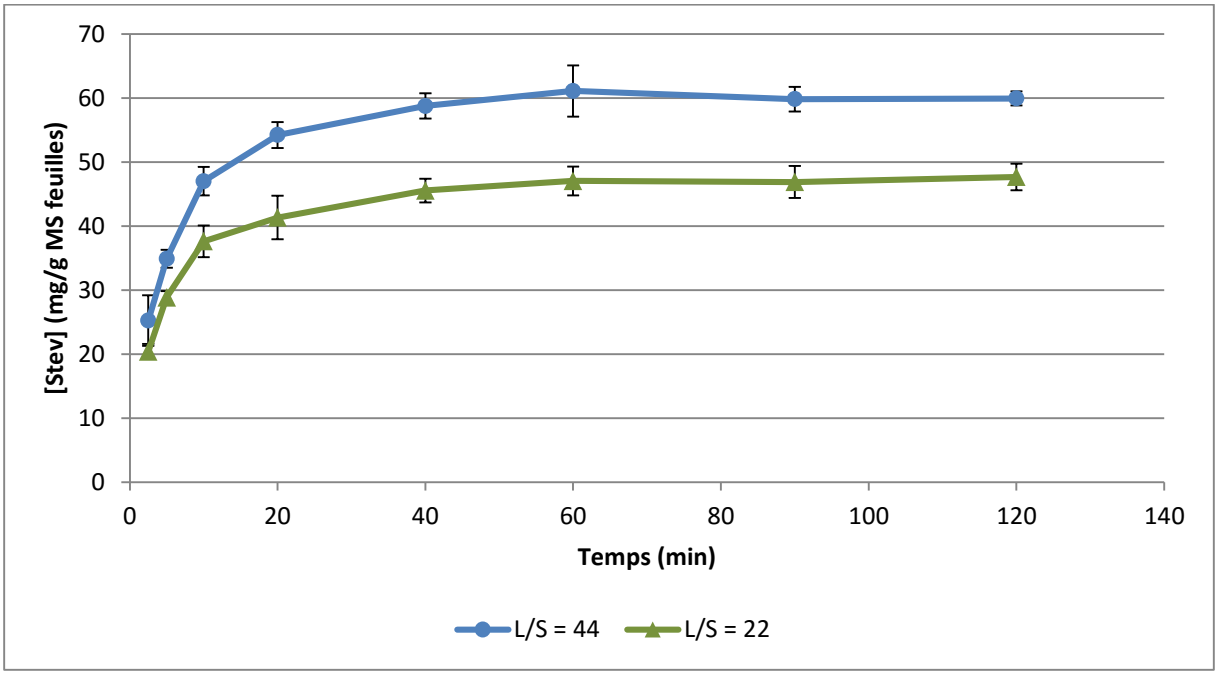


Figure II-33 Influence du *ratio* liquide-solide sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, n = 3)

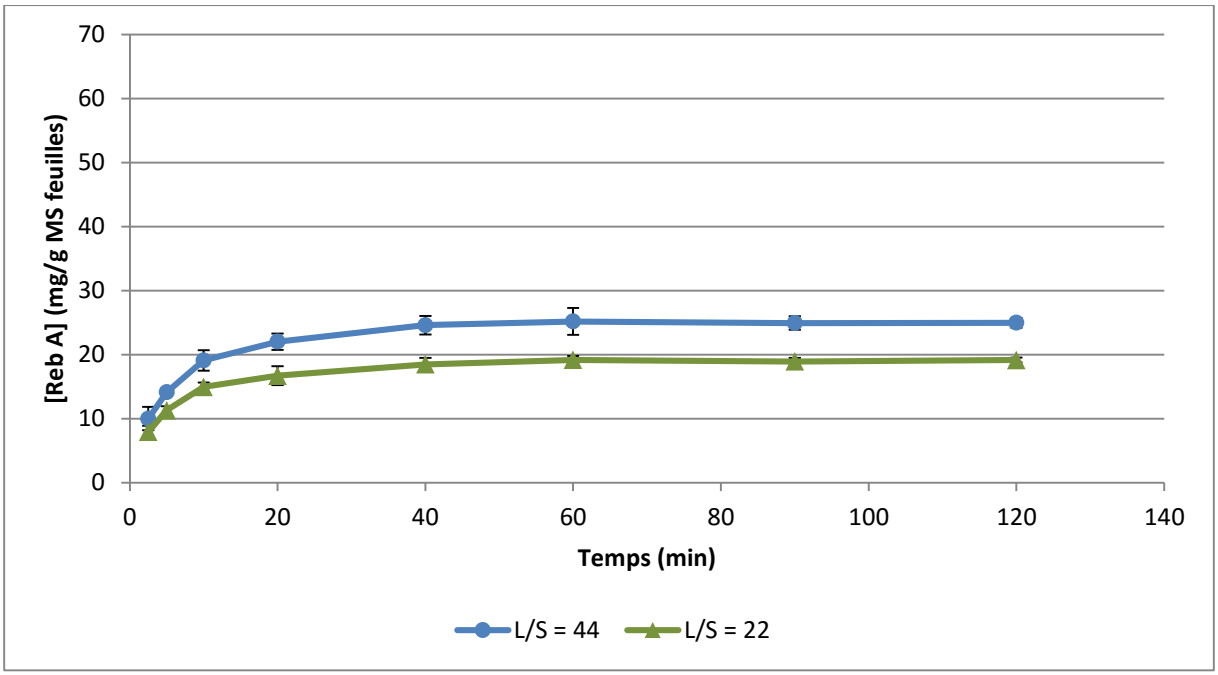


Figure II-34 Influence du *ratio* liquide-solide sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et compactées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, n = 3)

II.3.2 Effet du broyage

L'effet d'un broyage des feuilles fraîches de Stévia pré-séchées puis broyées au broyeur à couteaux équipé d'une grille de refus de 1 mm est considérable (Figure II-35 et Figure II-36) : l'équilibre d'extraction, sous forte agitation et avec un *ratio* liquide-solide très élevé (L/S = 70), à 60°C, est atteint en quelques minutes avec les feuilles broyées alors qu'il n'est même pas atteint au bout de 2 h avec les feuilles entières. Outre la réduction de la taille des particules (95 % < 800 µm), classiquement favorable à la cinétique de diffusion intraparticulaire, le broyage contribue à déstructurer les tissus cellulaires de surfaces des feuilles, rendant ces dernières alors plus perméables à l'eau (Sovová *et al.*, 1994; Herzi, 2013).

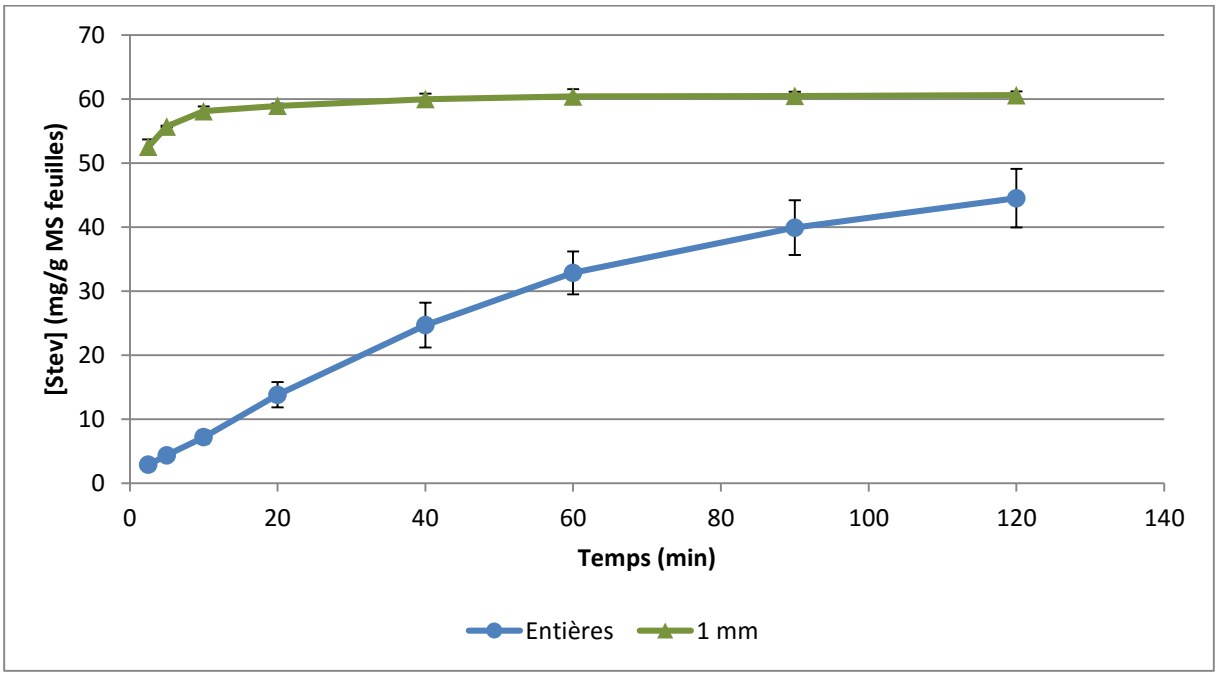


Figure II-35 Influence du broyage des feuilles séchées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Toulouse) sur la cinétique d'extraction du stévioside (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, L/S = 70, n = 3)

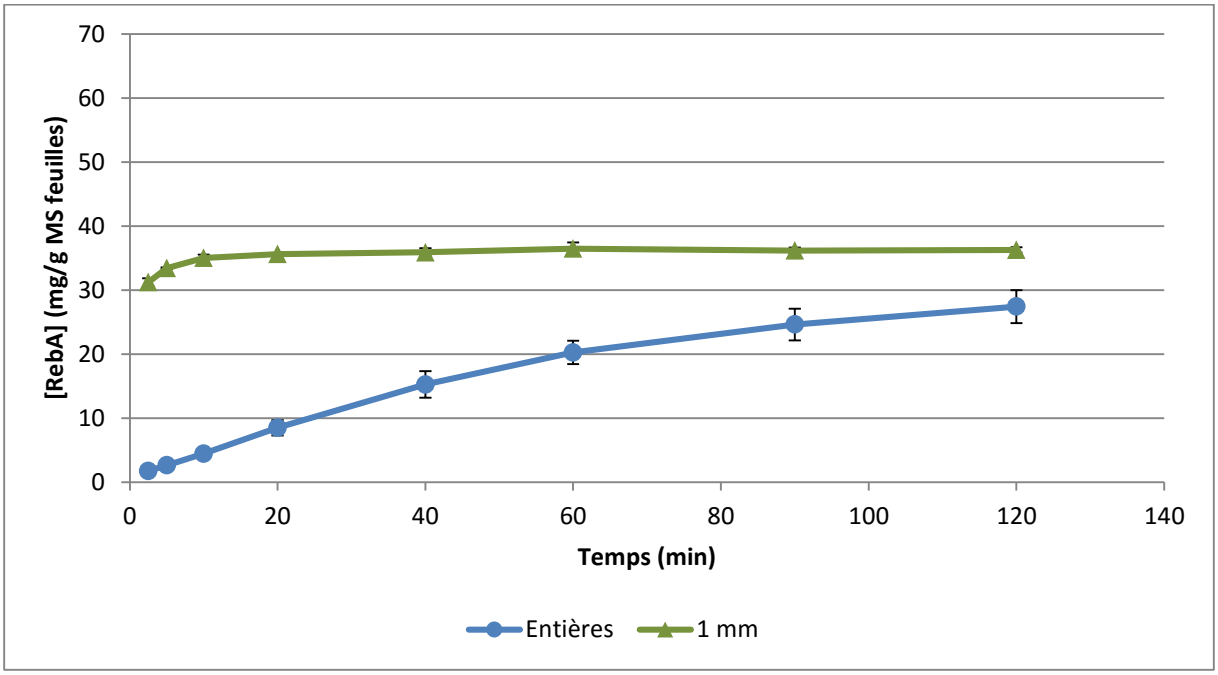


Figure II-36 Influence du broyage des feuilles séchées de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Toulouse) sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, L/S = 70, n = 3)

Dans le cas des feuilles séchées et compactées du Paraguay, l'effet d'une réduction de la taille est net, bien que moins spectaculaire que dans le cas des feuilles entières. Cette différence peut être attribuée au fait que le compactage des feuilles séchées du Paraguay génère déjà des particules de plus petite taille qui ne sont pas présentes dans les feuilles fraîches séchées.

A 25°C, sous forte agitation et dilution (L/S = 44), la cinétique de diffusion intraparticulaire est près de trois fois plus rapide avec les feuilles broyées avec une grille de refus de 1 mm, pour des rendements au maximum légèrement plus élevés pour les deux glycosides de stéviol (Figure II-17, Figure II-18, Figure II-37 et Figure II-38). Il en est de même pour une augmentation de la température à 60°C, qui augmente les coefficients de diffusion du stévioside et du rébaudioside A, et permet d'atteindre l'équilibre d'extraction en près de 10 minutes de temps de contact pour les feuilles séchées et broyées, alors qu'il n'était atteint qu'au bout de 40 minutes pour les feuilles séchées et compactées (Figure II-17, Figure II-18, Figure II-37 et Figure II-38).

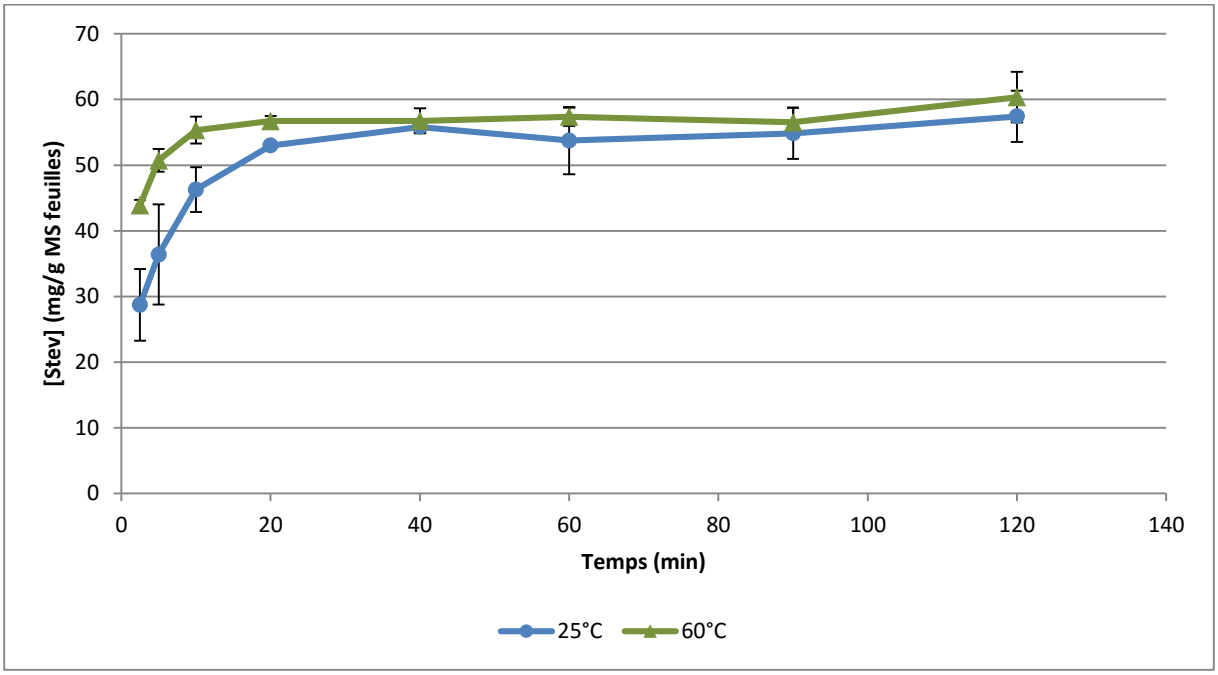


Figure II-37 Influence de la température sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (agitation = 600 tr/min, L/S = 44, n = 3)

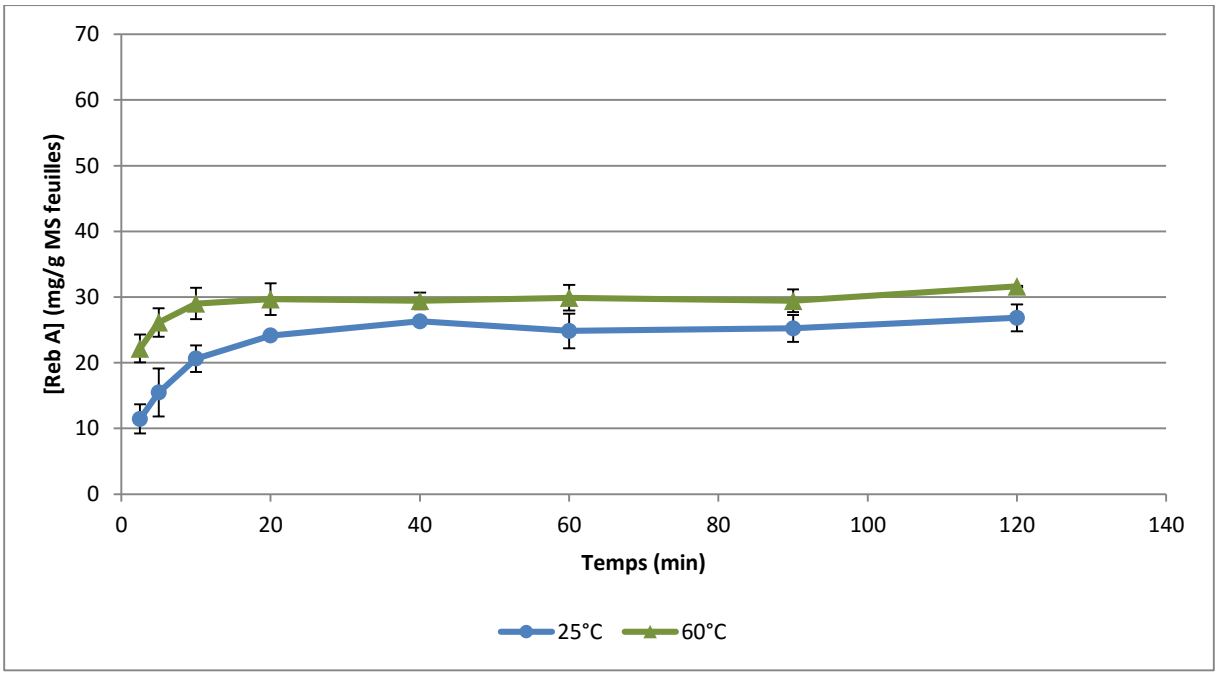


Figure II-38 Influence de la température sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (agitation = 600 tr/min, L/S = 44, n = 3)

L'absence d'agitation des feuilles séchées et broyées à 60°C et pour un *ratio* L/S de 44 pénalise toujours la cinétique d'extraction des glycosides, mais pas dans les mêmes proportions que pour les feuilles entières (Figure II-31, Figure II-32, Figure II-39 et Figure II-40). L'impact d'une limitation diffusionnelle aux interfaces solide-liquide ne se manifesterait que par une légère diminution des taux maximaux d'extraction, atteints en 20 minutes de temps de contact pour la macération sans agitation contre 10 minutes pour une extraction agitée.

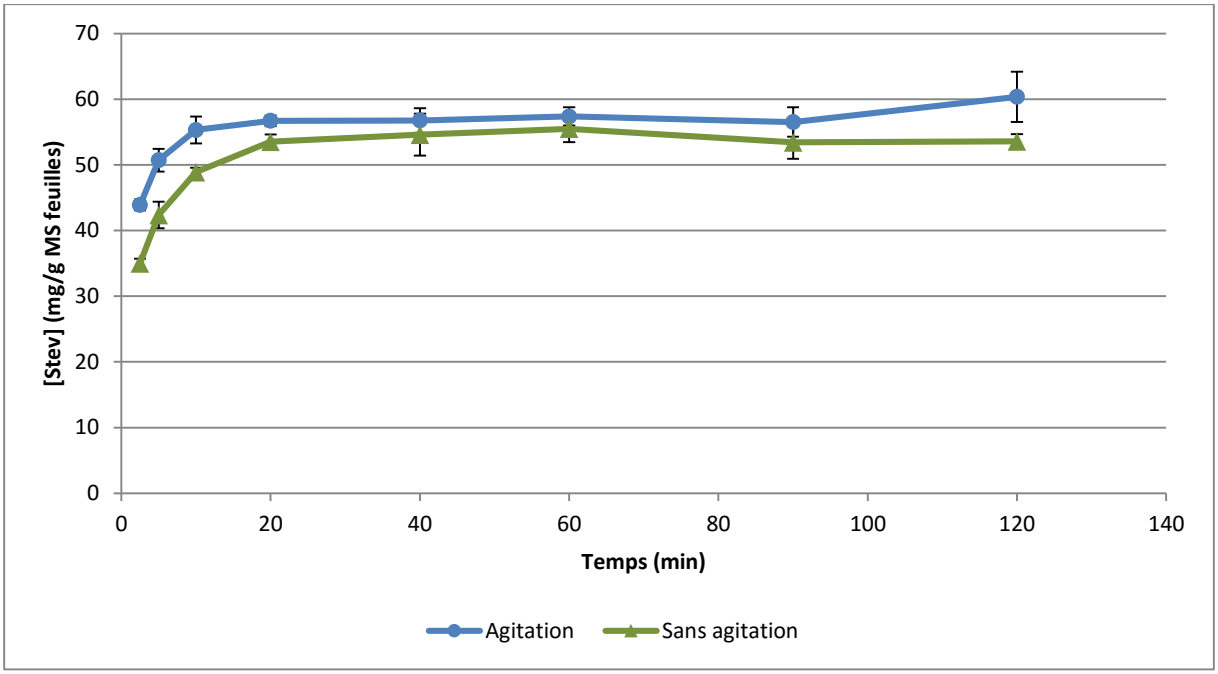


Figure II-39 Influence de l'agitation (600 tr/min) sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, L/S = 44, n = 3)

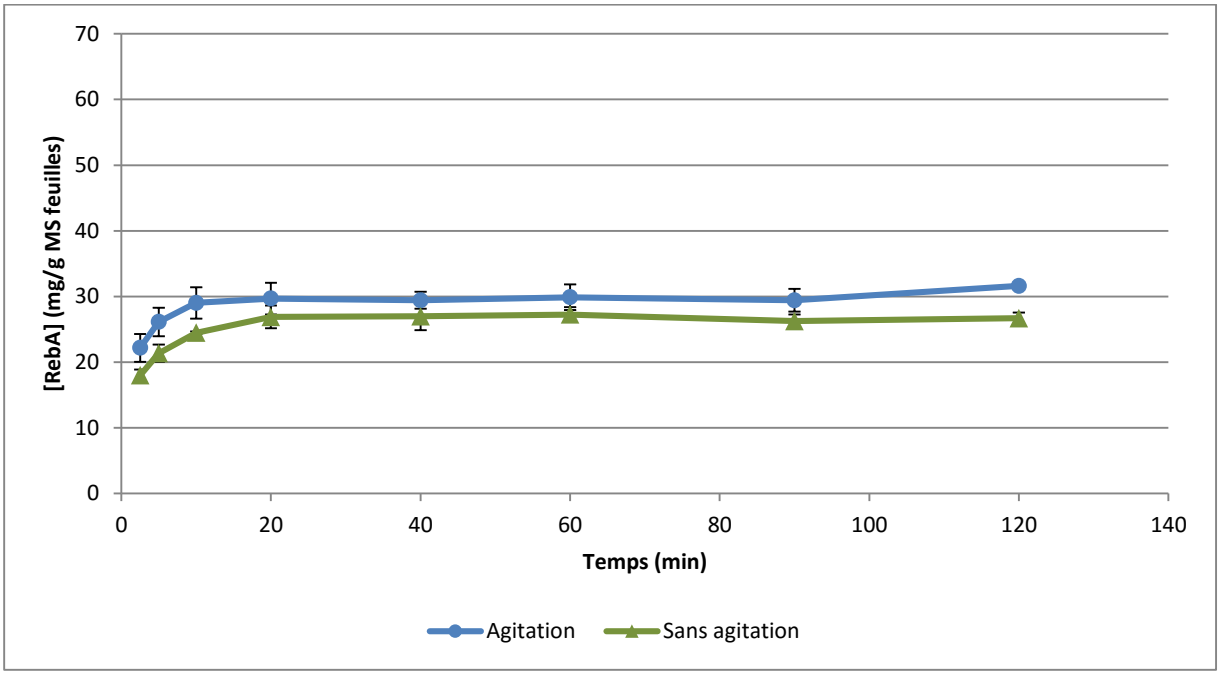


Figure II-40 Influence de l'agitation (600 tr/min) sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles broyées du Paraguay (T = 60°C, L/S = 44, n = 3)

De même, l'effet d'une diminution du *ratio* liquide-solide, jusqu'à des valeurs quatre fois plus faibles (L/S de 44 à 11) est nettement moins significatif sur la cinétique pour les feuilles séchées et broyées que pour les feuilles séchées et non broyées (Figure II-33, Figure II-34, Figure II-41 et Figure II-42), bien qu'apparaisse toujours une tendance à la diminution des taux maximaux d'extraction à l'équilibre, qui peut être attribuée ici aussi aux limites de solubilité des glycosides de stéviol. Das *et al.* (2014) et Rai *et al.* (2012) ont eux aussi obtenu les mêmes résultats pour l'extraction du rébaudioside A et du stévioside à partir des feuilles de Stévia.

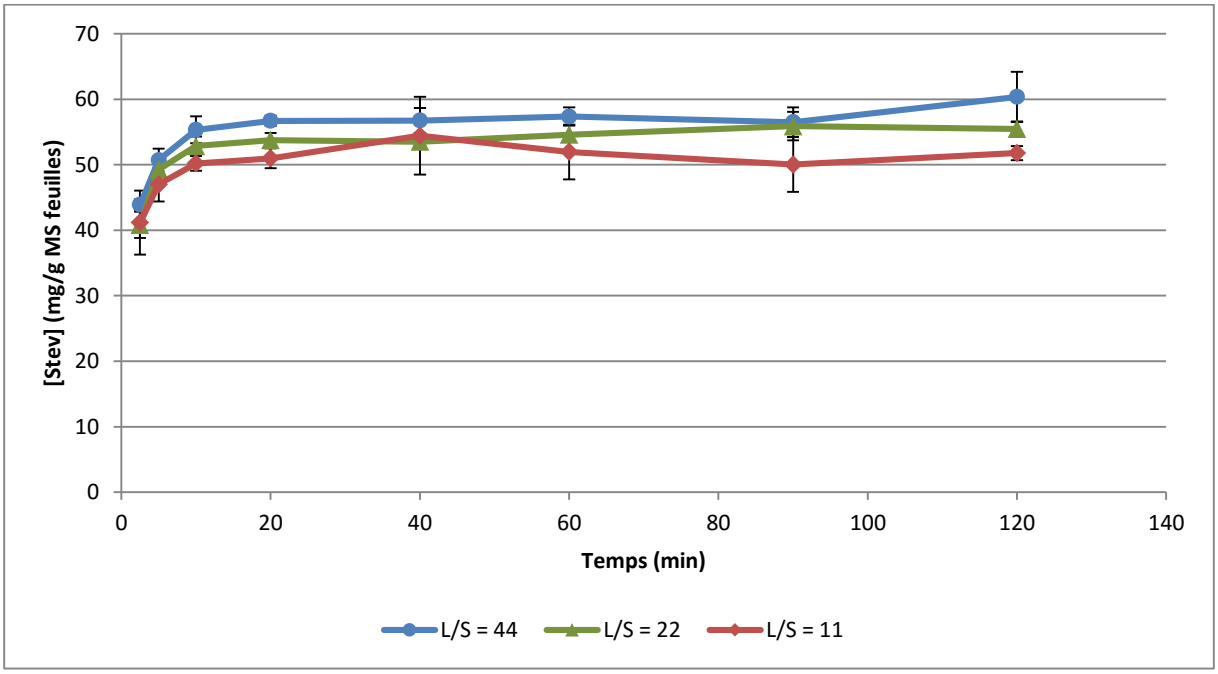


Figure II-41 Influence du *ratio* liquide-solide sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, n = 3)

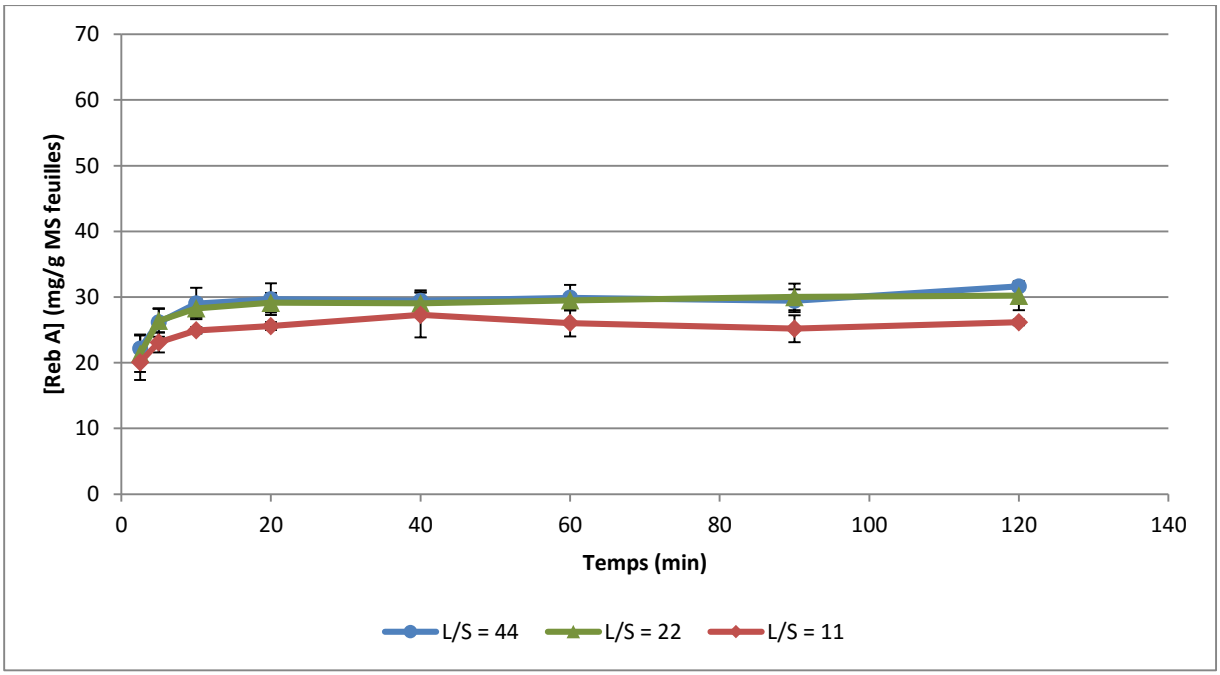


Figure II-42 Influence du *ratio* liquide-solide sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay) (T = 60°C, agitation = 600 tr/min, n = 3)

En conclusion, les cinétiques d'extraction aqueuse du stévioside et du rébaudioside A à partir des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay peuvent être décrites de façon satisfaisante comme résultant de la diffusion intraparticulaire de ces solutés, sous condition d'une agitation efficace du milieu solide-liquide à forte dilution liquide (L/S élevé). Le broyage des feuilles accélère considérablement les cinétiques, et permet d'envisager une extraction par simple macération, sans ou avec une faible agitation. L'augmentation de la température à 60°C favorise le rendement d'extraction, particulièrement du rébaudioside A. Les limitations du taux d'extraction à l'équilibre observées pour une diminution du *ratio* liquide-solide nous conduisent à étudier l'extraction étagée des feuilles séchées, compactées et broyées de Stévia du Paraguay.

II.4 Etude de l'extraction étagée des glycosides de stéviol

II.4.1 Etude de l'épuisement en glycosides de stéviol

Les essais sont réalisés avec les feuilles séchées du Paraguay, broyées avec une grille de refus de 1 mm. Cinq grammes de feuilles sont mises en contact avec 200 g d'eau (L/S = 44), à 60°C, avec une agitation magnétique de 600 tr/min, pour une durée de 60 minutes.

Après séparation par filtration sur toile en nylon de porosité de 100 µm, le raffinat a été à nouveau extrait par ajout de 200 g d'eau. L'opération est répétée 6 fois, correspondant à 5 étages d'extraction par du solvant neuf. Ce protocole a été répété 3 fois.

La concentration en solutés des différents extraits produits est déterminée par CLHP (Partie expérimentale IV.11). La masse sèche des extraits a aussi été mesurée.

Le calcul des rendements en stévioside est établi selon la formule suivante :

$$Rdt\ extraction\ i\ Stev = \frac{[Stev]_i \times V'_i}{\sum_{j=1}^{6}([Stev]_j \times V'_j)}$$

où :

- $[Stev]_i$ (g/L) est la concentration en stévioside dans l'extrait i,
- V'_i (L) est le volume de l'extrait obtenu après l'extraction i,
- $[Stev]_j$ (g/L) est la concentration en stévioside dans l'extrait j,
- V'_j (L) est le volume de l'extrait obtenu après l'extraction j.

Les rendements en rébaudioside A et la matière sèche sont calculés de façon analogue.

Les résultats des masses extraites et des rendements sont présentés dans le Tableau II-8 et le Tableau II-9.

Tableau II-8 Masses extraites en solutés et en matière sèche lors de l'épuisement des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay), par extraction étagée avec du solvant neuf

Extraction	Masse extraite / Masse sèche feuilles (g/100 g)		
	Stévioside	Rébaudioside A	Matière sèche
1	4,93 ± 0,08	2,58 ± 0,00	39,3 ± 6,0
2	0,67 ± 0,06	0,35 ± 0,02	3,8 ± 0,2
3	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,4 ± 0,1
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-

Tableau II-9 Rendements en solutés et en matière sèche lors de l'épuisement des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay), par extraction étagée avec du solvant neuf

Extraction	Rendements		
	Stévioside	Rébaudioside A	Matière sèche
1	86,0 (± 1,2) %	85,8 (± 0,8) %	90,3 (± 1,4) %
2	11,6 (± 1,1) %	11,5 (± 0,7) %	8,7 (± 1,1) %
3	2,4 (± 0,1) %	2,6 (± 0,2) %	0,9 (± 0,4) %
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-

Nous pouvons observer que seulement trois extractions suffisent, dans ces conditions opératoires, pour épuiser totalement les feuilles en stévioside et en rébaudioside A. D'après les rendements, le stévioside et le rébaudioside A sont extraits de façon similaire à chaque étape. Près de 86 % des solutés ont été récupérés après la première extraction, 12 % après la deuxième et enfin 2 % après la troisième. L'opération d'extraction se déroulerait lors de la première étape. La deuxième étape serait un épuisement des feuilles et une dilution de l'extrait contenu dans le raffinat. Enfin la troisième étape serait juste une dilution de l'extrait contenu dans le raffinat, et donc une opération de lavage. Pour confirmer cela nous avons effectué des bilans de matière.

Le Tableau II-10 représente deux bilans de matière calculés de deux façons différentes : le bilan par étapes et le bilan global pour la première extraction.

Tableau II-10 Bilans de matière de l'épuisement des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia (population : « Criolla » ; origine : Paraguay)

Masse extraite / Matière sèche feuilles (g/100 g)			
Stevioside		Rébaudioside A	
Par étapes	**Global extraction 1**	**Par étapes**	**Global extraction 1**
5,74 (± 0,02)	5,54 (± 0,02)	3,00 (± 0,03)	2,89 (± 0,03)

Le bilan par étapes est la somme des masses de solutés obtenues dans les extraits produits après chaque extraction moyennée par la masse sèche de feuilles introduites lors de la première extraction. Il a été calculé selon la formule suivante pour le stévioside :

$$BMPE = \frac{\sum_{i=1}^{6}([Stev]_i \times V_i')}{m \times MS}$$

où :

- $[Stev]_i$ (g/L) est la concentration en stévioside dans l'extrait i,
- V'_i (L) est le volume de l'extrait obtenu après l'extraction i,
- m (g) est la masse de feuilles introduites pour l'extraction 1,
- MS (g/g) est la teneur en matière sèche des feuilles.

Pour le rébaudioside A le calcul est identique en remplaçant la concentration en stévioside par la concentration en rébaudioside A.

Le bilan global pour la première extraction a été calculé à partir de l'hypothèse d'une extraction totale et où l'extrait a la même concentration en solutés en tout point du système d'extraction. C'est-à-dire que la concentration en solutés dans l'extrait situé dans les feuilles est la même que dans l'extrait « libre » situé autour des feuilles. Ainsi, le volume total d'eau de la première extraction (eau ajoutée et humidité des feuilles) est multiplié par la concentration en soluté de l'extrait produit pour établir le bilan. Le calcul a donc été effectué selon la formule suivante :

$$BMGE_1 = V_{tot}[Stev]_1$$

où :

- $[Stev]_1$ (g/L) est la concentration en stévioside dans l'extrait 1,
- V_{tot} (L) est le volume total d'eau, il tient compte du volume d'eau ajoutée et de l'humidité des feuilles.

Les résultats obtenus (Tableau II-10) montrent que près de 96% des solutés sont extraits pendant la première extraction. Ainsi, la première étape est bien l'opération d'extraction, et les deux autres opérations sont principalement des étapes de lavage du raffinat. Les glycosides de stéviol sont donc des molécules plutôt accessibles et faciles à extraire dans ces conditions.

Enfin, ces résultats montrent également l'importance de l'étape de séparation solide-liquide. En effet, l'extrait restant dans le raffinat est quasiment à la même concentration en soluté que l'extrait produit ; ainsi plus l'étape de séparation solide-liquide est efficace plus le volume d'extrait récupéré est grand et meilleurs sont les rendements d'extraction.

La matière sèche hydrosoluble est extraite de façon similaire aux glycosides de stéviol à chaque étage d'extraction et le rendement en matière sèche extraite par rapport aux feuilles a été déterminé : il est de 43,4 ±6,1 % (g/g). Kinghorn et Soejarto (1985) indiquent une valeur d'environ 42% (g/g) ce qui est en accord avec la valeur obtenue. Les glycosides de stéviol représentent alors 20% de cette valeur. Une ou plusieurs étapes supplémentaires seront donc nécessaires pour purifier les glycosides de stéviol purs.

Comme évoqué précédemment (Partie II.1.1.2.9) nous avons développé une méthode d'épuisement en ASE (Partie expérimentale IV.11, Jentzer *et al.*, (2015)). Pour confirmer les valeurs d'extraction maximum des glycosides de stéviol, les conditions d'extraction sont rappelées dans le Tableau II-11. Dans ces conditions très favorables (température de 100°C, *ratio* liquide-solide-global d'environ 44, broyage des feuilles très fin, système pressurisé à 10,3 MPa), le processus global d'extraction dure 13 min 30 s et permet d'obtenir un épuisement total des feuilles introduites dans la cellule d'extraction.

Tableau II-11 Conditions optimisées de l'épuisement en ASE

Facteur	Valeur
Broyage feuilles (mm)	0,5
Masse feuilles (g)	0,5
Masse Eau (g)	10
***Ratio* L/S**	22
Agitation	-
Température (°C)	100
Durée statique (min)	4

Les résultats obtenus par la méthode ASE sont comparés aux résultats par extraction agitée, étagée (Tableau II-12). Les écarts types élevés sur les valeurs obtenues, pour les extractions réalisées en ASE, sont liés à l'utilisation de plusieurs lots de feuilles. Les teneurs ainsi calculées seront désignées par l'appellation « potentiels plante ». Elles définissent la teneur maximale en solutés qu'il est possible d'extraire d'une matière végétale dans certaines conditions, ce qui est très important pour établir les rendements d'extraction ainsi que les bilans de matière. Les résultats obtenus avec la méthode conventionnelle sont proches de ceux obtenus en ASE, même si la teneur en rébaudioside A semble un peu plus élevée avec la méthode conventionnelle. Le fait d'appliquer des contraintes plus fortes aux feuilles (broyage plus fin, température plus élevée, forte pression) ne permettrait donc pas forcément d'obtenir plus de solutés. Ainsi, lors des épuisements en batch, la quasi-totalité des solutés présents dans la matière seraient extraits.

Tableau II-12 « Potentiels plante » en stévioside et en rébaudioside A obtenus à partir de deux méthodes différentes d'épuisement

Masse extraite / Matière sèche feuilles (g/100g)			
Stevioside		**Rébaudioside A**	
Conventionnelle	**ASE**	**Conventionnelle**	**ASE**
5,74 (± 0,02)	6,00 (± 0,40)	3,00 (± 0,03)	2,35 (± 0,27)

II.4.2 Etude de l'extraction étagée avec recyclage de l'extrait

Les essais sont réalisés avec les feuilles séchées du Paraguay, broyées avec une grille de refus de 1 mm. Cent quarante grammes de feuilles sont mis en contact avec 1,4 kg d'eau (L/S = 10), à 60°C, sous agitation magnétique de 600 tr/min, pendant 60 minutes.

Après séparation par filtration sur toile en nylon de porosité de 100 µm, environ 40 mL d'extrait sont prélevés pour analyser la teneur en stévioside, en rébaudioside A et en matière sèche ; l'extrait restant est remis en contact avec de nouvelles feuilles, de sorte que le *ratio* extrait/feuilles soit maintenu à 10 g/g. L'opération est répétée 10 fois, et le protocole complet a été répété 2 fois.

La Figure II-43 et la Figure II-44 (stévioside), la Figure II-45 et la Figure II-46 (rébaudioside A) représentent les concentrations des solutés dans l'eau lors de ces deux essais. Les triangles verts correspondent aux valeurs expérimentales de concentration après dosage des extraits par CLHP (Partie expérimentale IV.11). Les ronds bleus correspondent aux évolutions des concentrations calculées à partir d'un bilan matière, sans tenir compte de la saturation des extraits, et en supposant que 100% des solutés contenus dans les feuilles sont solubilisés à chaque opération. A partir de la 8ème extraction, la courbe expérimentale, pour les deux molécules, dépasse la courbe théorique. Ceci reflète principalement les pertes par évaporation de l'eau du système d'extraction, entraînant une concentration des solutés dans l'eau. Le nouveau milieu d'extraction pourrait aussi avoir une capacité extractive plus élevée due aux nombreux composés déjà présents avant l'extraction. Nous n'observons pas de stabilisation de la concentration, qui serait synonyme de saturation des extraits, ou de diminution qui reflèterait un amoindrissement du potentiel d'échange entre la matière végétale et l'extrait. Ainsi, nos résultats montrent la facilité d'extraire les glycosides de stéviol dans ces conditions (feuilles broyées, L/S=10, 60°C) et confirment la faible influence du *ratio* liquide-solide sur l'extraction des glycosides de stéviol à partir de feuilles broyées (Partie II.3.1). Les concentrations atteintes pour les deux molécules (jusqu'à 70 g/L pour le stévioside et 30 g/L pour le rébaudioside A) dépassent largement leurs valeurs de solubilité dans l'eau pure (1,25 g/L pour le stévioside et 8,0 g/L pour le rébaudioside A). Ce phénomène pourrait s'expliquer par la température d'extraction de 60°C et la co-extraction de composés qui augmenteraient leur solubilité. La détermination de la solubilité a été effectuée à partir de molécules purifiées. Selon leur mode de purification, elles pourraient avoir adopté une conformation pouvant être différente de celle qu'elles ont dans leur état naturel dans les feuilles.

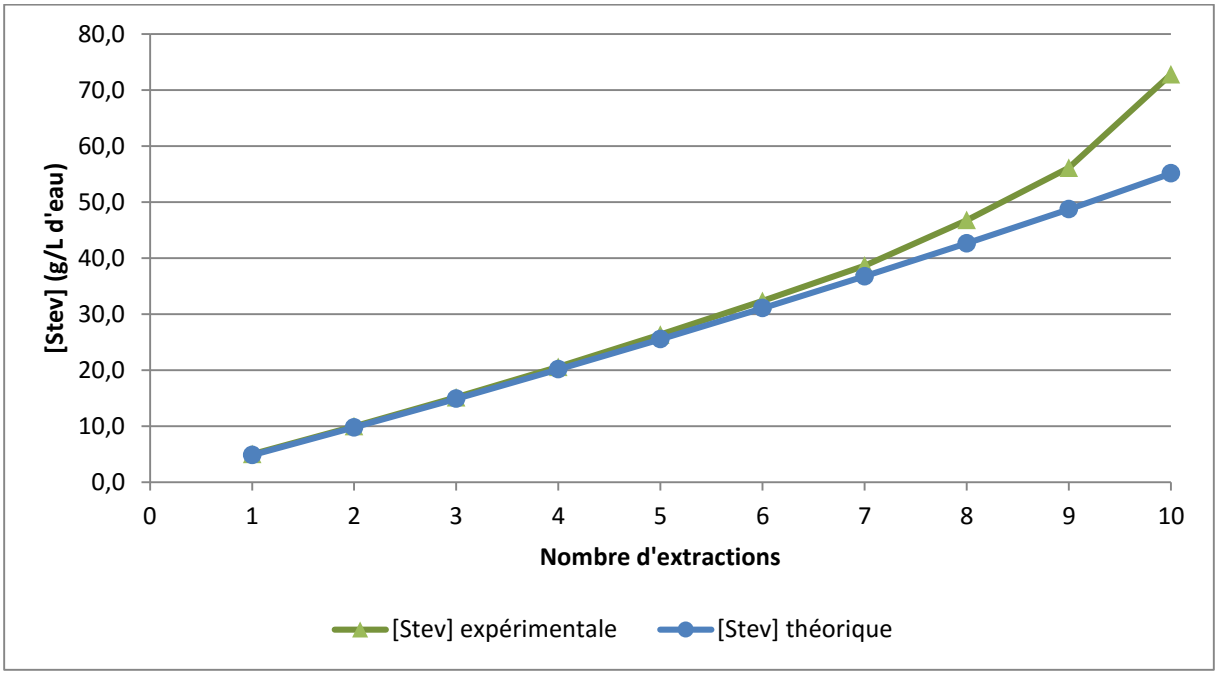


Figure II-43 Evolution de la concentration en stévioside dans l'eau lors de l'extraction étagée par recyclage de l'extrait des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay pour le premier essai

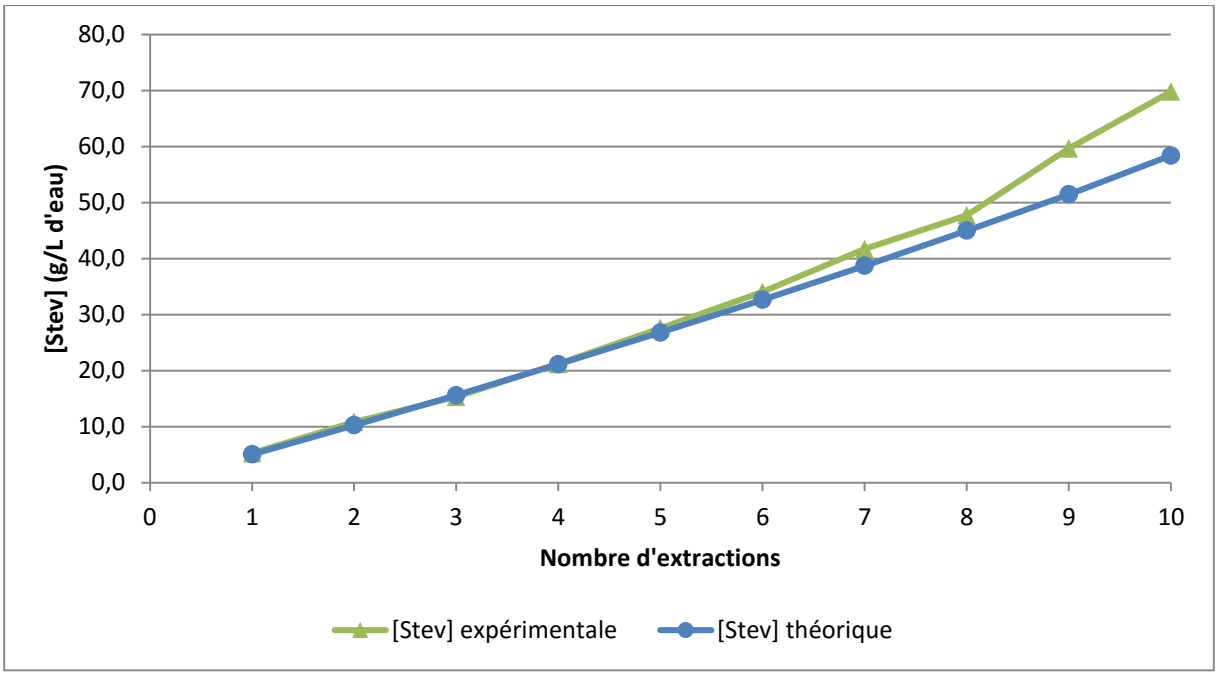


Figure II-44 Evolution de la concentration en stévioside dans l'eau lors de l'extraction étagée par recyclage de l'extrait des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay pour le premier essai pour le deuxième essai

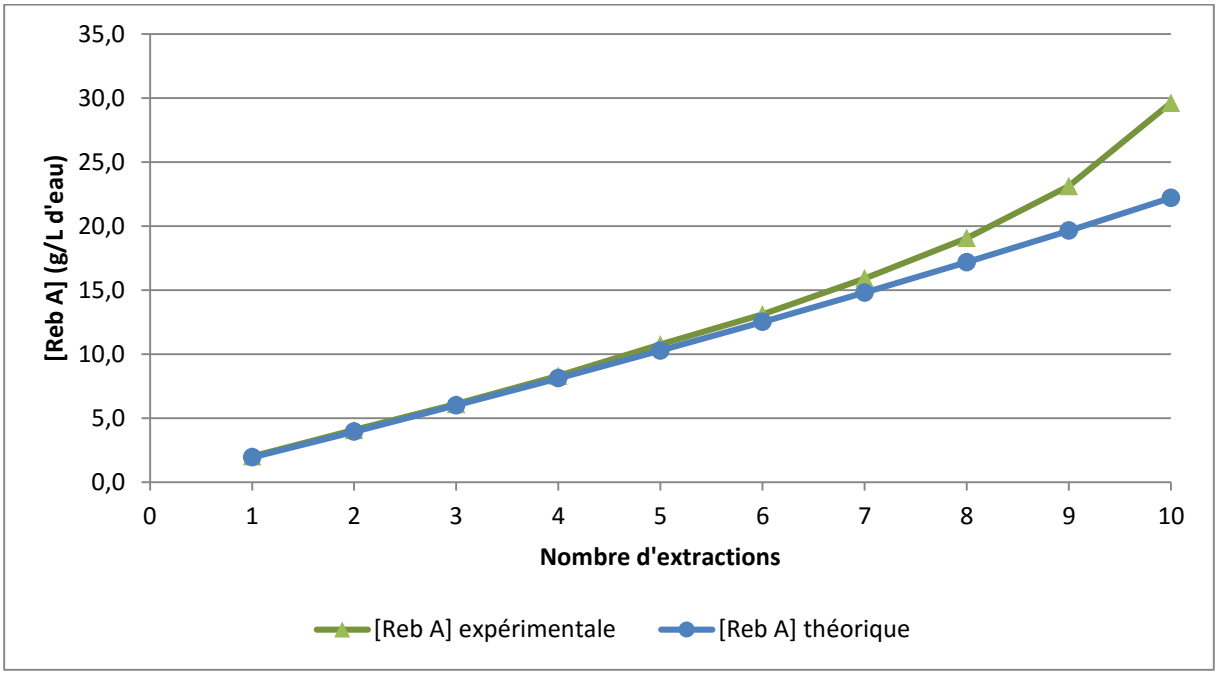


Figure II-45 Evolution de la concentration en rébaudioside A dans l'eau lors de l'extraction étagée par recyclage de l'extrait des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay pour le premier essai

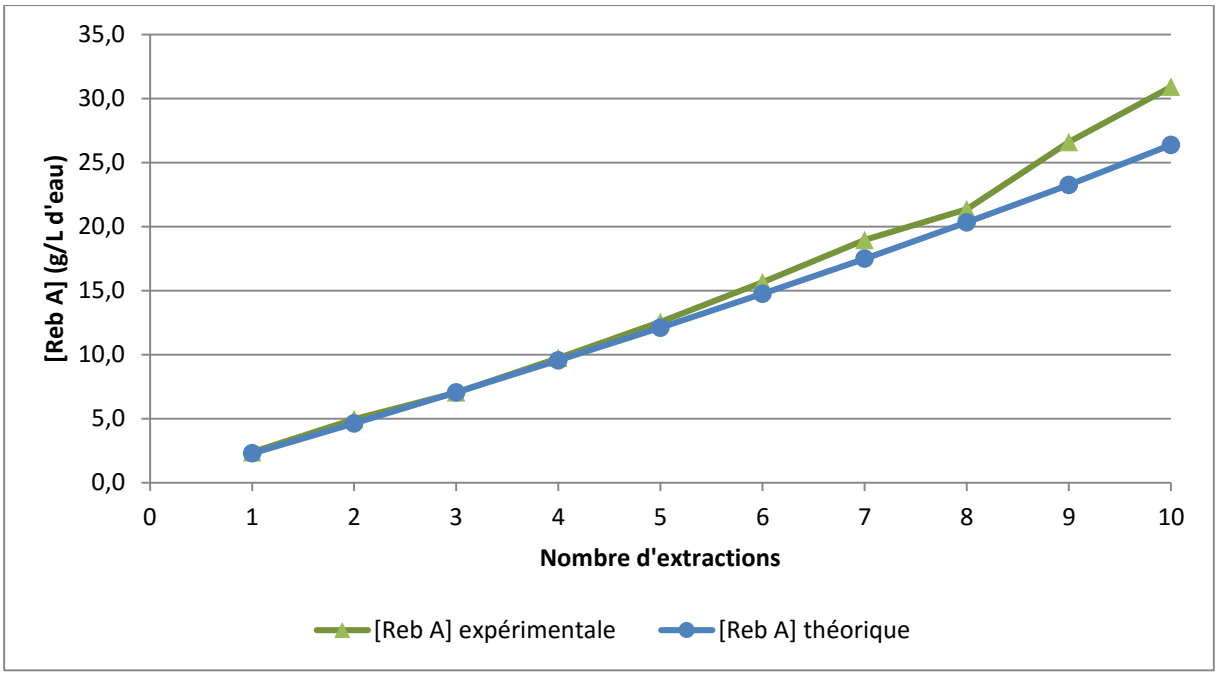


Figure II-46 Evolution de la concentration en rébaudioside A dans l'eau lors de l'extraction étagée par recyclage de l'extrait des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay pour le premier essai pour le deuxième essai

Ainsi, le recyclage de l'extrait aurait un intérêt évident pour réduire les quantités de solvant à utiliser pour extraire les glycosides de stéviol, sans pour autant réduire l'efficacité de l'extraction. Cependant il est important de noter que les feuilles séchées se réimbibent au contact de l'extrait. Ainsi, il y a perte d'extrait dans le raffinat, et donc de solutés, à chaque étape. Plus le nombre d'extractions consécutives avec recyclage de l'extrait, dans les mêmes conditions, est grand, plus l'extrait est concentré en solutés, et plus il y a de pertes dans le raffinat. Il parait donc logique qu'au bout d'un certain nombre d'extractions, le protocole avec recyclage de l'extrait soit beaucoup moins efficace qu'un protocole sans recyclage.

Pour l'illustrer, nous avons représenté, respectivement pour le stévioside et le rébaudioside A, l'évolution du bilan matière, après chaque étape d'extraction, entre les protocoles d'extraction avec ou sans recyclage (Figure II-47 et la Figure II-48). Les courbes obtenues montrent l'évolution des masses de molécules d'intérêt qui sont récupérées dans l'extrait, ou perdues (par prélèvement et par rétention dans le raffinat) après chaque étape d'extraction. Le protocole d'extraction sans recyclage consisterait à extraire séparément chaque échantillon de feuilles par de l'eau pure.

Pour le protocole avec recyclage, les masses en solutés disponibles, après extraction dans l'extrait, augmentent jusqu'à la 4ème extraction, puis diminuent jusqu'à la 10ème. Ainsi à partir de la 4ème extraction, au lieu de récupérer des molécules d'intérêt, nous ne faisons que les transférer dans le raffinat et les perdre dans les prélèvements. Dès la 3ème extraction, nous pouvons remarquer une diminution d'environ 33% des teneurs en solutés récupérées par rapport à un protocole d'extraction sans recyclage, et il serait profitable de n'envisager qu'un seul recyclage de l'extrait pour diminuer les pertes en molécules d'intérêt. Au vu de la faible influence du *ratio* liquide-solide sur l'extraction, il serait même encore plus efficace de réaliser l'extraction en une seule étape avec un *ratio* liquide-solide plus faible qu'en deux étapes avec le recyclage de l'extrait. Dans ces conditions, d'une double extraction avec recyclage, le *ratio* liquide-solide global est d'environ 6, ce qui semble être la limite inférieure pour ne pas perdre trop de glycosides de stéviol dans le raffinat après extraction.

Ces résultats soulignent là encore l'importance de l'étape de séparation liquide-solide. Plus cette étape sera efficace, plus les pertes d'extrait dans le raffinat seront faibles, et plus il sera possible de baisser le *ratio* liquide-solide sans pour autant affecter le rendement en solutés récupérés dans l'extrait. Ainsi l'efficacité de l'étape de séparation liquide-solide sera déterminante pour le choix de la valeur du *ratio* liquide-solide.

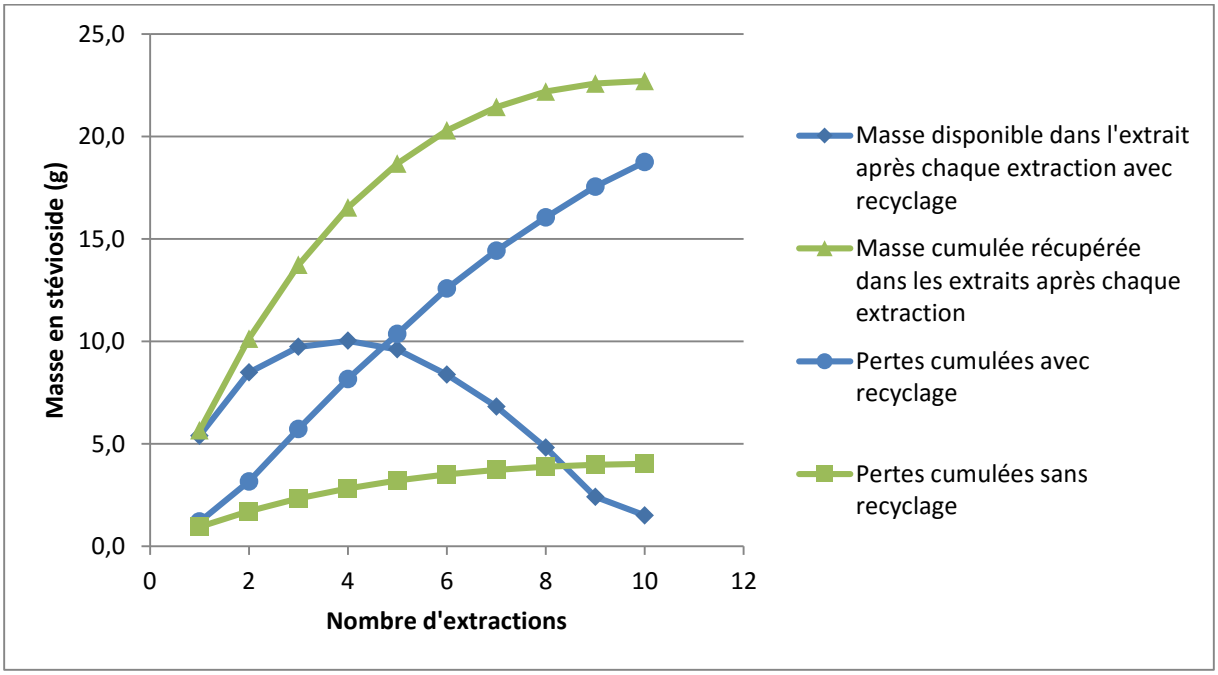


Figure II-47 Evolution des bilans de matière en stévioside pour un protocole d'extraction avec ou sans recyclage

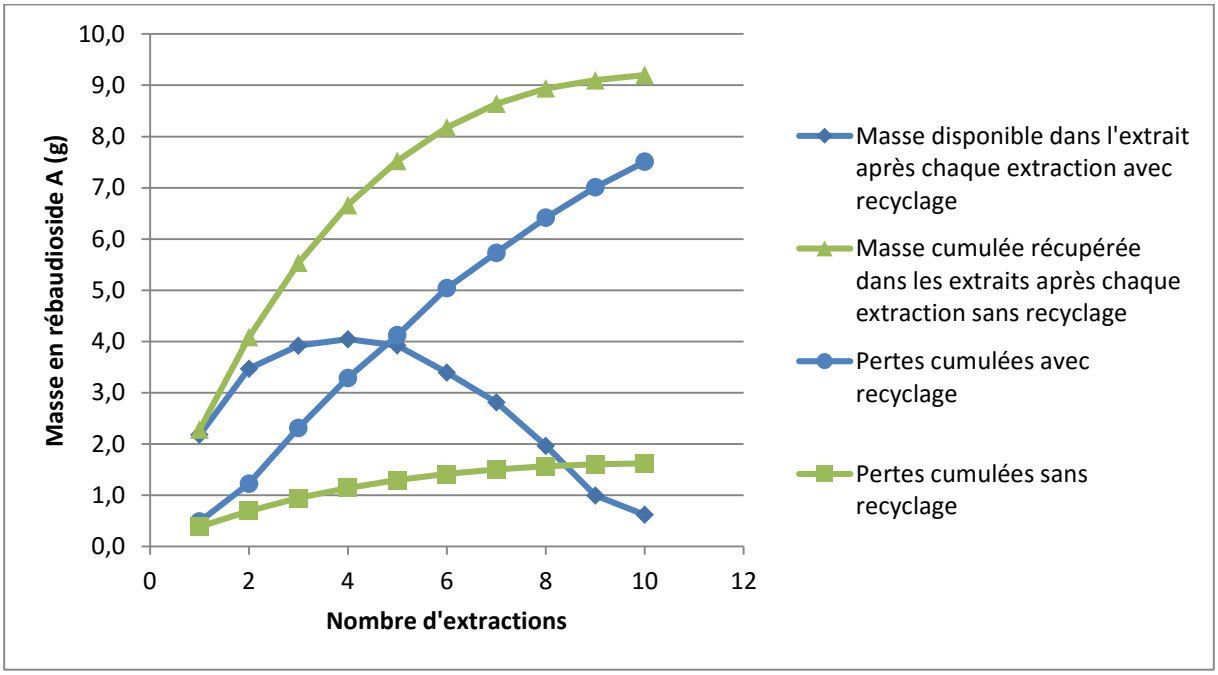


Figure II-48 Evolution des bilans de matière en rébaudioside A pour un protocole d'extraction avec ou sans recyclage

II.5 Synthèse

Dans ce deuxième chapitre, nous avons pu souligner la difficulté à extraire les glycosides de stéviol à partir de feuilles fraîches et entières de Stévia du fait :

- de la difficulté de l'eau à pénétrer la feuille. L'hydrophobicité de la cuticule, la fermeture des stomates ou encore la couche limite d'air formée par les trichomes à sa surface pourraient alors être en cause ;
  ou
- de l'imperméabilité des membranes cellulaires aux glycosides de stéviol.

Le séchage des feuilles ou l'élévation de la température d'extraction permettent de franchir ces barrières en modifiant la structure de la matière végétale. Le séchage permettant par ailleurs la conservation et le stockage de la matière végétale, nous avons décidé de poursuivre notre étude en incluant ce prétraitement de la matière à notre procédé de fractionnement.

A partir de feuilles séchées, nous avons modélisé le transfert de masse et avons pu en déduire que la diffusion intraparticulaire des solutés était un autre verrou de l'extraction aqueuse des édulcorants. Le principal facteur permettant de diminuer fortement cette barrière est le broyage. Nous avons pu montrer qu'un broyage fin n'est pas nécessaire et qu'un compactage des feuilles, menant à leur broyage partiel, est suffisant. Nous avons donc opté pour poursuivre l'étude avec des feuilles broyées ou compactées. Nous avons pu montrer que le rébaudioside A était extrait moins rapidement que le stévioside.

Les conditions opératoires (température, *ratio* liquide-solide et agitation) ont eu les effets prévisibles sur l'extraction des glycosides de stéviol. Pour les feuilles compactées, l'augmentation de la température a amélioré les vitesses d'extraction, l'augmentation du *ratio* liquide-solide a favorisé les rendements d'extraction et l'ajout de l'agitation a promu les vitesses et les rendements d'extraction. Concernant les feuilles broyées, logiquement, les influences de ces paramètres ont été beaucoup plus nuancées, mais restent similaires à celles observées pour les feuilles compactées.

L'étude de l'extraction étagée a permis de montrer que l'extraction sur feuilles broyées peut être réalisée de façon totale et en une seule étape. Les seules molécules qui ne seraient pas récupérées, après séparation solide-liquide, seraient celles situées dans l'extrait restant dans le raffinat. Ainsi nous avons pu mettre en évidence deux autres facteurs limitants interdépendants : le *ratio* liquide-solide et l'efficacité de la séparation liquide-solide. Plus la séparation sera efficace, plus il sera possible de baisser le *ratio* sans pour autant diminuer les rendements d'extraction.

L'extraction solide-liquide des glycosides de stéviol à partir de feuilles séchées est plutôt rapide et efficace. De nombreux facteurs (broyage, température, *ratio* liquide-solide, agitation, séparation liquide-solide) permettent d'améliorer leur rendement dans l'extrait produit. Il s'agira maintenant de trouver les bons compromis entre ces facteurs, afin de limiter les dépenses énergétiques et de solvant, sans pour autant réduire leur rendement.

Chapitre III
Extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni à l'échelle pilote



L'étude des cinétiques d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles de Stévia a été menée dans un contacteur solide-liquide de petite dimension (1 L) pour des échantillons de taille limitée (10 à 60 g) mais permettant de maîtriser, à l'échelle laboratoire, les protocoles opératoires et d'obtenir une reproductibilité des résultats suffisante pour modéliser les échanges de matière à l'échelle intraparticulaire et analyser l'influence des principaux facteurs (granulométrie, température, *ratio* liquide-solide, agitation). Notre objectif dans ce chapitre est d'étudier plusieurs techniques d'extraction solide-liquide à une échelle pilote, assurant la maîtrise des technologies de contacteurs mis en œuvre pour l'extraction.

Parmi les nombreuses techniques de mise en contact de la matière végétale et du solvant (macération, immersion sous agitation, percolation, *etc.*) et d'activation des échanges de matière et d'énergie (extraction assistée par ultrasons, par micro-ondes, par eau subcritique, *etc*.) qui ont été étudiées pour l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol (Chapitre I Partie I.3.4), nous avons choisi d'en comparer deux pour lesquelles le stade de maturité technologique des équipements pilotes disponibles apparaissait adapté à un transfert d'échelle :

- l'extraction aqueuse en contacteur agité pilote dont la géométrie et la pale d'agitation mécanique sont adaptées à la mise en suspension de matières végétales comme les feuilles dans l'eau. Transposition la plus simple et la plus directe des conditions mises en œuvre au stade laboratoire, les essais pilotes permettront aussi de mieux apprécier les contraintes liées à la mise en œuvre de plus grandes quantités de feuilles de Stévia (remplissage du contacteur et volume utile du contacteur, mise en contact du solide et du liquide) et de la séparation solide-liquide en fin d'extraction,

- l'extraction aqueuse sous assistance par ultrasons. Les essais réalisés sur un équipement pilote adapté pour l'exposition des milieux solide-liquide aux effets des ultrasons permettra d'en apprécier les apports.

Enfin, l'étude des cinétiques d'extraction aqueuse de feuilles de Stévia ayant mis en évidence l'importance des effets de déstructuration du matériau végétal, nous étudierons la mise en œuvre de la technologie bi-vis pour l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol. Déjà étudiée pour l'extraction solide-liquide de nombreuses matières végétales (extraction des protéines du tournesol (Evon, 2008), d'hémicelluloses de la paille et du son de blé (Zeitoun, 2011) ou encore des polyphénols des coproduits de bois (Celhay, 2013) Chapitre I, Partie I.4.2.3), et en particulier pour l'extraction de protéines de luzerne (Colas, 2012). Cette technologie sera mise en œuvre dans un extrudeur bi-vis pilote dont la configuration et le profil de vis seront adaptés à la combinaison d'effets de cisaillement et de compression en vue d'obtenir une déstructuration de la matière, un mélange solide-liquide efficace et une séparation solide-liquide par pressage et filtration en continu.

III.1 Etude de l'extraction des glycosides de stéviol en extracteur agité pilote

III.1.1 Description de l'installation pilote

L'extracteur agité mis en œuvre fait partie d'une installation pilote de fractionnement de la matière végétale fournie par la société Tournaire qui regroupe une unité d'extraction solide-liquide et une unité de distillation sous vide dont le schéma de principe est présenté sur la Figure III-2. L'unité d'extraction (Figure III-3) est un contacteur cylindrique à fond plat d'un volume nominal de 300 L (le plus petit de la gamme industrielle (300-3000 L)), équipé d'une pale d'agitation dont la vitesse, le sens de rotation, et la hauteur dans la cuve sont réglables. Le profil de la pale (Figure III-3) est adapté pour assurer une agitation turbulente du milieu pour une rotation dans le sens des aiguilles d'une montre et un débatissage des solides s'accumulant au fond du contacteur pour une rotation dans le sens inverse. L'enceinte de l'extracteur est munie d'une double enveloppe connectée à un réseau de vapeur produit par une chaudière qui permet de chauffer le milieu d'extraction par conduction indirecte. L'installation est équipée d'un système de contrôle électronique avec action pneumatique.

L'unité de séparation solide-liquide est une essoreuse pilote centrifuge à bol du type RC 50 PXR (Rousselet, France) équipé d'une poche filtrante en polypropylène de porosité 1-10 µm (Figure III-1).



Figure III-1 Photographie de l'essoreuse centrifuge à bol du type RC 50 PXR (Rousselet, France)

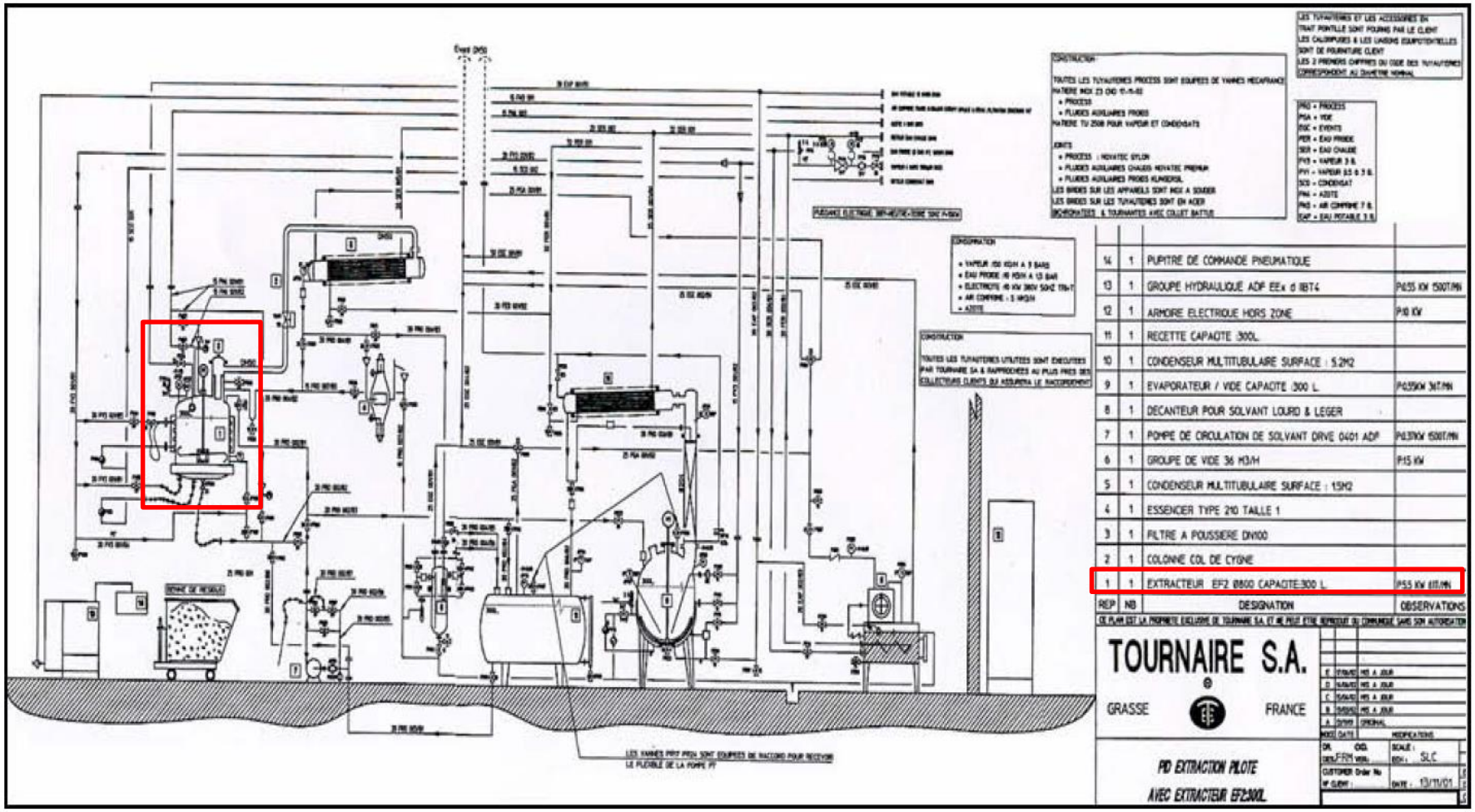


Figure III-2 Système de fractionnement pilote Tournaire : Schéma technique

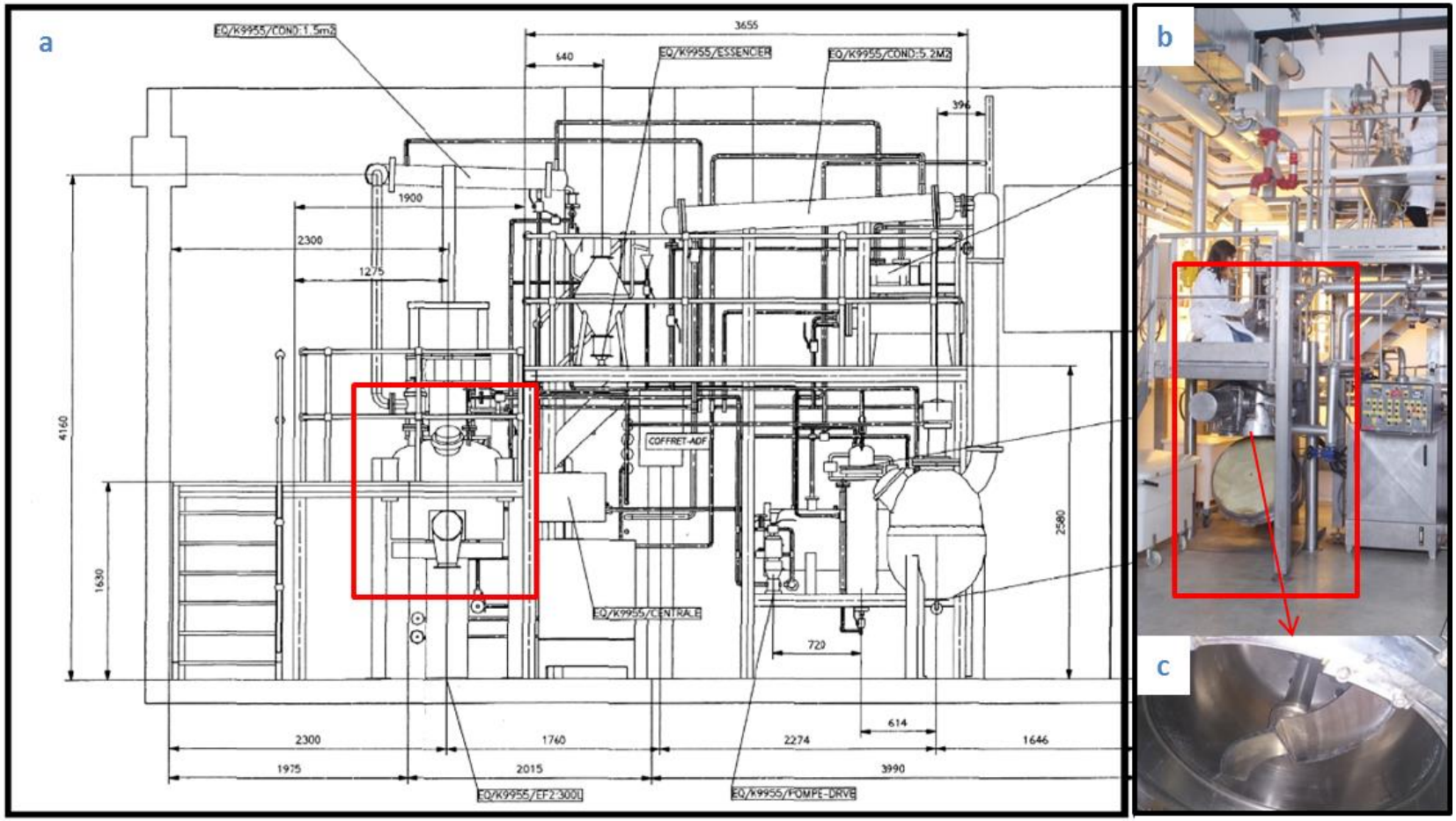


Figure III-3 Système de fractionnement pilote Tournaire : (a) Schéma aux côtes, (b) Photographie de la cuve agitée, (c) Photographie de la pale d'agitation (vue de dessous)

III.1.2 Protocole d'extraction et de séparation solide-liquide

La Figure III-4 résume le schéma du procédé d'extraction :

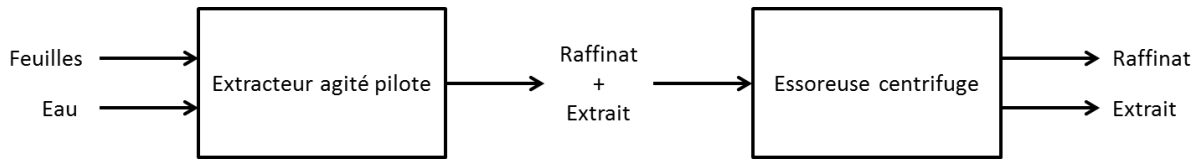


Figure III-4 Représentation schématique du procédé de fractionnement des feuilles de Stévia par extraction aqueuse en extracteur agité pilote

La chaudière est mise en route, afin de produire les vapeurs d'eau nécessaires à la double enveloppe de la cuve, pour chauffer et maintenir la température du milieu d'extraction. L'extracteur est rempli avec la quantité d'eau nécessaire à l'expérience. L'agitation est réglée à 15 tr/min, à son plus bas niveau dans la cuve et en mode débatissage (sens antihoraire). Une fois que l'eau a atteint la température consigne, les feuilles de Stévia sont ajoutées dans la cuve, par le haut. Les prélèvements effectués sont filtrés sur toile en nylon de 100 µm afin de séparer la phase insoluble de l'extrait et la teneur en matière sèche (Partie expérimentale IV.2) et en glycosides de stéviol (Partie expérimentale IV.11) des échantillons sont mesurées.

En fin d'extraction, l'alimentation en vapeur d'eau de la double enveloppe est arrêtée ainsi que l'agitation, et le raffinat et l'extrait sont ensuite déchargés puis séparés, par batch successifs (20-25 kg) dans l'essoreuse centrifuge à bol RC 50 PXR (Rousselet, France) à 1500 tr/min, pendant une durée de 15 minutes. Le raffinat et l'extrait sont pesés et leurs teneurs en matière sèche sont mesurées (Partie expérimentale IV.2). L'extrait, après dilution, est analysé en CLHP pour déterminer les teneurs en glycosides de stéviol (Partie expérimentale IV.11). Les teneurs résiduelles en glycosides de stéviol dans le raffinat sont déterminées par réextraction à l'eau (Partie expérimentale IV.13).

III.1.3 Conditions opératoires

Les conditions opératoires des extractions réalisées dans le contacteur agité pilote sont rassemblées dans le Tableau III-1 :

Tableau III-1 Conditions opératoires des essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées de Stévia du Paraguay réalisés en extracteur pilote agité Tournaire

Essai	Etat des feuilles	Feuilles (kg)	Eau (kg)	*Ratio* L/S (kg/kg)	Température (°C)	Agitation (tr/min)	Durée (min)
T1	Broyées 1 mm	4,8	47,5	11,0	60	15	120
T2		14,6	138,6	10,5			
T3	Compactées	2,4	46,4	21,2			
T4		15,0	142,1	10,4			

Les masses de feuilles et d'eau introduites sont calculées de la façon suivante :

$$m_{feuilles\ introduites} = \frac{MS_{raffinat} \times m_{raffinat} + MS_{extrait} \times m_{extrait}}{MS_{feuilles\ introduites}}$$

$$m_{eau\ introduite} = m_{raffinat} + m_{extrait} - m_{feuilles\ introduites}$$

où :

- $m_{feuiles\ introduites}$ est la masse (kg) de feuilles introduites,
- $MS_{raffinat}$ est la teneur en matière sèche (kg/kg) du raffinat récupéré après séparation liquide-solide,
- $m_{raffinat}$ est la masse (kg) de ce raffinat,
- $MS_{extrait}$ est la teneur en matière sèche (kg/kg) de l'extrait récupéré après séparation liquide-solide,
- $m_{extrait}$ est la masse (kg) de cet extrait,
- $MS_{feuilles\ introduites}$ est la teneur en matière sèche (kg/kg) des feuilles introduites,
- m_{eau} est la masse (kg) d'eau introduite.

III.1.4 Influence du transfert d'échelle sur les cinétiques d'extraction

III.1.4.1 Cas des feuilles séchées et broyées de Stévia du Paraguay

Une première grande différence observable entre les échelles pilote et laboratoire est la durée de mise en suspension des feuilles dans l'eau. En effet, à l'introduction, les feuilles de Stévia séchées et broyées ont tendance à flotter en surface de l'eau du fait de leur faible densité et de l'hydrophobicité partielle des feuilles induite par la structure de la surface de la feuille (Figure II-21, Chapitre II, Partie II.2.2). A l'échelle laboratoire le brassage du milieu à l'aide d'une spatule pendant quelques secondes au début de l'extraction a permis de contourner facilement ce problème en aidant la mise en suspension des feuilles. A l'échelle pilote, ce brassage préliminaire à l'aide d'une tige métallique a pris plus de temps, de l'ordre de quelques minutes.

Malgré cette différence à l'introduction des feuilles dans le contacteur pilote, la comparaison des cinétiques d'extraction du stévioside et du rébaudioside A de l'essai pilote T1 avec celles obtenues à l'échelle laboratoire dans les mêmes conditions opératoires (feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, 60°C, L/S = 11, sous agitation : Figure III-5 et Figure III-6) montre que les vitesses d'extraction et les rendements sont quasiment identiques. Ainsi, dans le contacteur pilote, pour un faible taux de remplissage (environ 20 % du volume nominal), le mélange et le transfert de chaleur sont aussi efficaces qu'à l'échelle laboratoire. De plus, les rendements en stévioside et rébaudioside A respectivement de 5,1 et 2,7 g pour 100 g de matière sèche de feuilles, correspondant à 88,9 et 89,0 % des potentiels respectifs, seront atteints au bout de 10 minutes de temps de contact à 60°C, avec un *ratio* liquide-solide limité à 11.

L'augmentation du taux de remplissage du contacteur pilote lors de l'essai T2 (près de 60 % du volume nominal), dans les mêmes conditions opératoires, mais avec un *ratio* liquide-solide légèrement plus faible (L/S = 10,5), ne pénalise pas les rendements d'extraction atteints au bout d'une heure de temps de contact (Figure III-7 et Figure III-8). Par contre, l'évolution de la concentration des deux glycosides au cours de la première heure semble anormale, avec apparition d'un minimum autour de 20 minutes de temps de contact, se traduisant apparemment par un rendement d'extraction calculé par rapport au potentiel en glycosides de stéviol plus faible au bout de 20 minutes qu'en 10 minutes. Ce résultat, qui n'avait jamais été observé au cours de essais précédents est très probablement lié à l'augmentation du taux de remplissage de l'extracteur, en particulier de la quantité de feuilles séchées et broyées introduites, faisant apparaître un gradient de concentration des extraits du bas vers le haut de l'extracteur, avec l'accumulation de particules dans la partie haute du milieu dans la phase d'imbibition des feuilles séchées et broyées. Pour étayer cette hypothèse, rappelons qu'à 60°C, même en l'absence d'agitation, les essais réalisés à l'échelle laboratoire avec des feuilles séchées et broyées ont montré que l'équilibre d'extraction au maximum était atteint au bout de 20 minutes (Figure II-39 et Figure II-40, Chapitre II, Partie II.3.2), et que c'est aussi le cas pour l'essai T1 mené dans le contacteur pilote trois fois moins rempli. Les prélèvements pour le suivi cinétique de l'extraction étant effectués en haut du réacteur, il serait donc logique qu'ils conduisent à une surestimation de la concentration en glycosides de stéviol extraits par rapport à la concentration réelle, le milieu n'étant pas encore

homogénéisé par l'agitation dont la pale est située au fond de l'extracteur et tournant à faible vitesse de rotation. Sous cette hypothèse d'artefact au début de l'extraction, il apparaitrait que l'augmentation du taux de remplissage de l'extracteur, pour le même dispositif d'agitation et la même vitesse de rotation, ralentit l'extraction mais ne diminue pas le rendement maximum atteint au bout d'une heure. Ce ralentissement, attribué essentiellement à l'hétérogénéité de la distribution des particules de feuilles dans le milieu au début de l'extraction, pourrait être corrigé par une préimbibition des feuilles avant introduction ou mieux une modification des conditions d'agitation (ajout d'une pale d'agitation supérieure, augmentation de la vitesse de rotation, modification du sens de rotation des pales, *etc*.) assurant une meilleure dispersion des particules dans l'eau.

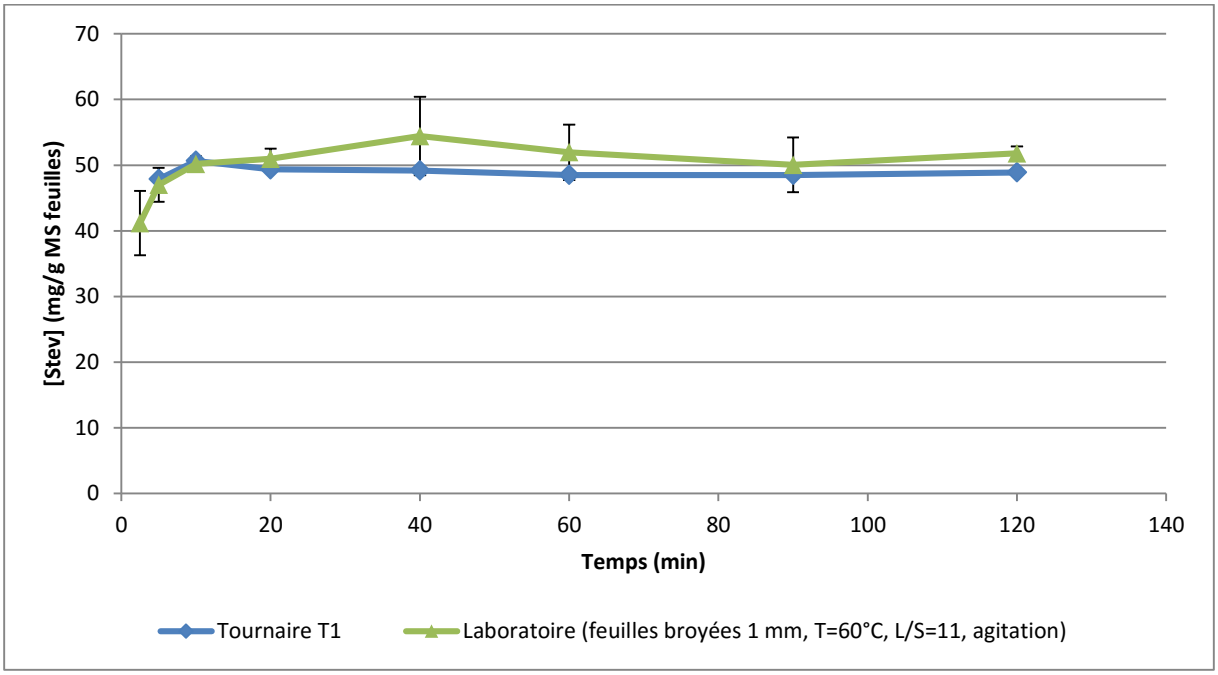


Figure III-5 Influence du transfert à l'échelle pilote, dans l'extracteur agité Tournaire, de l'extraction des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay sur la cinétique d'extraction du stévioside

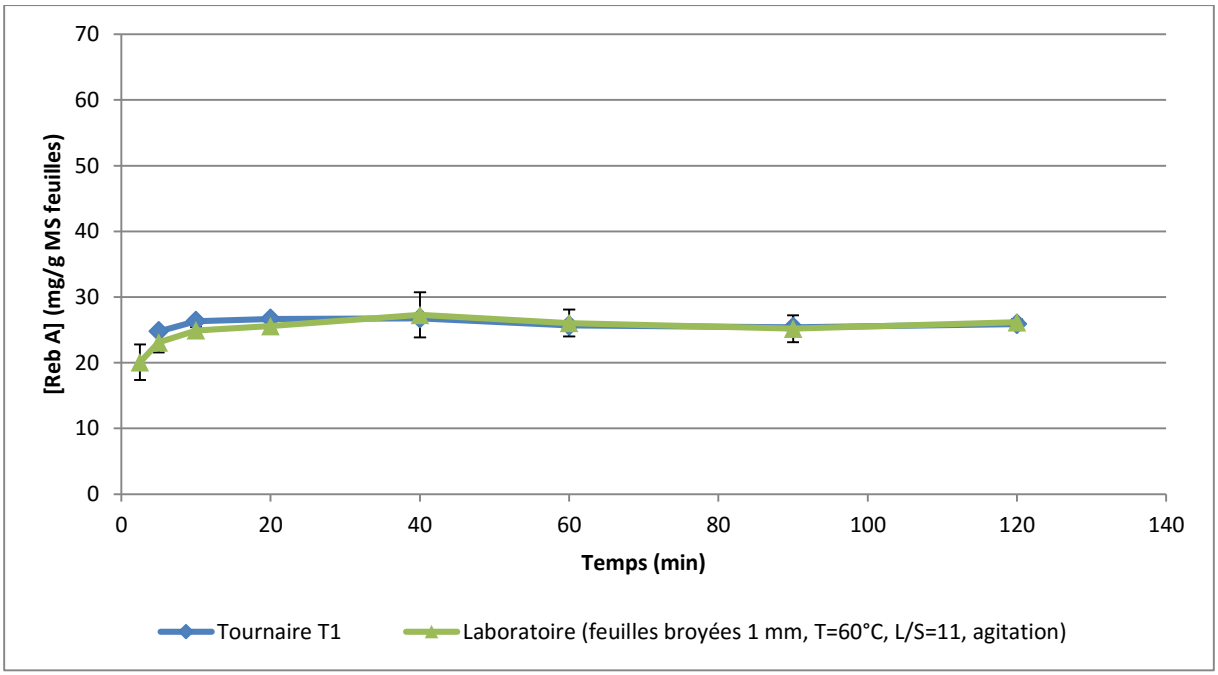


Figure III-6 Influence du transfert à l'échelle pilote, dans l'extracteur agité Tournaire, de l'extraction des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A

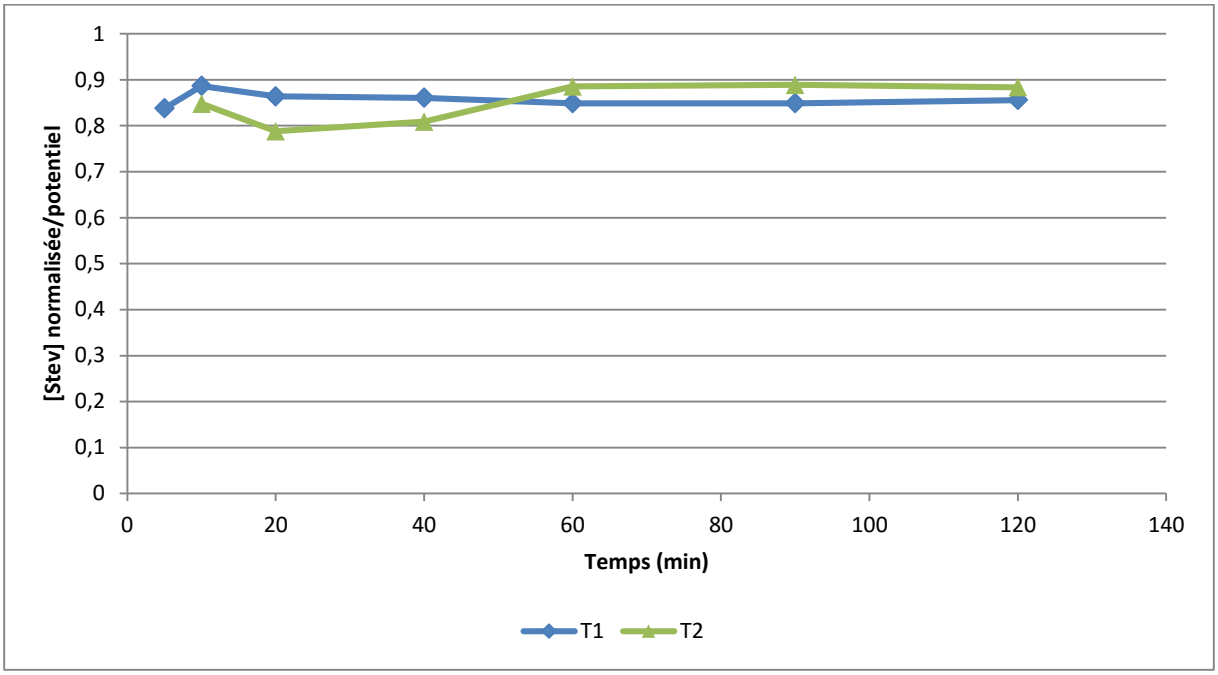


Figure III-7 Influence de l'augmentation du taux de remplissage de l'extracteur pilote agité Tournaire sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay

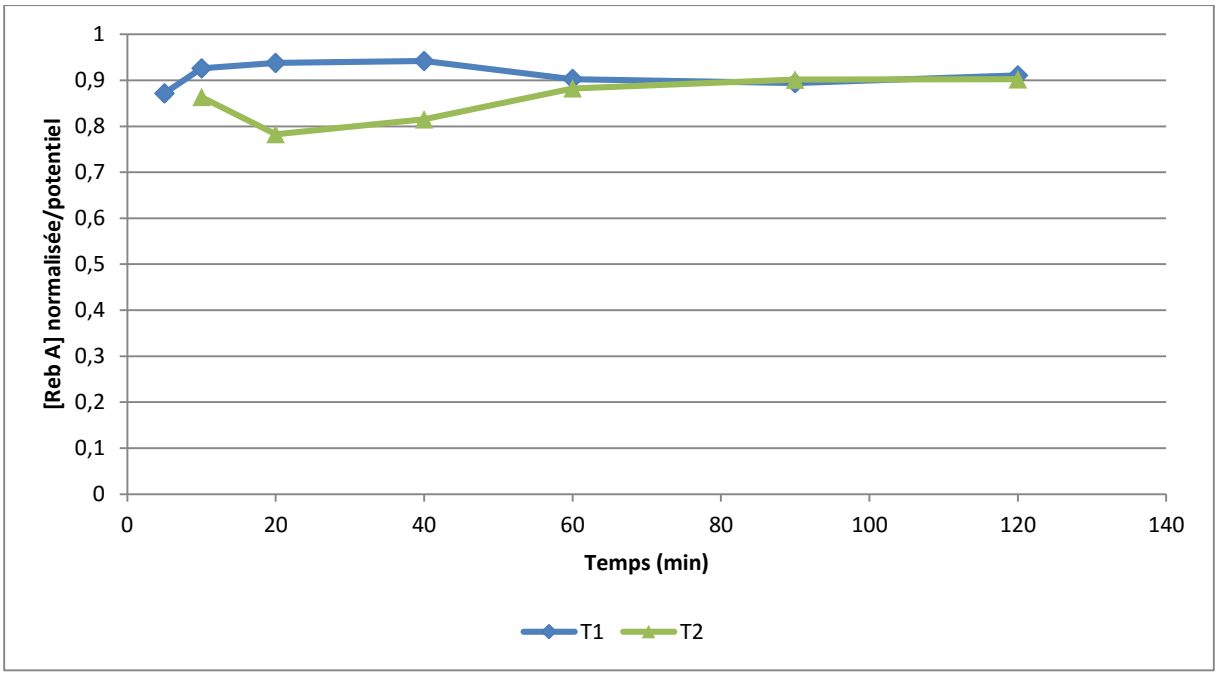


Figure III-8 Influence de l'augmentation du taux de remplissage de l'extracteur pilote agité Tournaire sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay

III.1.4.2 Cas des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay

Dans le cas des feuilles séchées et compactées mais non broyées, les cinétiques d'extraction obtenues dans le contacteur laboratoire à 60°C et avec l'agitateur magnétique, sont plus lentes, même à plus forte dilution du milieu (L/S = 22), qu'à partir des mêmes feuilles broyées (Chapitre II, Partie II.3). Un tel ralentissement de la diffusion intraparticulaire n'est plus observé dans l'extracteur pilote pour des conditions opératoires voisines (essai pilote T3, feuilles séchées et compactées, 60°C, L/S = 21,2, Figure III-9 et Figure III-10), et les rendements atteints au bout de 20 minutes de temps de contact sont équivalents à ceux obtenus avec un même taux de remplissage de feuilles broyées avec une dilution plus faible (essai pilote T1). Ceci confirme l'efficacité de mélange du contacteur pilote pour une dilution du milieu plus élevée, à faible taux de remplissage.

L'augmentation du taux de remplissage du contacteur pilote, avec les feuilles séchées et compactées ne pénalise pas significativement l'efficacité d'extraction, même à plus faible dilution du mélange, dès lors que les conditions d'introduction des feuilles sont adaptées pour obtenir une dispersion rapide. Pour ce faire, en début d'extraction, le sens de rotation de la pale d'agitation est inversé à intervalle régulier pendant plusieurs minutes. Les cinétiques d'extraction du stévioside et du rébaudioside A, obtenus à partir de prélèvements effectués à mi-hauteur du mélange, pour un taux de remplissage de 50 % et un *ratio* liquide-solide de 10,4 (essai pilote T4) sont très proches de celles obtenues à faible taux de remplissage (20 %) et une dilution deux fois plus élevée (L/S = 21,2) (essais pilotes T3 et T4 : Figure III-11 et Figure III-12) et les rendements atteints sont les mêmes au bout de 40 minutes de temps de contact.

En conclusion, les essais réalisés dans le contacteur agité pilote ont permis de souligner l'importance de l'étape de remplissage et de mise en contact initiale des feuilles et de l'eau. Le contacteur à fond plat, équipé de l'agitateur à pale raclante s'avère bien adapté pour l'homogénéisation du milieu en cours d'extraction, mais pas assez efficace pour la mise en suspension des feuilles, d'autant moins que le milieu sera concentré et le contacteur rempli. Une agitation plus turbulente de la suspension à l'introduction du solide permet d'éviter l'apparition d'un gradient de concentration en extrait au début de l'extraction. Dans ces conditions, l'efficacité d'extraction en terme de rendement en stévioside et en rébaudioside A est la même, à 60°C et pour un *ratio* liquide-solide limité à 10, au bout de 40 minutes de temps de contact, avec les feuilles séchées et compactées ou broyées. Le broyage des feuilles permet d'atteindre l'équilibre d'extraction plus rapidement qu'avec les feuilles non broyées. Cependant cet apport cinétique, qui permettra d'augmenter la productivité de l'installation d'extraction, risque d'être pénalisé d'une part par le coût de l'opération de broyage, et d'autre part par les contraintes sur la séparation solide-liquide.

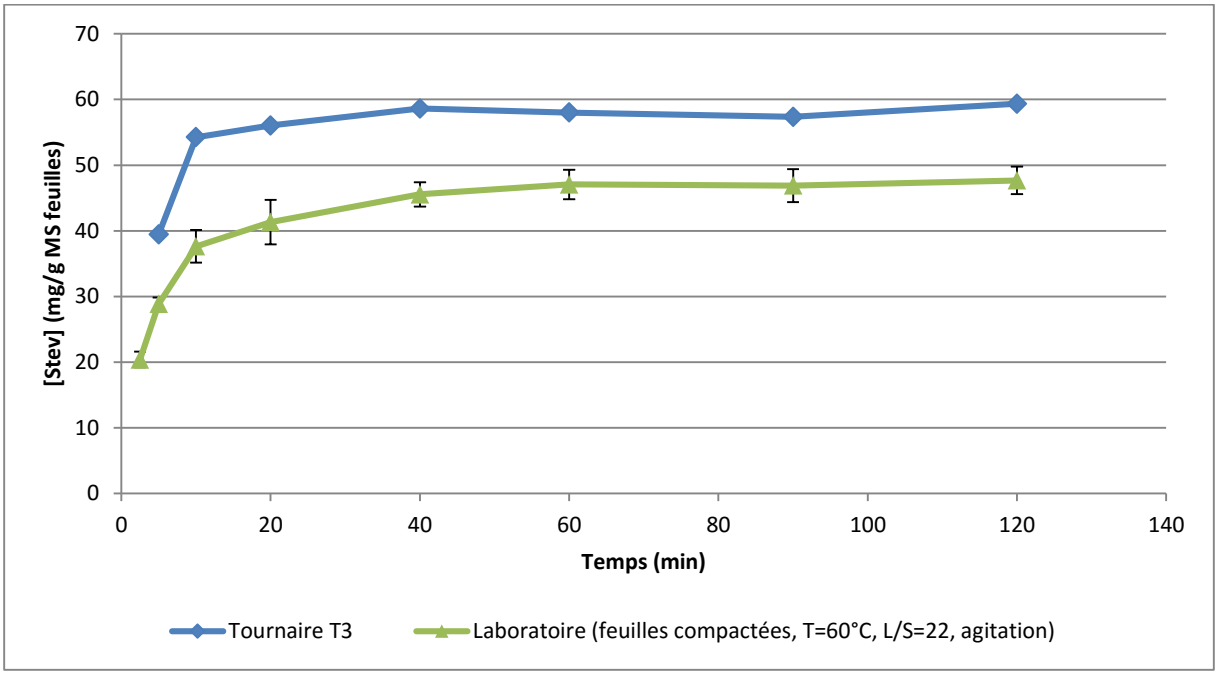


Figure III-9 Influence du transfert à l'échelle pilote, dans l'extracteur agité Tournaire, de l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay sur la cinétique d'extraction du stévioside

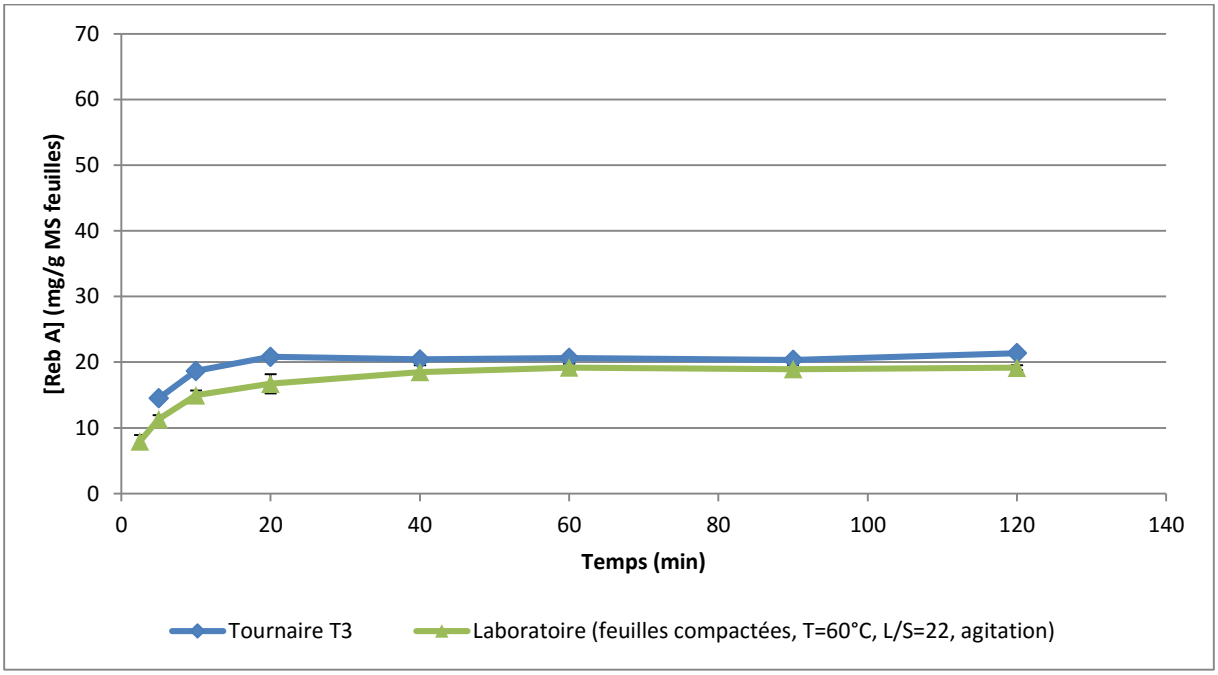


Figure III-10 Influence du transfert à l'échelle pilote, dans l'extracteur agité Tournaire, de l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A

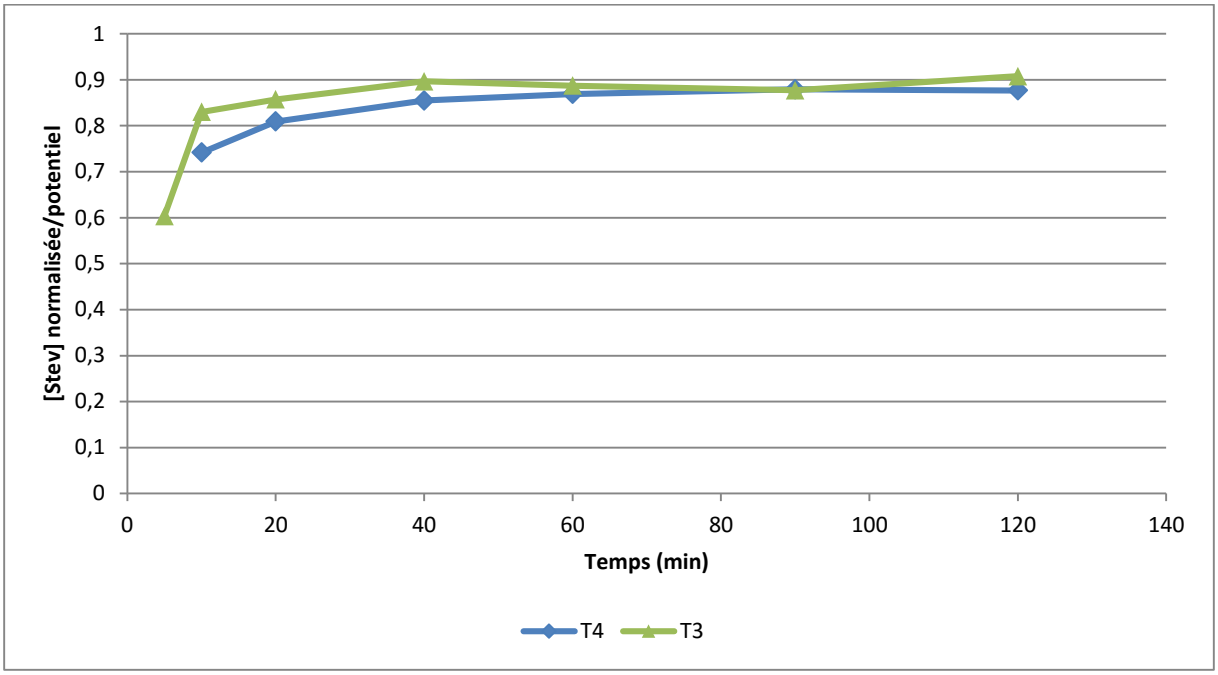


Figure III-11 Influence de l'augmentation du taux de remplissage de l'extracteur pilote agité Tournaire et de la diminution du *ratio* liquide-solide sur la cinétique d'extraction du stévioside pour feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay

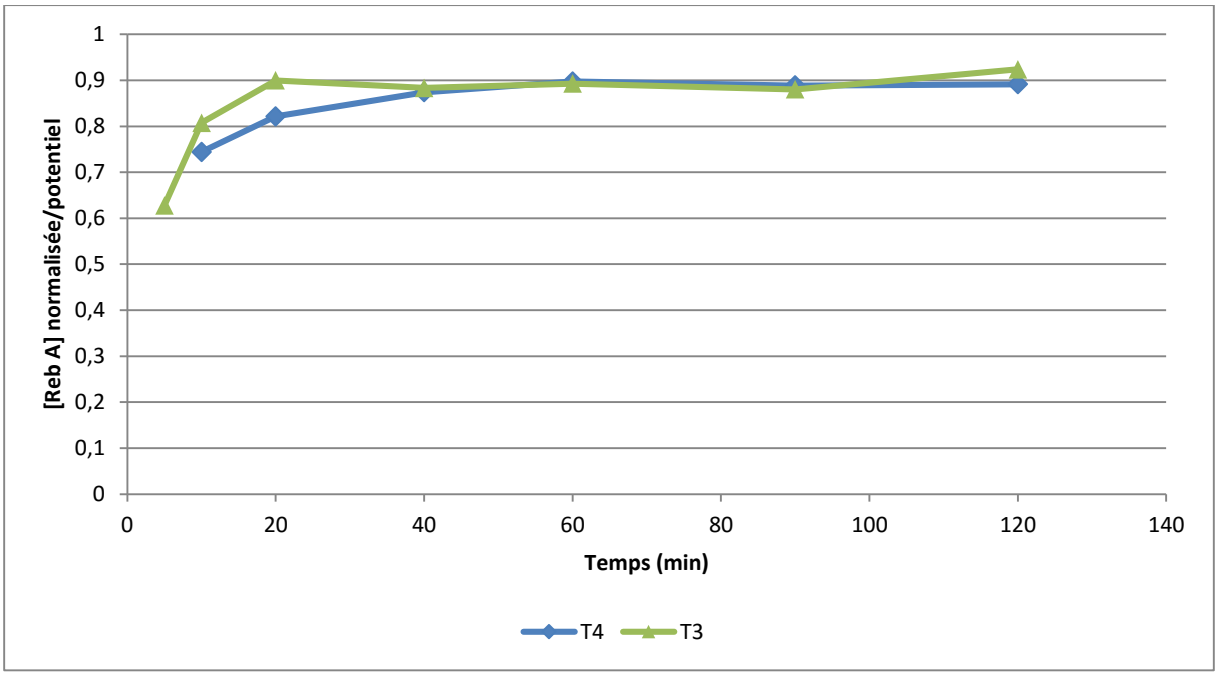


Figure III-12 Influence de l'augmentation du taux de remplissage de l'extracteur pilote agité Tournaire et de la diminution du *ratio* liquide-solide sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay

III.1.5 Influence des conditions opératoires sur les rendements en solutés récupérés dans l'extrait après séparation solide-liquide

L'étape suivante de l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia dans le contacteur agité est la séparation solide-liquide de l'extrait et du raffinat. A l'échelle laboratoire, cette séparation était réalisée par filtration simple sur une toile en nylon de porosité de 100 µm. A l'échelle pilote, pour adapter l'opération au volume d'extrait et de raffinat à traiter (50 à 170 kg) et minimiser la durée de traitement, nous avons choisi de mettre en œuvre cette étape dans une essoreuse à bol (Partie III.1.1) assurant une filtration à travers une poche en polypropylène de porosité de 1 à 10 µm sous l'effet de la force centrifuge (1500 tr/min). La centrifugeuse est chargée par 20-25 kg du milieu d'extraction obtenu au bout de 2 heures de temps de contact dans l'extracteur et la durée de centrifugation, déterminée par l'arrêt de l'écoulement du filtrat, est de l'ordre de 15 minutes en moyenne. Tous les mélanges issus des essais T1 à T4 dans le contacteur pilote agité sont ainsi traités de la même façon, par batchs successifs.

Le Tableau III-2 rassemble les masses de raffinat et d'extrait obtenus après séparation solide-liquide ainsi que leur teneur en matière sèche, permettant de calculer d'une part les rendements de séparation $\left(\frac{Masse\ d'extrait}{Masse\ d'extrait + raffinat}\right)$, et d'autre part les rendements en matière sèche extraite et séparée $\left(\frac{Masse\ d'extrait\ sec}{Masse\ de\ matière\ sèche\ d'extrait + raffinat}\right)$.

Tableau III-2 Rendements de filtration en matière sèche extraite et séparée par filtration centrifuge des milieux d'extraction pilote en contacteur agité Tournaire

Essai	Conditions d'extraction			Raffinat			Extrait			Total traité		Rendements	
	Etat des feuilles	*Ratio* L/S	Taux de remplissage	Masse (kg)	MS (g/g)	Masse sèche (kg)	Masse (kg)	MS (kg/kg)	Masse sèche (kg)	Masse (kg)	Masse sèche (kg)	Filtration (g/g)	Matière sèche (kg/kg)
T1	Broyées 1 mm	11,0	20%	8,1	32,0%	2,6	44,1	4,0%	1,8	52,2	4,4	84,5%	40,5%
T2	Broyées 1 mm	10,5	60%	28,3	30,8%	8,7	124,9	3,6%	4,5	153,2	13,2	81,5%	34,0%
T3	Compactées	21,2	20%	6,0	22,9%	1,4	42,8	1,9%	0,8	48,8	2,2	87,7%	37,2%
T4	Compactées	10,4	60%	27,6	33,0%	9,1	129,5	3,6%	4,7	157,1	13,8	82,4%	33,9%

Plusieurs points apparaissent :

- A *ratio* liquide-solide faible (L/S = 10), c'est-à-dire pour les plus fortes concentrations en solide dans le liquide, l'efficacité de l'essorage, mesurée par la teneur en matière sèche du raffinat solide obtenu après centrifugation, est voisine pour les feuilles séchées et broyées ou compactées (31 à 33 % de MS pour les raffinats T1, T2 et T4, soit 69 à 67 % d'eau résiduelle dans le raffinat). Par contre, à plus forte dilution du milieu d'extraction (essai T3, L/S = 21 pour les feuilles compactées), l'essorage apparait moins efficace (MS raffinat = 23 %). Ce résultat pourrait indiquer une plus grande difficulté à former un gâteau de filtration propice à l'écoulement de l'extrait et au pressage du raffinat par la force centrifuge avec les feuilles compactées (empilement de morceaux en forme de plaques) qu'avec les feuilles broyées (empilement de particules). Ce phénomène serait alors masqué dans le cas de l'essai T4, du fait des plus fortes contraintes mécaniques imposées aux feuilles compactées lors de l'extraction dans le contacteur agité pilote (alternance du sens de rotation de la pale en début d'extraction, taux de remplissage du contacteur élevé (60 %) et plus forte concentration en solide dans le milieu (L/S = 10)), se traduisent par une altération et un cisaillement plus important et la génération de particules de plus petite taille.

- Cette différence de matière sèche du raffinat ne se répercute pas directement sur les rendements de séparation en extrait du filtrat et c'est pour le milieu de l'essai T3, le plus dilué en solide, qu'il est logiquement le plus élevé (environ 88 %). Les teneurs en matière sèche extraite des autres essais sont deux fois plus élevées dans les filtrats, et l'augmentation de leur viscosité pourrait être responsable des moindres rendements de séparation solide-liquide (81,5 à 84,5 %).

- Au bilan, les rendements en matière sèche extraite et séparée du filtrat semblent être surtout sensibles aux conditions d'agitation dans l'extracteur agité, liées au taux de remplissage de ce contacteur. En effet, ils sont plus faibles dans le cas d'un taux de remplissage élevé, que ce soient avec les feuilles compactées ou broyées (environ 34 % pour T2 et T4) dans celui d'un faible taux de remplissage (40 % pour T1 et 37 % pour T3). La diffusion de la matière sèche soluble à 60°C dans le milieu intraparticulaire apparaitrait alors plus sensible à l'efficacité de l'agitation qu'à la dilution du milieu.

Cette conclusion n'est pas totalement confirmée pour l'extraction et la séparation des glycosides de stéviol. En effet, la comparaison des rendements en stévioside et rébaudioside A calculés à partir de leur dosage dans les extraits récupérés au filtrat (Tableau III-3) montre que les meilleurs ont été obtenus pour l'essai T3 (83,5 et 85 % respectivement pour le stévioside et le rébaudioside A) mené à plus forte dilution du milieu d'extraction, ce qui confirme l'influence importante de ce facteur sur la diffusion intraparticulaire des deux glycosides de stéviol. Par contre les rendements en stévioside et surtout en rébaudioside A sont un peu plus faibles dans le cas des essais menés à fort taux de

remplissage du contacteur (essai T2 et T4 : 79 et 80,5 % respectivement pour le stévioside et le rébaudioside A) ce qui peut être corrélé à la moindre efficacité de l'agitation dans ces conditions.

Tableau III-3 Rendements d'extraction aqueuse des feuilles séchées de Stévia du Paraguay, obtenus à l'échelle pilote avec l'extracteur agité Tournaire

Essais	Rendements d'extraction	
	Echelle Pilote Tournaire	
	Stévioside	Rébaudioside A
T1	80,9%	82,4%
T2	78,9%	80,5%
T3	83,4%	84,9%
T4	79,2%	80,7%

Les rendements d'extractions représentent ici la quantité en glycosides de stéviol effectivement récupérés dans l'extrait après séparation solide-liquide. Ainsi ces rendements sont donc impactés par l'efficacité de la séparation. Ils sont calculés de la façon suivante :

$$Rendement\ en\ stévioside = \frac{V_{extrait} \times [Stev]_{extrait}}{V_{extrait} \times [Stev]_{extrait} + T_{Stev} \times m_{raffinat} \times MS_{raffinat}}$$

Où :

- $V_{extrait\ récupéré}$ est le volume (L) d'extrait obtenu après séparation solide-liquide
- $[Stev]_{extrait}$ est la concentration en stévioside (g/L) de l'extrait
- T_{Stev} est la teneur résiduelle en stévioside (g/kg) du raffinat obtenu après séparation solide-liquide
- $m_{raffinat}$ est la masse (kg) du raffinat
- $MS_{raffinat}$ est la teneur en matière sèche (kg/kg) du raffinat

Le rendement en rébaudioside A a été calculé de la même façon en remplaçant la concentration en stévioside de l'extrait par la concentration en rébaudioside A et la teneur en stévioside du raffinat par la teneur en rébaudioside A.

III.2 Etude de l'extraction des glycosides de stéviol en extracteur Reus

De nombreux travaux ont été réalisés ces dernières années visant à montrer l'apport de l'application des ultrasons sur les milieux d'extraction de matières végétales (Vilkhu *et al.*, 2008; Chemat, 2011; Azmir *et al.*, 2013, Chapitre I, Partie I.3.4.2.1). Par les phénomènes de cavitation qu'ils génèrent dans le milieu, les ultrasons sont considérés comme une méthode d'activation efficace des échanges de matière et d'énergie pouvant déstructurer la matière végétale ainsi que faciliter l'extraction de solutés. Mis en œuvre à l'échelle laboratoire dans le cas de l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia, plusieurs auteurs (Liu *et al.*, 2010 ; Periche *et al.*, 2015a) ont montré une amélioration des rendements en glycosides de stéviol extraits à chaud (50 à 90°C) et pour des temps de contact réduits (1 à 40 min) sous ultrasons ; et pour le moins une extraction équivalente avec ou sans ultrason mais à froid (Alupului et Lavric, 2008).

Notre objectif a donc été d'évaluer l'apport de la mise en œuvre d'une assistance par les ultrasons dans un contacteur solide-liquide pilote adapté pour l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia, sans apport thermique.

III.2.1 Description de l'installation et protocole d'extraction

Le contacteur est un équipement d'extraction solide-liquide assisté par ultrasons fournis par la société Reus (Figure III-13). La cuve cylindrique à fond plat, qui peut être thermostatée par circulation d'un fluide caloporteur dans la double enveloppe, est équipée d'un dispositif hexagonal d'émission d'ultrasons (P = 1600 W, fréquence = 23 kHz) et d'une pale d'agitation (Figure III-14). Le volume nominal de l'appareil est de 200 L.



Figure III-13 Extracteur Reus

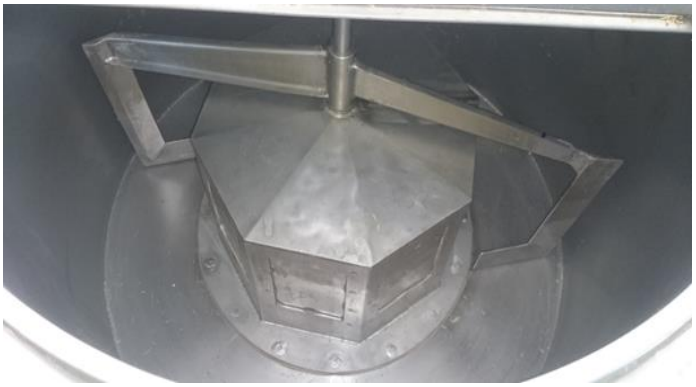


Figure III-14 Pale d'agitation et dispositif hexagonal d'émission d'ultrasons de l'extracteur Reus

L'eau puis les feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay sont introduites dans le contacteur, avec une assistance initiale au brassage pour faciliter l'immersion des feuilles puis éventuellement à leur mise en mouvement par la pale d'agitation. Les prélèvements du milieu sont effectués à 3, 5, 10, 20, 40 et 60 minutes, filtrés sur toile en nylon de 100 µm et dosés pour déterminer leur teneur en stévioside et rébaudioside A (Partie expérimentale IV.11).

En fin d'extraction, le milieu est transféré dans l'essoreuse centrifuge à bol RC 50 PXR (Rousselet, France) équipé d'une poche filtrante en polypropylène de porosité 1-10 µm. Le filtrat clair obtenu par batchs successifs (20-25 kg, 15 min à 1500 tr/min) est pesé, sa matière sèche déterminée (Partie expérimentale IV.2) ; le stévioside et le rébaudioside A sont dosés (Partie expérimentale IV.11). La masse et la matière sèche du raffinat solide sont mesurées (Partie expérimentale IV.2) et leur teneur en glycosides de stéviol déterminée après réextraction aqueuse (Partie expérimentale IV.13).

III.2.2 Conditions opératoires et résultats expérimentaux

Trois essais comparatifs ont été réalisés dans le contacteur pilote Reus (Tableau III-4) dans des conditions voisines de *ratio* liquide-solide et de taux de remplissage, sans apport thermique (température de l'eau introduite = 21°C (température ambiante)) et pour des temps de contact de 60 minutes : en macération simple (US1 : sans agitation ni ultrason), sous agitation permettant de brasser le milieu solide-liquide (US2 : 9 tr/min et sans ultrason), et sous assistance des ultrasons avec brassage du milieu solide-liquide (US3 : 9 tr/min et application des ultrasons par séquence de 15 minutes espacées de 5 minutes).

En conditions de macération simple, sans agitation ni ultrason, les feuilles séchées et compactées de Stévia sont moins déstructurées par effet mécanique, conduisant après séparation à un raffinat solide plus sec (29 % de matière sèche) et un rendement en filtrat élevé, bien que le *ratio* liquide-solide de l'extraction ait été plus faible (US1 : L/S = 17,1) que pour les autres essais (L/S = 17,9

pour US2 et L/S = 20,5 pour US3). Au bout d'une heure de macération dans le contacteur à température ambiante, 26 % de la matière sèche des feuilles est extraite et séparée par filtration centrifuge, et les rendements en stévioside et rébaudioside A sont limités à 55 %, plus faibles, du fait de la dilution moins élevée, que ceux obtenus à partir des cinétiques d'extraction au stade laboratoire pour un *ratio* L/S de 44 (environ 70 %, Figure II-39 et Figure II-40, Chapitre II, Partie II.3.1).

La mise en route de la pale d'agitation raclante, à faible vitesse de rotation, destinée à mieux répartir le solide dans le milieu liquide, se traduit par un rendement en matière sèche extraite plus élevé (près de 29 %), bien que le rendement en extrait filtré soit légèrement plus faible (84 %) laissant plus d'eau dans le raffinat solide centrifugé (24 % de matière sèche). Ce dernier point pourrait s'expliquer par un effet de broyage partiel des feuilles sous l'action de la pale raclante, la dimension de la taille des particules étant avérée moins favorable à l'efficacité de l'essorage du raffinat lors des essais de filtration centrifuge des milieux issus de l'extraction en contacteur pilote agité (Partie III.1.5). Cependant la légère augmentation du *ratio* liquide-solide (L/S = 17,9) et l'agitation du milieu favorise l'extraction de matière sèche et surtout les rendements en stévioside et en rébaudioside A, qui augmentent de près de 12 % par comparaison avec la macération au bout d'une heure de contact. Ce résultat est cohérent avec les observations précédentes sur l'apport d'une agitation du milieu d'extraction.

Pour un *ratio* liquide-solide plus élevé, proche de 20, l'application des ultrasons au mélange maintenu sous agitation dans les mêmes conditions que précédemment s'avère favorable au rendement de filtration (augmentation de 3 % de la masse d'extrait filtré) avec un essorage du solide plus efficace (25 % de matière sèche dans le raffinat), quoi qu'encore inférieur à celui du raffinat de macération (29 %). De plus, le rendement en matière sèche extraite et séparée au filtrat augmente effectivement de 3 % par rapport à la macération. L'action combinée du brassage du milieu et des ultrasons provoquerait une plus grande déstructuration des feuilles, propice à la solubilisation de plus de matière sèche et en particulier des glycosides de stéviol (65 % de rendement d'extraction et de séparation pour les 2 glycosides), par comparaison avec la macération simple (55 % de rendement dans l'extrait filtré).

Cependant, l'apport spécifique de l'application des ultrasons pour la cinétique de diffusion intraparticulaire des deux glycosides de stéviol est moins évidente (Figure III-15 et Figure III-16). En effet, leur extraction reste pratiquement aussi lente que celle de la macération sans apport thermique, et les gains de rendement observés aux différents temps d'extraction sous ultrasons sont peu significatifs par rapport à l'extraction menée sous agitation. Ces résultats sont conformes à ceux décrits par Jaitak *et al.* (2009), qui ont même observé une diminution de rendement en stévioside dans le cas de l'extraction assistée par ultrasons.

En conclusion, il apparait que dans les conditions de mise en œuvre du contacteur pilote Reus, c'est l'homogénéisation du milieu par la pale d'agitation raclante qui a un effet prépondérant, et que l'application des ultrasons n'accélère pas significativement l'extraction et ne compense pas l'absence d'un apport thermique pour les rendements en glycosides de stéviol. Bien que ces résultats ne permettent pas de remettre en cause l'effet des ultrasons observé par plusieurs auteurs à des

températures d'extraction aqueuse de feuilles de Stévia plus élevés (50-90 °C, Liu *et al*., 2010 ; Periche *et al.*, 2015a), les gains de rendement en stévioside et en rébaudioside A attendus pour une telle assistance à l'extraction risquent d'être fortement pondérés par plusieurs points :

- un *ratio* liquide-solide élevé : la mise en œuvre d'une assistance efficace par les ultrasons impose une dilution du solide dans le solvant d'extraction. A titre d'exemple, les recommandations données par le constructeur de l'équipement pilote Reus préconisent de ne pas dépasser pour la matière végétale 30 % du volume de solvant, ce qui correspondrait à un *ratio* liquide-solide de l'ordre de 40. Rappelons que le facteur de dilution pénalise le coût énergétique de traitement du milieu ainsi que le dimensionnement des installations pour une production donnée,

- le coût énergétique et des installations : à 60°C et pour une agitation efficace et une dilution du milieu limité (L/S = 10), les rendements en stévioside et en rébaudioside A atteints au bout de 60 minutes de temps de contact dans l'extracteur pilote agité sont d'environ 80 % (Partie III.1.5). Le gain en rendement et en temps de contact obtenu par application des ultrasons devra être suffisamment élevé pour compenser le surcoût énergétique de génération des ultrasons et le surcoût des équipements ainsi que celui du facteur de dilution imposé.

Tableau III-4 Extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans le contacteur pilote Reus et séparation solide-liquide par filtration centrifuge dans l'essoreuse Rousselet

Essai	Extraction solide-liquide					
	Agitation[a]	Ultrasons[b]	Masse de matière sèche de feuilles (kg)	Masse totale d'eau (kg)	*Ratio* L/S (kg/kg)	Taux de remplissage (% volume nominal)
US1	Sans	Sans	4,4	75,1	17,1	40 %
US2	Avec	Sans	4,1	74,0	17,9	39 %
US3	Avec	Avec	4,1	84,1	20,5	44 %

[a]Agitation = 9 tr/min

[b]Ultrasons = 3 séquences de 15 minutes toutes les 20 minutes

Essai	Séparation solide-liquide									
	Raffinat			Extrait			Rendements			
	Masse (kg)	MS (kg/kg)	Masse sèche (kg)	Masse (kg)	MS (kg/kg)	Masse sèche (kg)	Filtration	Extrait	Stévioside	Rébaudioside A
US1	11,6	29,2 %	3,4	67,8	1,7 %	1,2	85 %	26%	55 %	55 %
US2	12,2	24,0 %	2,9	65,8	1,8 %	1,2	84 %	29%	67 %	68 %
US3	11,5	25,2 %	2,9	76,8	1,6 %	1,2	87 %	29%	65 %	65 %

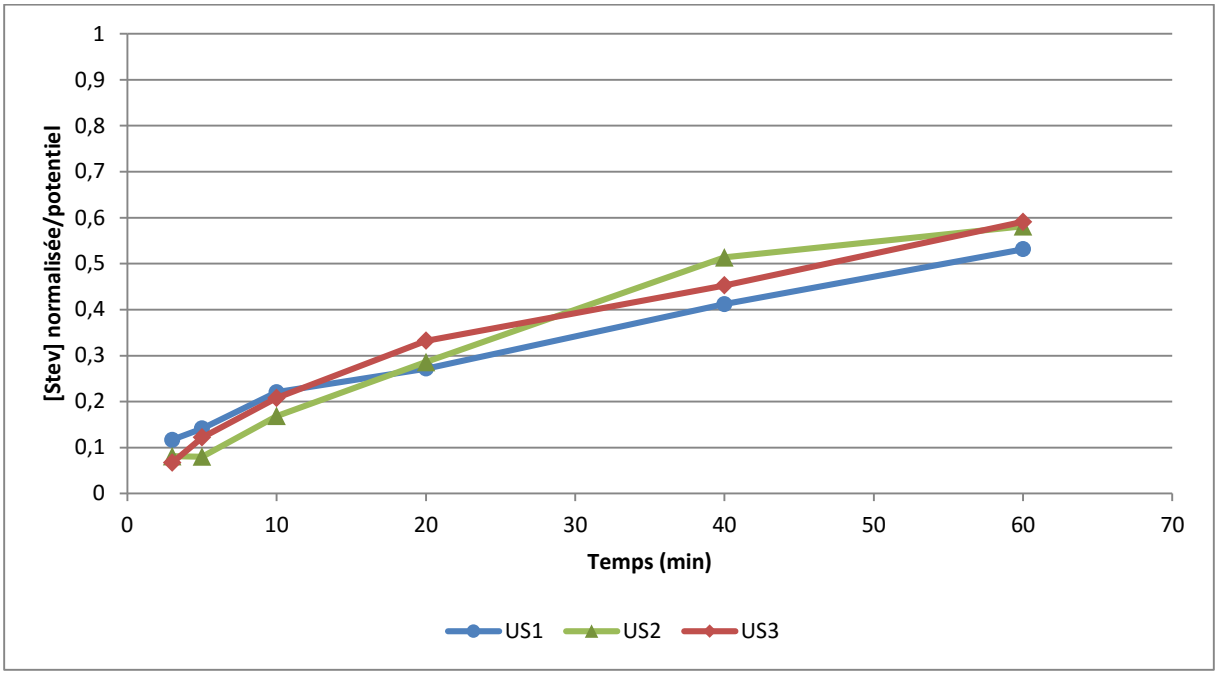


Figure III-15 Influence des conditions opératoires, dans l'extracteur pilote Reus, sur la cinétique d'extraction du stévioside pour les feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay

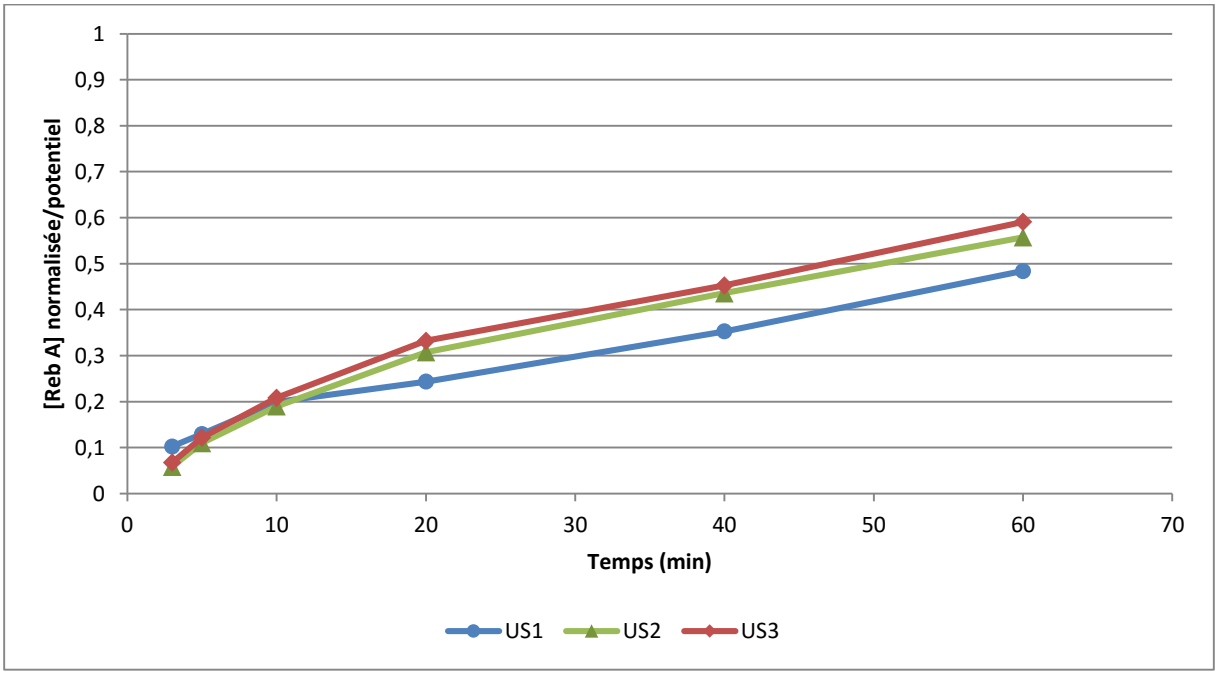


Figure III-16 Influence des conditions opératoires, dans l'extracteur pilote Reus, sur la cinétique d'extraction du rébaudioside A pour les feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay

III.3 Etude de l'extraction des glycosides de stéviol en extracteur bi-vis

La technologie bi-vis, développée initialement autour d'application type pour l'industrie des plastiques (polymérisation et mélange des polymères, compoundage, extrusion en filière, *etc*.), pour l'industrie agroalimentaire (cuisson extrusion des amylacés, texturation des protéines, formulation d'aliments pour animaux, *etc.*) et pour l'industrie papetière (pâtes à papier thermomécanique et thermomécanochimique) fourni aujourd'hui des équipements pilotés et industriels de type extrudeur bi-vis, dont la modularité permet de les adapter pour réaliser en continu la quasi-totalité des opérations unitaires mises en jeu dans les procédés de fractionnement des matières végétales, de leur préparation (broyage, défibrage, déstructuration thermomécanique, pulpage, *etc*.) à l'extraction solide-liquide et la séparation en un extrait sous forme d'un filtrat et un raffinat solide, appelé extrudat qui peut être mis en forme par extrusion dans une filière. L'adaptation de la configuration du fourreau de l'extrudeur et du profil de vis qui y est installé permet d'intensifier les actions mécaniques, thermiques et chimiques nécessaires à chacune des opérations et de les enchaîner et combiner en continu dans un seul appareillage. Largement étudiée pour le fractionnement de multiples matières végétales au Laboratoire de Chimie Agroindustrielle (Evon, 2008 ; Zeitoun, 2011 ; Colas, 2012 ; Celhay, 2013), notre objectif est ici d'évaluer l'adaptation de cette technologie d'extrusion bi-vis à l'extraction et la séparation des glycosides de stéviol des feuilles de Stévia.

III.3.1 Description de l'installation pilote

III.3.1.1 Extracteur bi-vis BC21

L'extracteur bi-vis pilote mis en œuvre pour cette étude est de type extrudeur BC21 (Clextral, France) (Figure III-17). Il est constitué de deux vis (Figure III-18) parallèles et identiques, co-rotatives et co-pénétrantes, tournant à la même vitesse dans un fourreau modulable bilobé. Ces deux vis sont portées par deux arbres parallèles, distancés de 21 mm entre leurs 2 axes. Le fourreau (Figure III-19) est constitué de 7 modules de 10 cm de long, chacun étant assemblé au suivant par un collier. Le module 1 possède, sur sa partie haute, une ouverture de forme rectangulaire, de 3,5 cm de largeur et 5 cm de longueur, qui permet l'introduction de la matière végétale (Figure III-19). Le module 6 est ouvert de chaque côté pour l'écoulement de l'extrait par filtration grâce à 4 coquilles demi-sphériques (2 de chaque côté), percées par des orifices de 1 mm de diamètre (Figure III-19). Tous les modules sont équipés d'une petite ouverture sur chacun des côtés afin de permettre une introduction de liquide ou un dégazage (Figure III-20). Ils peuvent être thermorégulés par un système de chauffage résistif et un système de refroidissement par l'eau est piloté par des électrovannes. Les deux vis sont entraînées par un moteur alimenté par un courant continu dont la vitesse peut être modulée par l'intermédiaire d'un boîtier de réduction. La vitesse maximale du moteur, de 2000 tr/min, est réduite par le groupe d'entraînement des arbres à 628 tr/min.

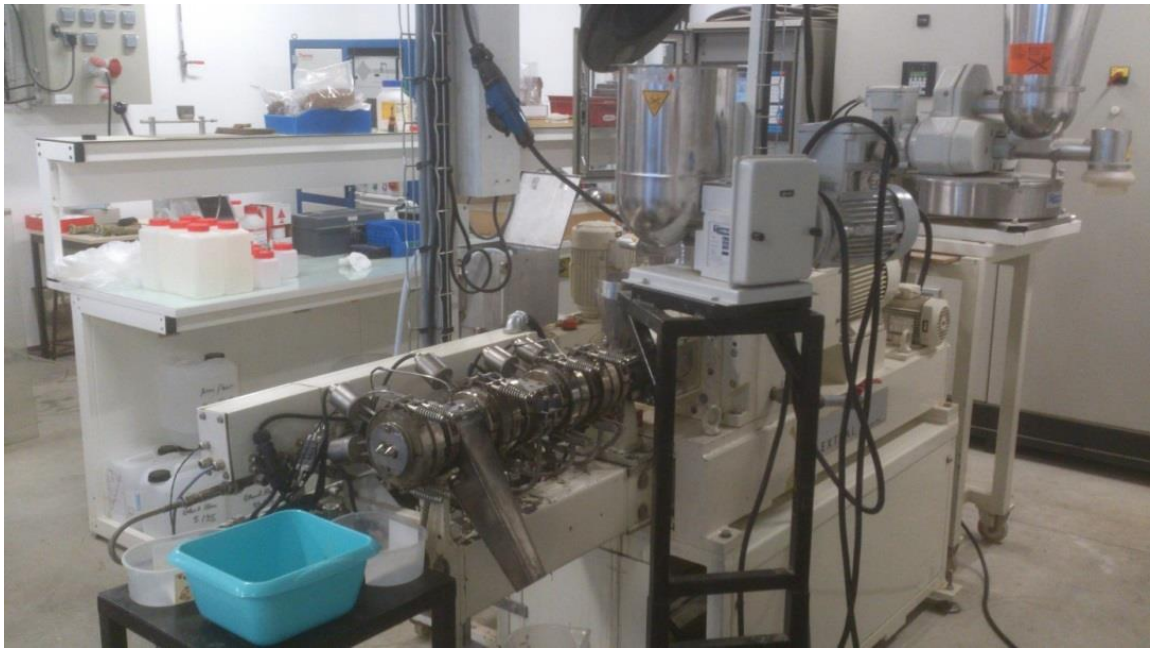


Figure III-17 Photographie de l'extracteur bi-vis BC21

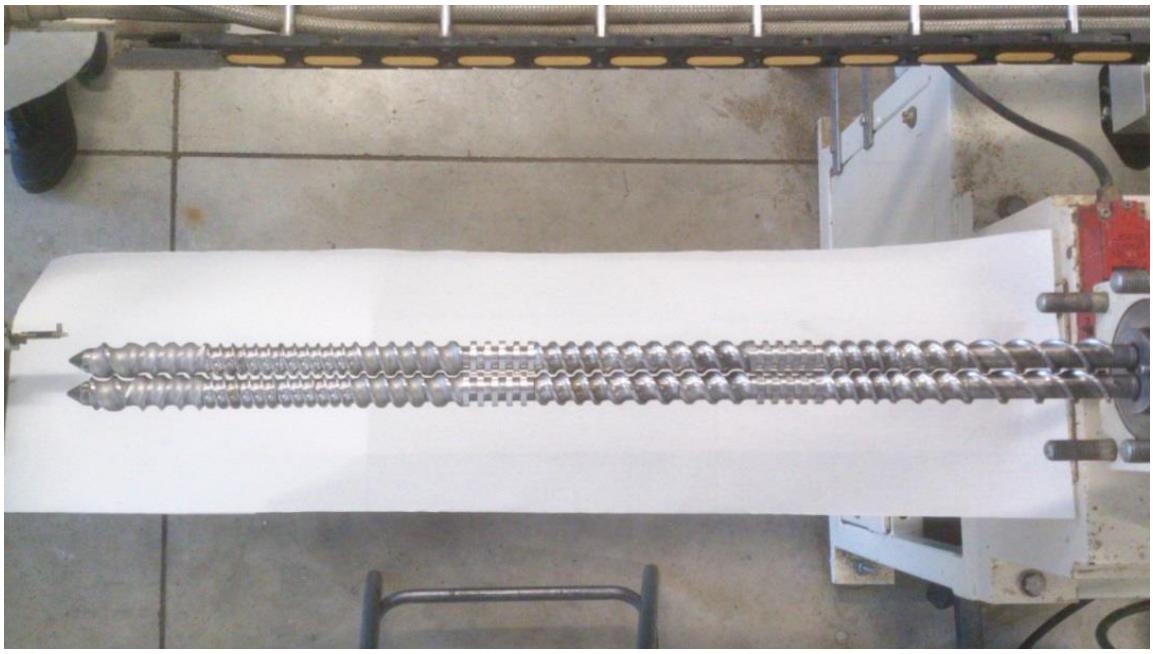


Figure III-18 Photographie d'un profil de vis de l'extracteur bi-vis BC21

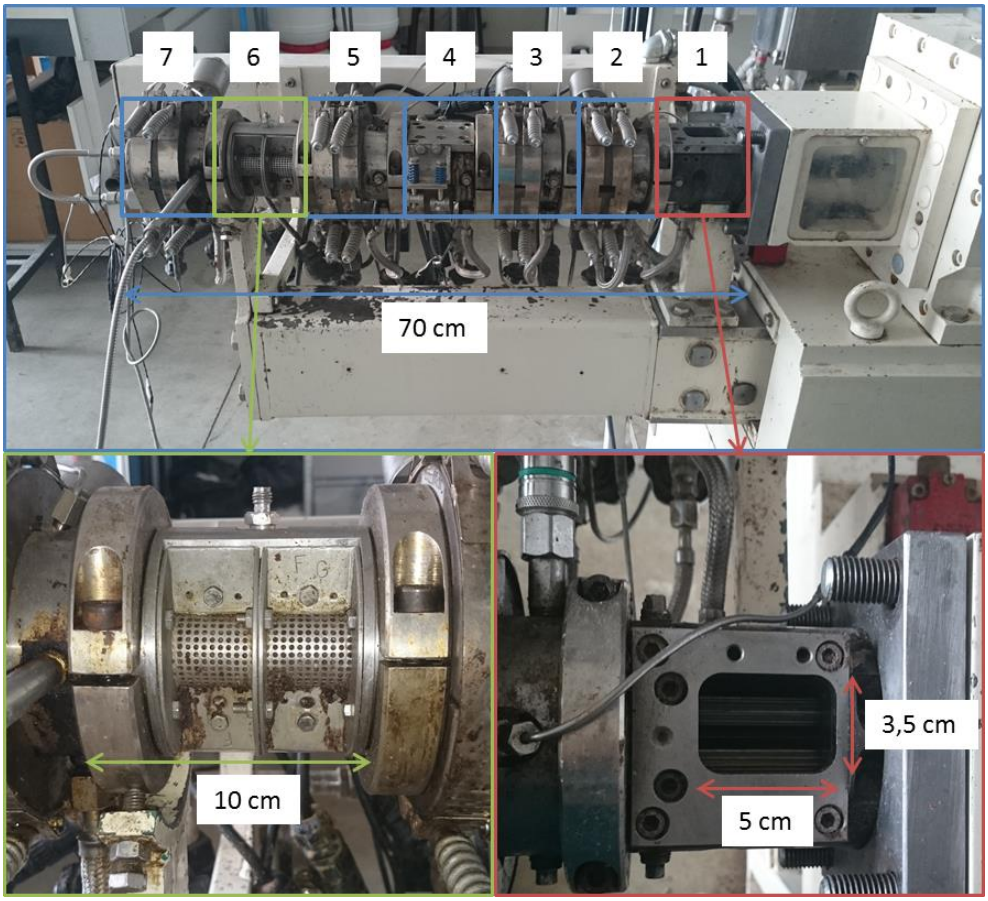


Figure III-19 Photographies du fourreau à 7 modules de l'extracteur bi-vis BC21 (encadré bleu), de son module 6 (encadré vert) et de son module 1 (encadré rouge)



Figure III-20 Photographie de l'ouverture d'un module de l'extracteur bi-vis permettant l'introduction de solvant

III.3.1.2 Configurations du fourreau et du profil de vis installés

La configuration du fourreau et du profil de vis de l'extracteur BC-21 sont choisis pour mettre en place 3 zones fonctionnelles où s'exercent successivement les opérations élémentaires suivantes (Figure III-21) :

- modules 1 à 2 : introduction et convoyage de la matière végétale, avec possibilité de broyer la matière végétale et d'effectuer un premier apport de solvant,
- modules 3 à 5 : extraction solide-liquide par mise en contact du solide et du liquide sous contrainte de cisaillement puis lavage de la matière végétale par apport de solvant supplémentaire,
- modules 6 à 7 : séparation solide-liquide par pressage et filtration de l'extrait.

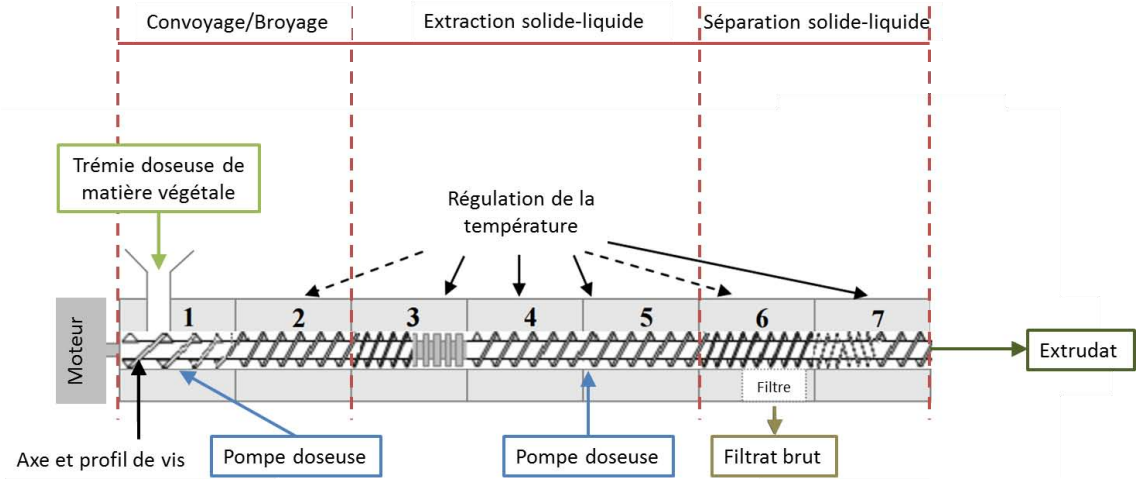


Figure III-21 Représentation schématique du fonctionnement de l'extracteur bi-vis BC21

III.3.1.3 Trémie d'alimentation de la matière végétale

Pour introduire la matière végétale, une trémie doseuse KCL-KT20 (K-TRON, France) a été utilisée (Figure III-22). Elle dispose de deux vis sans fin parallèles et d'un système « anti-voûtage », qui sont entraînés par un moteur à vitesse modulable. Elle possède un volume nominal de 11 L, les vis ont une vitesse maximale de 50 tr/min et le moteur a une puissance de 0,55 kW. L'écoulement de la matière végétale dans la trémie dépend de la taille des particules, de leurs masses, de leur homogénéité et de leur teneur en matière sèche. Il est donc nécessaire d'étalonner la trémie avant chaque extraction.



Figure III-22 Photographies de la trémie doseuse KCL-KT20

III.3.1.4 Pompe d'alimentation de solvant

Pour alimenter le solvant, une pompe volumétrique à piston super K PP16 (DKM, France) et une pompe volumétrique à piston K20 2 PP16 (DKM, France) sont utilisées (Figure III-23). La première a un débit maximal de 33 L/h avec une pression maximale de 10 bar et une puissance de 0,37 kW ; et la deuxième a un débit maximal de 20 L/h avec une pression maximale de 10 bar et une puissance de 0,37 kW.



Figure III-23 Photographie de la pompe volumétrique à piston super K PP16 (A) et la pompe volumétrique à piston K20 2 PP16 (B)

III.3.2 Protocole d'extraction

L'enchainement des modules définissant la configuration du fourreau étant assemblés, le profil de vis est monté sur les arbres de l'extracteur bi-vis BC21 en position ouverte de ce fourreau. La trémie doseuse est étalonnée avec des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay : 10 points de débit (kg/h) sont réalisés en faisant tourner les vis de la trémie durant 5 minutes à une vitesse donnée et en rapportant la masse en sortie de trémie à la durée de fonctionnement. La droite d'étalonnage tracée avec en abscisse la consigne de la trémie et, en ordonnée le débit solide, permet de définir la consigne de la trémie à sélectionner pour le débit souhaité. L'étalonnage des pompes volumétriques à piston est réalisé de façon similaire avec de l'eau.

Après fermeture du fourreau, le système de thermorégulation des modules est déclenché afin de chauffer les modules à la température consigne des modules du fourreau. La rotation des vis est

mise en route à la vitesse consigne pour l'extraction. Les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay sont ensuite introduites dans le module 1, à l'aide de la trémie doseuse, avec le débit consigne de l'extraction. En parallèle, l'eau est injectée grâce aux pompes volumétriques à piston, selon les expériences, dans les modules 1, 2, 4 ou 5, aux débits consignes de l'extraction.

Après la mise en régime de l'installation contrôlée par la formation d'un bouchon dynamique dans la zone de pressage de la matière assurant des débits de filtrat brut (extrait) et d'extrudat (raffinat), à température et pression stables, des prélèvements de filtrat brut et de raffinat sont effectués sur des durées de 10 min. Le filtrat brut est refroidi à 4°C puis avec l'extrudat ils sont pesés. Le filtrat brut est filtré sur toile en nylon de porosité de 100 µm, afin de retirer les plus grosses particules solides, puis a été centrifugé dans une centrifugeuse 6-16K (Sigma, France), à 8000 g, pendant 10 min et à 10°C pour retirer les dernières particules solides. Les résidus solides produits lors de ces deux étapes de séparation solide-liquide sont regroupés et pesés. Nous avons nommés ces particules solides : « pied ». L'extrait clarifié, appelé : « filtrat clair », est aussi pesé. Les teneurs en matière sèche du raffinat, du pied et du filtrat clair sont déterminées (Partie expérimentale IV.2). L'extrudat et le pied sont réextraits à l'eau (Partie expérimentale IV.13) et les teneurs en glycosides de stéviol des extraits produits et du filtrat clair sont dosées par CLHP (Partie expérimentale IV.11).

La Figure III-24 récapitule l'ensemble des opérations :

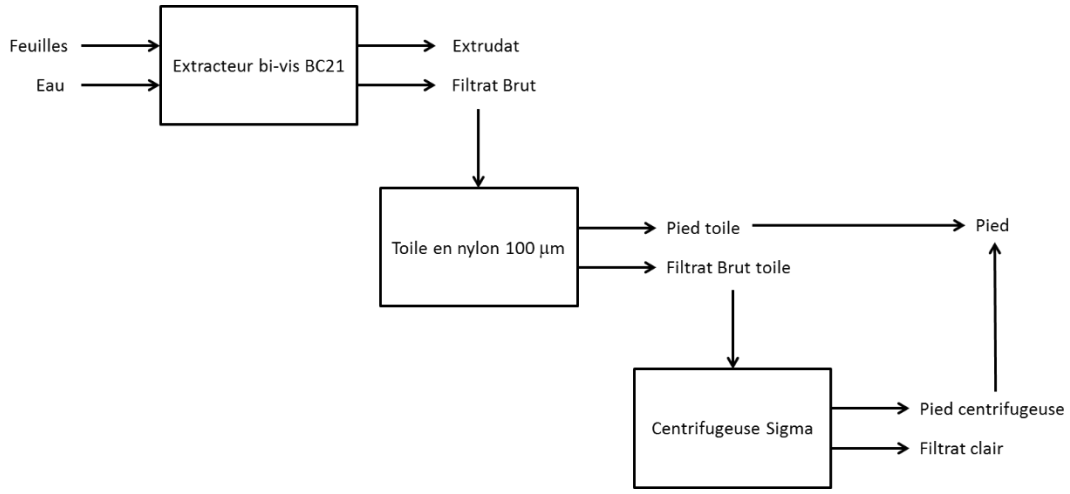
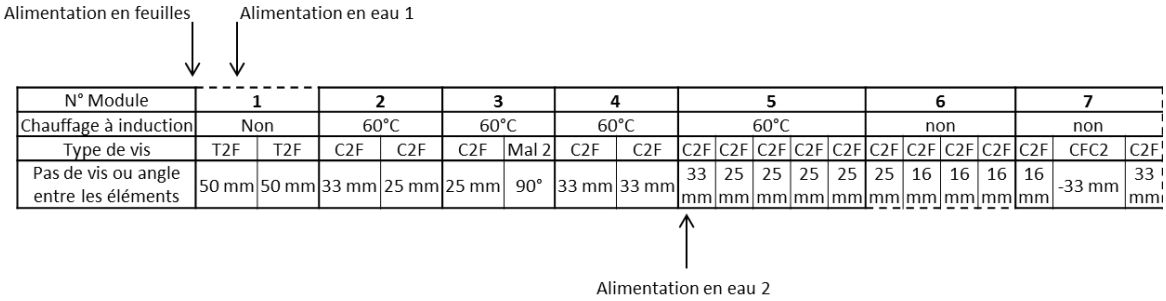


Figure III-24 Représentation schématique du fractionnement des feuilles de Stévia par extraction aqueuse en extracteur bi-vis BC21

III.3.3 Conditions opératoires des essais

Les essais de faisabilité de l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia en extracteur bi-vis BC21 permettant d'atteindre un régime stable de fonctionnement ont été menés avec le profil de vis rapporté dans la Figure III-25.



N° Module	1		2		3		4		5					6				7		
Chauffage à induction	Non		60°C		60°C		60°C		60°C					non				non		
Type de vis	T2F	T2F	C2F	C2F	C2F	Mal 2	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F
Pas de vis ou angle entre les éléments	50 mm	50 mm	33 mm	25 mm	25 mm	90°	33 mm	33 mm	33 mm	25 mm	25 mm	25 mm	25 mm	25 mm	16 mm	16 mm	16 mm	16 mm	-33 mm	33 mm

Figure III-25 Première configuration du profil de vis de l'extracteur bi-vis BC21 pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay (types de vis : T2F = double-filet trapézoïdal, C2F : double-filet conjugué, Mal 2 : disque malaxeurs bilobes, CF2F : contre-filets en double-filet conjugué)

Dans cette configuration, les étapes qui se succèdent le long du profil de vis sont les suivantes :

- les feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm de Stévia du Paraguay sont introduites par la trémie doseuse dans le module 1 avec de l'eau, de sorte que le *ratio* liquide-solide soit égal à 1. Le mélange est convoyé par les vis en double-filet de type trapézoïdal à pas direct T2F (50 mm) (Figure III-26A) vers le module 2,

- puis le mélange est convoyé et comprimé par les vis à double-filet de type conjugué à pas direct C2F décroissant (33 puis 25 mm) (Figure III-26B) vers le module 3,

- les disques malaxeurs bilobes Mal 2 (Figure III-26C), montés avec un angle de 90°, assurent un mélange sous contrainte de cisaillement des feuilles et de l'eau dans le module 3,

- le mélange est ensuite convoyé du module 4 jusqu'au module 5 par des vis de convoyage C2F (33 mm) où un deuxième apport d'eau est effectué de sorte que le *ratio* liquide-solide global de consigne d'extraction soit respecté,

- le mélange est encore convoyé et comprimé par des vis de convoyage C2F à faible pas (33 puis 23 puis 16 mm) jusqu'au module 6 où le filtrat brut s'écoule au travers du dispositif de filtration,

- les vis de contre-filet conjugué double filet, à pas inverse, CFC2 (-33 mm) (Figure III-26D) appliquent une contrepression vis-à-vis de la matière arrivant dans cette zone, entraînant la formation d'un bouchon dynamique qui exerce une action de pressage de la matière dans le module 7. La matière pressée est finalement évacuée du fourreau par des vis de convoyage C2F (33 mm).



Figure III-26 Eléments de vis de l'extracteur bi-vis BC21 (A) T2F 50 mm (B) C2F 33 mm (C) Mal 2 90° (D) CFC2 33 mm

Sur la base des résultats obtenus avec ce premier modèle de vis, la configuration a été modifiée (Figure III-27) pour permettre l'étude de l'influence des différents facteurs et intensifier les contraintes mécaniques exercées sur la matière :

- la première injection d'eau est effectuée au début du module 2, pour limiter les risques d'engorgement par l'eau à l'introduction du solide dans le module 1 dans le cas d'une augmentation des débits,

- les disques malaxeurs bilobes sont placés au début du module 3, pour assurer le mélange feuilles-eau le plus rapidement possible sans favoriser une remontée d'eau vers le module 1,

- la deuxième injection d'eau est effectuée au début du module 4, pour augmenter la zone de lavage du solide (modules 4 et 5),

- une deuxième série de disques malaxeurs bilobes sont placés au début du module 5 afin d'intensifier le mélange solide-liquide sous contrainte de cisaillement,

- le pas du contre filet CF2C est réduit à -25 mm, pour intensifier le pressage de la matière.

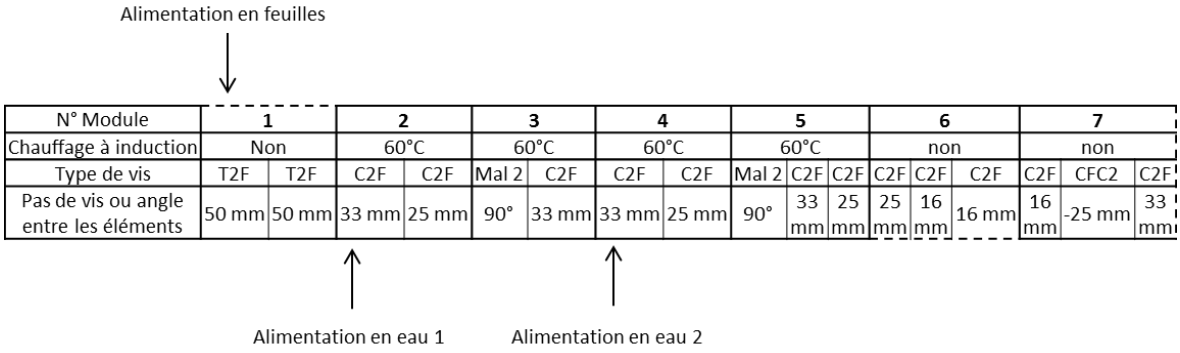


Figure III-27 Deuxième configuration du profil de vis de l'extracteur bi-vis BC21 pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay (types de vis : T2F = double-filet trapézoïdal, C2F : double-filet conjugué, Mal 2 : disque malaxeurs bilobes, CF2F : contre-filets en double-filet conjugué)

Enfin, le montage d'un convergent et d'une filière en sortie de fourreau a permis de tester l'extrusion du raffinat sous forme d'un jonc (Figure III-28).

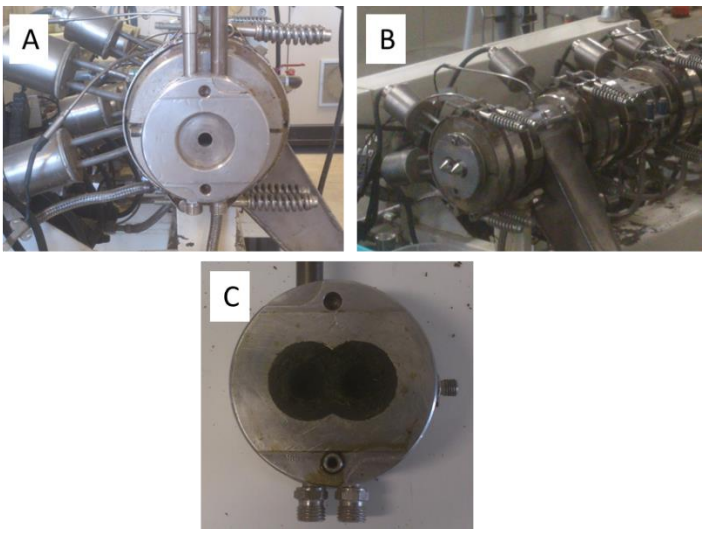


Figure III-28 (A) Photographie de la filière installée en bout de l'extracteur bi-vis BC21 (B) photographie de l'extracteur bi-vis BC21 sans filière (C) photographie de la face interne de la filière

Le Tableau III-5 rassemble l'ensemble des conditions opératoires (vitesse de rotation des vis, débits, *ratio* L/S, température) des extractions réalisées dans l'extracteur bi-vis BC21 dans ses différentes configurations.

Tableau III-5 Conditions opératoires des essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay réalisés en extracteur pilote bi-vis BC21

Essai	Configuration profil de vis	Filière	Vitesse vis (tr/min)	Débit feuilles (kg/h)	Débit eau 1 (kg/h)	Débit eau 2 (kg/h)	*Ratio* L/S (kg/kg)	Température fourreau (°C)
BV1	1	Non	175	2,86	2,79	8,56	4,4	60
BV2						15,06	6,8	
BV3	2	Non	175	3,26	2,49	12,02	4,9	60
BV4		Oui						
BV5	2	Non	175	3,26	2,49	5,99	2,9	60
BV6						20,97	7,9	
BV7	2	Non	175	3,13	2,60	6,35	3,2	90
BV8						20,28	8,0	
BV9	2	Non	175	3,26	3,71	8,98	4,4	60
BV10			200	4,35	4,48	11,97	4,3	
BV11			200	5,44	5,25	14,95	4,2	
BV12			225	6,52	6,02	17,94	4,1	

III.3.4 Faisabilité de l'extraction solide-liquide des feuilles de Stévia en extracteur bi-vis

Les essais préliminaires menés avec le premier profil de vis (Figure III-25) permettent d'établir la faisabilité de l'extraction solide-liquide des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur bi-vis BC21 :

- le bouchon dynamique formé par l'accumulation de matière dans les contre-filets du module 7 est stable, et la séparation solide-liquide qui en résulte permet d'obtenir un extrudat solide et un filtrat brut avec des débits réguliers (Tableau III-6). Les bilans de matière entrée-sortie sont pratiquement bouclés, en matière brute comme en matière sèche (Tableau III-7), indiquant un bon contrôle des débits d'alimentation en solide et en liquide, et l'absence de pertes significatives lors de l'opération,

Tableau III-6 Débits pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay, en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV1 et BV2

Essai	Débits entrée (kg/h)				Débits sortie (kg/h)						
	Feuilles		Eau		Extrudat		Filtrat brut				
	Brut	Sec	Pompe 1	Pompe 2	Brut	Sec	Total	Clair		Pied	
								Brut	Sec	Brut	Sec
BV1	2,86	2,64	2,79	8,56	3,36	1,43	10,51	8,61	0,63	1,90	0,55
BV2	2,86	2,64	2,79	15,06	2,99	1,28	17,74	15,22	0,70	2,52	0,63

Tableau III-7 Bilans matières pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV1 et BV2

Essai	Débits entrée (kg/h)		Débits Sortie (kg/h)		Ecart relatif/entrée	
	Brut	Sec	Brut	Sec	Brut	Sec
BV1	14,21	2,64	13,87	2,60	2,4%	1,5%
BV2	20,71	20,74	2,64	2,61	-0,1%	1,2%

- le pressage de la matière dans les contre-filets, traduit par la matière sèche de l'extrudat (Tableau III-8) s'avère particulièrement efficace pour les deux *ratios* liquide-solide (4,4 et 6,8 respectivement pour les essais BV1 et BV2). Rappelons que la séparation solide-liquide menée par filtration centrifuge dans l'essoreuse rousselet conduisait à des valeurs de matière sèche du raffinat de 33% dans le meilleur cas (Partie III.1.5), de près de 10 % inférieures à celle obtenues en extrudeur bi-vis BC21,

Tableau III-8 Teneur en matière sèche de l'extrudat pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV1 et BV2

Essai	Teneur en matière sèche de l'extrudat (g/g d'extrudat brut)
BV1	42,5%
BV2	42,8%

- par contre la séparation solide-liquide par filtration dans le 6ème module du fourreau de l'extracteur bi-vis BC21 n'est pas aussi efficace que celle par filtration centrifuge : des particules fines sont entraînées à travers le filtre, nécessitant une clarification du filtrat brut. Bien que les rendements de séparation en filtrat brut soient élevés (74 et 85 % par rapport au total introduit pour BV1 et BV2), le solide entraîné et séparé par clarification du filtrat brut, ou pied, représente, respectivement pour les essais BV1 et BV2, 18 et 14 % du filtrat brut, correspondant à 21 et 24 % de la matière sèche de feuilles introduites. Ce résultat est cohérent au regard de la répartition granulométrique des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay (Figure II-7, Chapitre II, Partie II.1.1.1) introduites dans l'extrudeur bi-vis faisant déjà apparaitre une population de fines particules (80 % de particules comprises entre 800 et 200 µm), proportion augmentée par l'effet mécanique de cisaillement imposé à la matière dans les vis de transport C2F et les malaxeurs bilobes, et du fait que le diamètre de ouvertures du module de filtration du fourreau de l'extracteur est de 1 mm. La proportion de matière sèche séparée au filtrat, augmente avec l'élévation du *ratio* liquide-solide (BV1 à L/S = 4,4 : 44,5 % et BV2 à L/S = 6,8 : 50 %) se répartissant de la même façon en matière sèche soluble (53 %) et en matière sèche insoluble (47 %).

Le dosage du stévioside et du rébaudioside A contenus dans l'extrudat, le filtrat clarifié et le pied permet alors de calculer les débits de ces deux glycosides de stéviol dans l'extracteur bi-vis (Tableau III-9) et leur répartition par rapport au potentiel introduit (Figure III-29 et Figure III-30). Ainsi pour une température de consigne du fourreau de 60°C, à partir de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, et un *ratio* liquide-solide limité à 4,4, 53 % du stévioside et du rébaudioside A initialement contenus dans les feuilles de Stévia sont récupérés dans le filtrat clarifié, et 10 % de chaque glycoside de stéviol sont entraînés dans le pied. L'augmentation du *ratio* liquide-solide de 4,4 à 6,8, c'est-à-dire du taux de solvant dans l'extracteur, porte les rendements en stévioside et en rébaudioside A à 57 % dans le filtrat clarifié, sans modifier la perte entraînée avec le pied (10 %), bien que la matière sèche solide entraînée soit un peu plus élevée (20,8 % à L/S = 4,4 et 23,8 % à L/S = 6,8).

Tableau III-9 Débits en stévioside et en rébaudioside A pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV1 et BV2

Essai	Débits en stévioside (g/h)				Débits en rébaudioside A (g/h)			
	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied
BV1	149	55	79	15	80	29	43	8
BV2	150	50	85	15	79	26	45	8

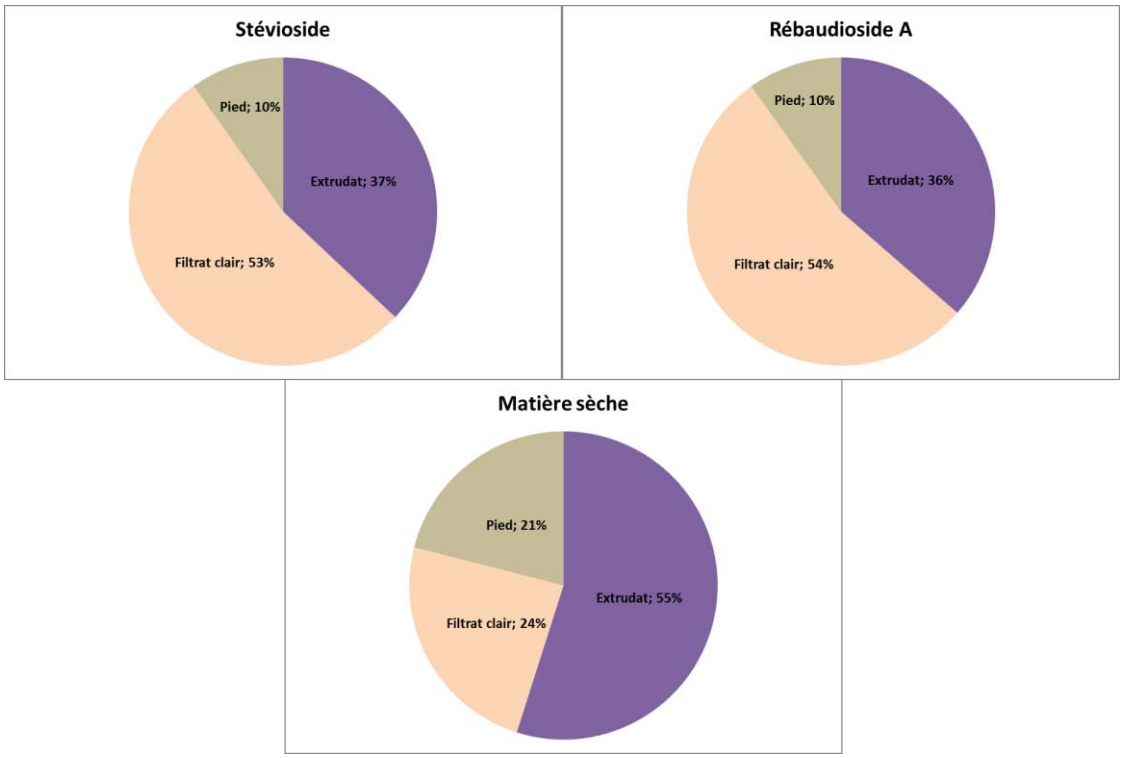


Figure III-29 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV1

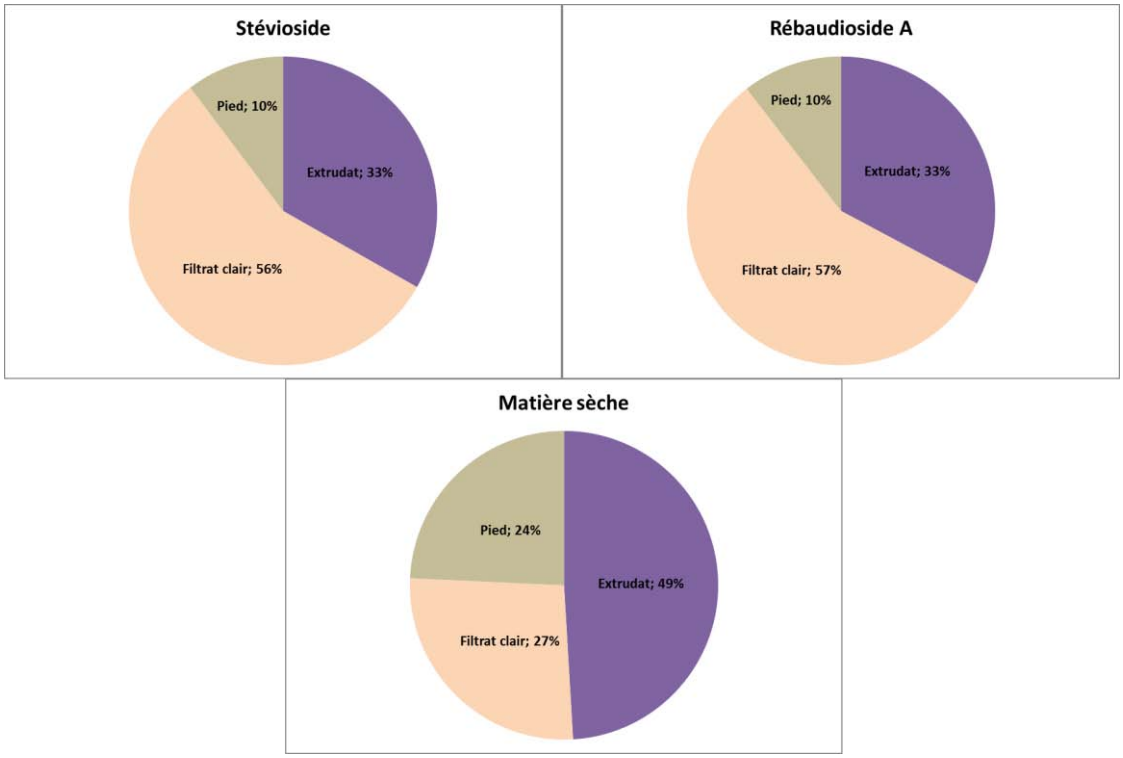


Figure III-30 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV2

Ainsi, l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia broyées s'avère très efficace dans l'extracteur bi-vis BC21 :

- l'imprégnation des feuilles séchées et leur mélange avec l'eau, difficile à l'introduction dans les premiers modules du fourreau, en particulier dans les malaxeurs bilobes, et le transport de la matière ne posent aucun problème grâce aux vis conjuguées à pas direct (caractère autonettoyant),

- l'essorage de la matière solide par pressage dans les contrefilets est nettement plus efficace (raffinat à plus de 42 % de matière sèche) que celui obtenu par filtration centrifuge (30 à 33 % de matière sèche), la séparation solide-liquide est cependant pénalisée par le diamètre élevé des orifices de filtration (1 mm), se traduisant par l'entrainement au filtrat de fines particules et nécessitant une clarification de l'extrait brut. Mais elle permet de récupérer en continu et en ligne avec l'étape d'extraction, de 70 à 80 % de l'eau introduite dans le filtrat clarifié,

- les rendements d'extraction et de séparation au filtrat, supérieurs à 50 % pour les deux glycosides de stéviol, sont atteints pour des *ratios* liquide-solide deux fois moins élevés que ceux mis en œuvre dans l'extracteur agité pilote (essai T4, Partie III.1). Les temps

de contact nécessaires à l'obtention d'un rendement d'extraction équivalent (au moins 5 minutes pour 50 % d'extraction des glycosides de stéviol, Figure III-11 et Figure III-12, Partie III.1.4.2) sont plus faibles que ceux mis en jeu dans l'extracteur bi-vis. En effet, bien que la distribution des temps de séjour du solide et du liquide dans l'extracteur bi-vis n'a pas été étudiée dans notre cas, il est raisonnable de supposer que les temps de séjour moyens des deux phases n'excèdent pas 1 à 2 minutes pour le liquide et 3 à 4 minutes pour le solide comme l'ont montrés les travaux de N'Diaye et Rigal (2000), et de Prat *et al.* (1999), dans le cas de l'extraction d'hémicelluloses de peuplier dans un extracteur bi-vis avec une configuration voisine. Des temps de séjour du même ordre de grandeur ont été observés par Evon (2008) et Faye (2010) dans le cas de l'extraction aqueuse de tournesol plante entière et de graines de neem. Les rendements d'extraction en glycosides de stéviol atteints pour des temps de contact aussi faibles, confirment d'une part que l'étape limitante de l'extraction est bien la diffusion intraparticulaire et que la solubilisation des solutés est très rapide, comme l'ont montrés les essais d'extraction en contacteur agité au stade laboratoire pour les feuilles séchées et broyées en milieu plus dilué (L/S = 11, Figure II-41 et Figure II-42, Chapitre II, Partie II.3.2). Malgré la diminution du *ratio* liquide-solide, l'efficacité du mélange obtenu dans la zone d'extraction de l'extracteur bi-vis accélère considérablement la diffusion intraparticulaire des solutés. Cependant, les rendements atteints restent inférieurs aux meilleures valeurs obtenues en contacteur agité, pour des temps de contact beaucoup plus élevés. Plusieurs facteurs devraient permettre d'améliorer ce résultat.

III.3.5 Intensification de l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia en extracteur bi-vis

III.3.5.1 Influence de la modification de la configuration et du profil de vis de l'extracteur bi-vis BC21

Ni les modifications de la configuration et du profil de vis apporté (Figure III-27), ni le montage d'une filière en sortie de fourreau n'ont perturbé le bon fonctionnement de l'extracteur bi-vis (Tableau III-10). Les bilans de matière entrée-sortie (Tableau III-11) sont bouclés de façon satisfaisante, les écarts sur le bilan en matière sèche un peu plus élevés que précédemment pouvant être attribués à un moins bon contrôle du débit de feuilles introduites.

Tableau III-10 Débits pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV3 et BV4

Essai	Débits entrée (kg/h)						Débits sortie (kg/h)				
	Feuilles		Eau		Extrudat		Filtrat brut				
	Brut	Sec	Pompe 1	Pompe 2	Brut	Sec	Total	Clair		Pied	
								Brut	Sec	Brut	Sec
BV3	3,26	3,00	2,49	12,02	3,23	1,35	14,76	11,96	0,80	2,81	0,74
BV4	3,26	3,00	2,49	12,02	3,26	1,37	14,96	12,09	0,78	2,87	0,70

Tableau III-11 Bilans matières pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV3 et BV4

Essai	Débits entrée (kg/h)		Débits Sortie (kg/h)		Ecart relatif/entrée	
	Brut	Sec	Brut	Sec	Brut	Sec
BV3	17,76	3,00	18,00	2,89	-1,3%	3,7%
BV4	17,76	3,00	18,22	2,85	-2,6%	4,8%

L'efficacité de la séparation solide-liquide avec ce profil de vis est élevée, avec un rendement en filtrat brut $\left(\frac{Débit_{Filtrat\ brut}}{Débit_{Filtrat\ brut}+Débit_{Extrudat}}\right)$ de 82 % sans ou avec filière, moins de 25 % de matière sèche entraînée sous forme solide avec le pied, pour 27 et 26 % de matière sèche solubilisée au filtrat clarifié ; l'essorage de la matière est aussi efficace dans les contrefilets de pas -25 mm que dans ceux de pas -33 mm mis en œuvre dans le premier profil, et la présence de la filière tendrait à légèrement augmenter la teneur en matière sèche de l'extrudat (Tableau III-12).

Tableau III-12 Teneur en matière sèche de l'extrudat pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV3 et BV4

Nom	Teneur en matière sèche de l'extrudat (g / g d'extrudat brut)
BV3	41,7%
BV4	42,2%

Mais c'est au niveau des rendements d'extraction en glycosides de stéviol que se traduisent les modifications du profil de vis : la mise en œuvre d'une seconde série de malaxeurs bilobes dans la zone d'extraction-lavage (module 5) après la seconde injection d'eau (module 4) intensifie la mise en contact de l'eau et des feuilles broyées. Les rendements en stévioside et rébaudioside A récupérés au filtrat clarifié, calculés à partir des débits (Tableau III-13) atteignent des valeurs de 60 % et 61 % en l'absence de filière, la perte en glycosides de stéviol dans le pied étant limitée (Figure III-31). Le montage de la filière en sortie du fourreau ne modifie pas ces résultats (Figure III-32)

Tableau III-13 Débits en stévioside et en rébaudioside A pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV3 et BV4

Essai	Débits en stévioside (g/h)				Débits en rébaudioside A (g/h)			
	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied
BV3	178	48	107	23	90	24	55	11
BV4	171	46	104	21	86	23	53	10

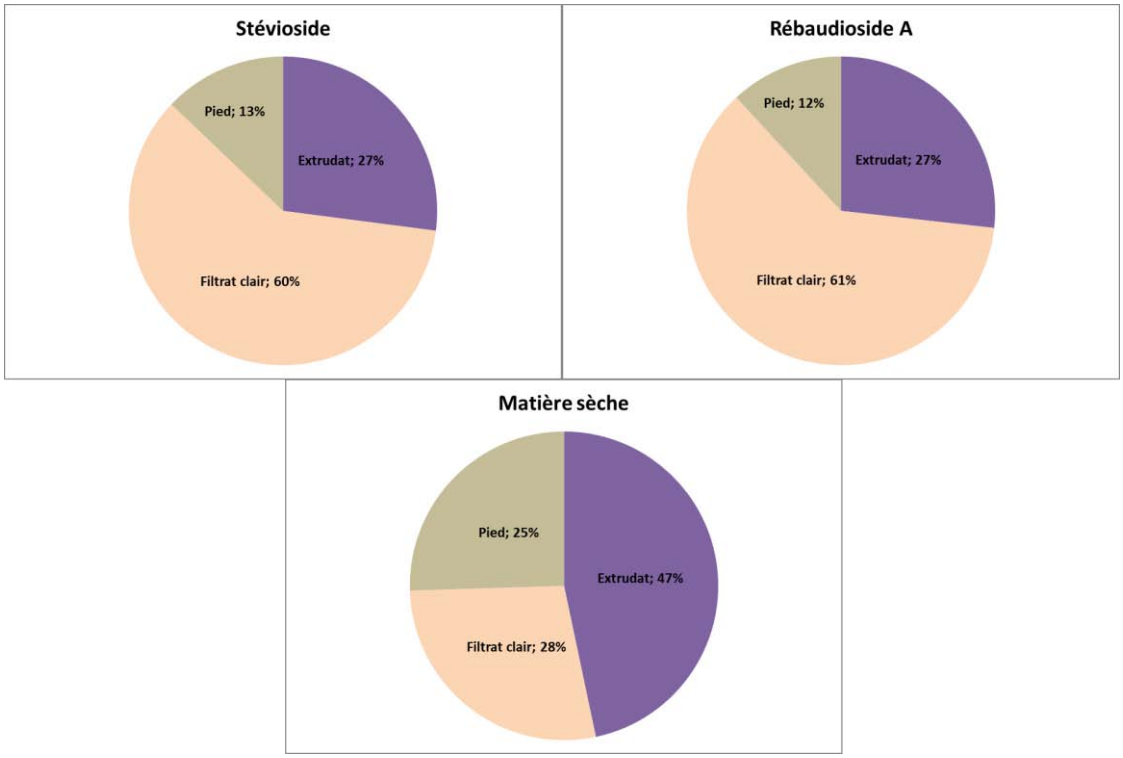


Figure III-31 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV3

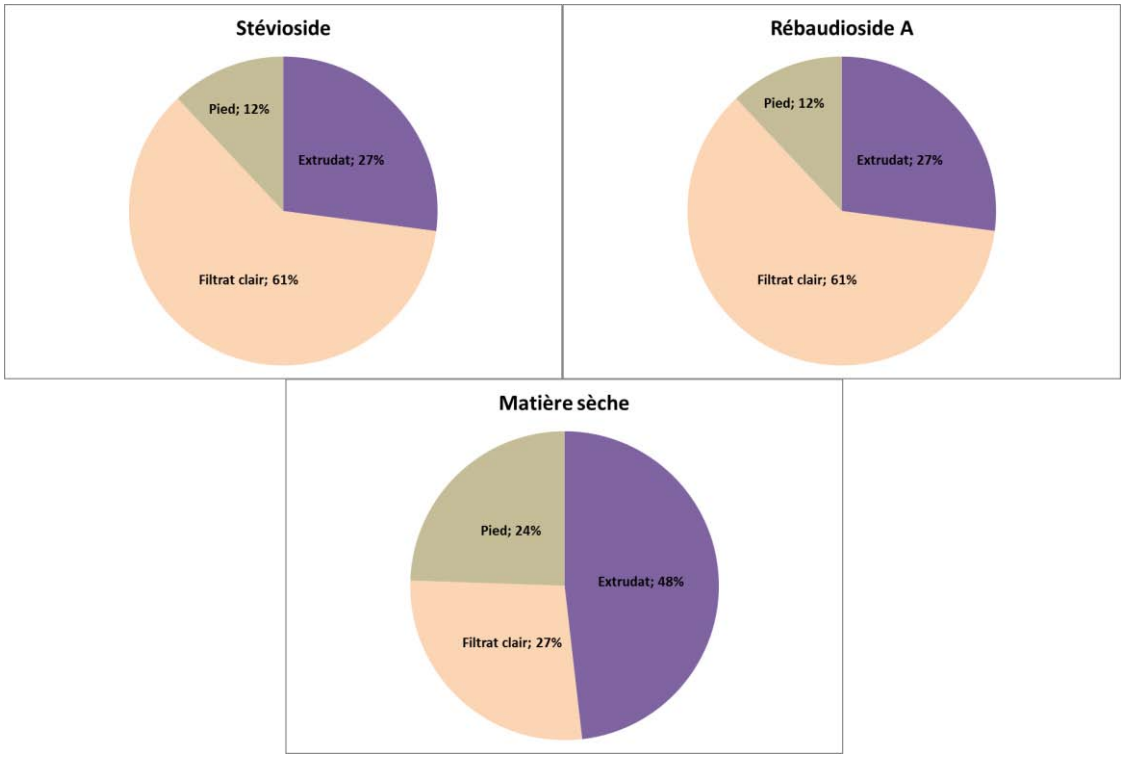


Figure III-32 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV4

III.3.5.2 Influence de la température et du ratio *liquide-solide*

Le Tableau III-14 et le Tableau III-15 rassemblent les résultats obtenus avec le profil de vis modifié pour deux niveaux de *ratio* liquide-solide à une température de 60°C (BV5 : L/S = 2,9 et BV6 : L/S = 7,9) et une température de 90°C (BV7 : L/S = 3,2 et BV8 : L/S = 8).

Tableau III-14 Débits pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV5 à BV8

Essai	Débits entrée (kg/h)				Débits sortie (kg/h)						
	Feuilles		Eau		Extrudat		Filtrat brut				
	Brut	Sec	Pompe 1	Pompe 2	Brut	Sec	Total	Clair		Pied	
								Brut	Sec	Brut	Sec
BV5	3,26	3,00	2,49	5,99	3,57	1,54	8,47	5,73	0,62	2,74	0,77
BV6	3,26	3,00	2,49	20,96	3,03	1,33	23,88	20,78	0,89	3,10	0,75
BV7	3,13	2,91	2,60	6,35	3,53	1,47	8,18	4,99	0,57	3,19	0,86
BV8	3,13	2,91	2,60	20,28	2,98	1,27	23,68	20,38	0,86	3,30	0,67

Tableau III-15 Bilans matières pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV5 à BV8

Essai	Débits entrée (kg/h)		Débits Sortie (kg/h)		Ecart relatif/entrée	
	Brut	Sec	Brut	Sec	Brut	Sec
BV5	11,74	3,00	12,04	2,92	-2,6%	2,6%
BV6	26,72	3,00	26,91	2,97	-0,7%	1,0%
BV7	12,07	2,91	11,71	2,89	3,0%	0,5%
BV8	26,01	2,91	26,66	2,80	-2,5%	3,6%

L'efficacité de pressage du mélange dans les contrefilets est toujours élevée (Tableau III-16), et l'augmentation du *ratio* liquide-solide favorise légèrement l'essorage de l'extrudat (gain de 1 % de sa matière sèche), alors que paradoxalement, l'augmentation de la température n'est pas favorable (perte de 1,3 % à 1,5 % de matière sèche à 90°C par rapport à 60°C). Bien que relativement faibles, ces effets pourraient s'expliquer d'une part par la plus grande poussée exercée par le mélange transporté vers les contrefilets où se forme le bouchon dynamique lorsque le fourreau de l'extrudeur est plus rempli, l'augmentation du *ratio* liquide-solide étant obtenue avec une augmentation du débit d'eau injecté (augmentation du débit total introduit d'un facteur 2,3) ; et d'autre part, par la différence de texture du bouchon dynamique formé dans les contrefilets : à 90°C, la texturation du mélange sous cisaillement serait plus importante, avec un effet de rhéofluidisation favorisant son écoulement à travers les contrefilets, y diminuant son temps de séjour et donc la durée du pressage exercé sur le

solide. Si l'augmentation du *ratio* liquide-solide se traduit logiquement par une augmentation du rendement en filtrat brut aux deux températures (72 % pour BV5 à 60°C et L/S = 2,9 et 68 % pour BV7 à 90°C et L/S = 3,2 ; 89 % pour BV6 à 60°C et L/S = 7,9 et 91 % pour BV8 à 90°C et L/S = 8), son effet sur l'entrainement de particules solides dans le filtrat est différent aux deux températures. A 60°C, les rendements en matière sèche entrainée au pied sont très voisins aux deux *ratios* liquide-solide (25,5 et 25 % respectivement pour BV5 et BV6), alors qu'ils sont nettement plus élevés à 90°C pour un faible taux de solvant (BV7 à L/S = 2,9 : 29,5 %) et plus faibles pour un fort taux de solvant (BV8 à L/S = 8 : 23 %). A faible taux de solvant et forte température, la déstructuration des feuilles est plus importante, en particulier dans les malaxeurs bilobes, génératrice de fines particules entrainées par le solvant lors du pressage dans les contrefilets. A plus forte dilution dans l'eau, l'effet de cisaillement du mélange générerait moins de particules et la texturation du mélange dans les contrefilets serait moins favorable à leur entrainement.

Tableau III-16 Teneurs en matière sèche de l'extrudat pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV5 à BV8

Essai	Teneur en matière sèche de l'extrudat (g/g d'extrudat brut)
BV5	43,1%
BV6	44,0%
BV7	41,6%
BV8	42,7%

La comparaison des rendements en stévioside et en rébaudioside A récupérés au filtrat clair, calculés à partir des débits obtenus (Tableau III-17) montre alors que (Figure III-33, Figure III-34, Figure III-35 et Figure III-36) :

- l'effet d'une élévation de la température de consigne du fourreau à 90°C est faible sur les rendements atteints à fort *ratio* liquide-solide (BV6 et BV8 : 65 % et 66 % pour les deux glycosides de stéviol), voire négatif lorsque le *ratio* liquide-solide est petit (BV5 et BV7 : 49 à 46 % pour le stévioside et 54 à 47 % pour le rébaudioside A respectivement à 60 et 90°C),

- par contre, l'augmentation du *ratio* liquide-solide favorise nettement les rendements des deux glycosides de stéviol, que ce soit à 60 ou à 90°C. La dilution du mélange d'un facteur 2,7 permet un gain de rendement de plus de 15 %.

Tableau III-17 Débits en stévioside et en rébaudioside A pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV5 et BV6

Essai	Débits en stévioside (g/h)	Débits en rébaudioside A (g/h)

	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied
BV5	174	57	86	31	88	28	45	15
BV6	184	45	120	19	95	24	62	9
BV7	135	41	62	32	82	24	39	19
BV8	139	30	92	17	82	18	54	10

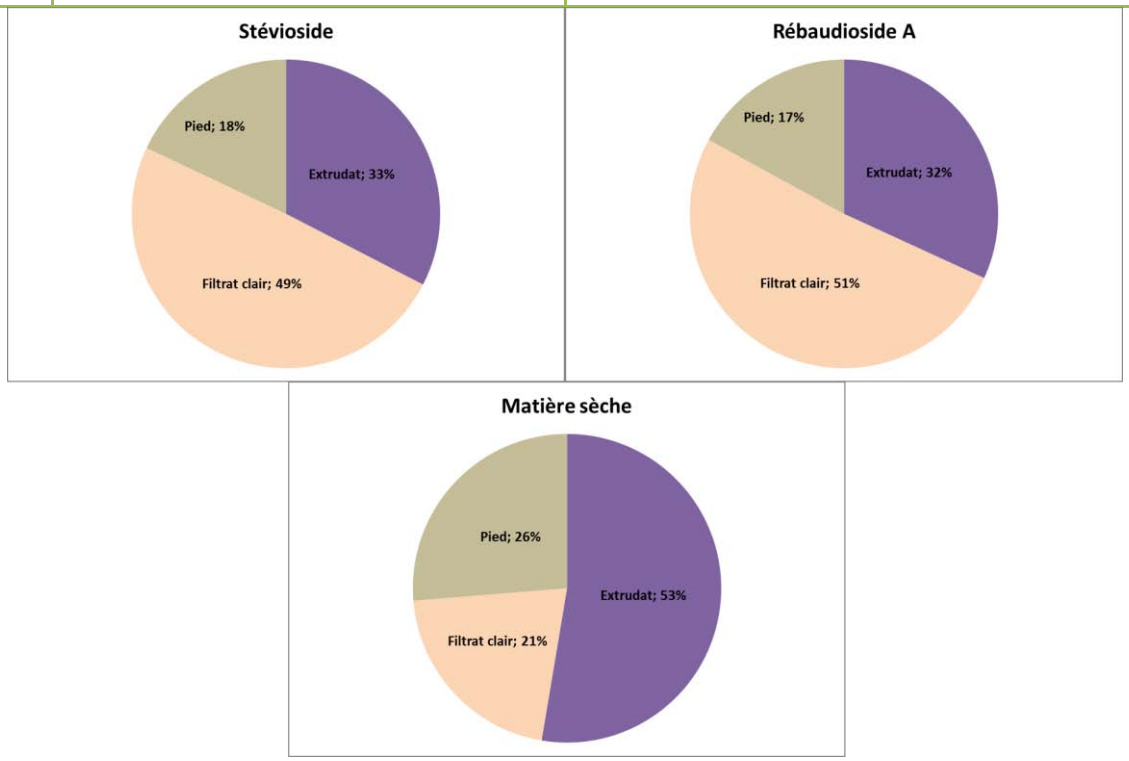


Figure III-33 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV5

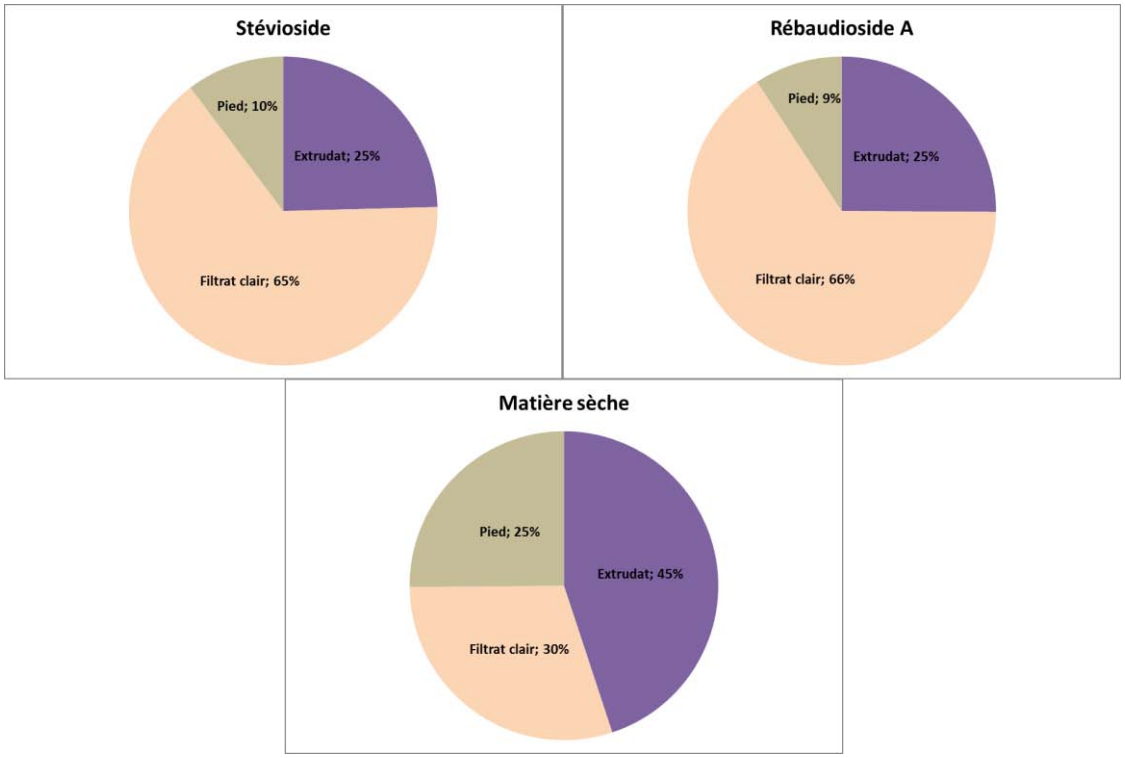


Figure III-34 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV6

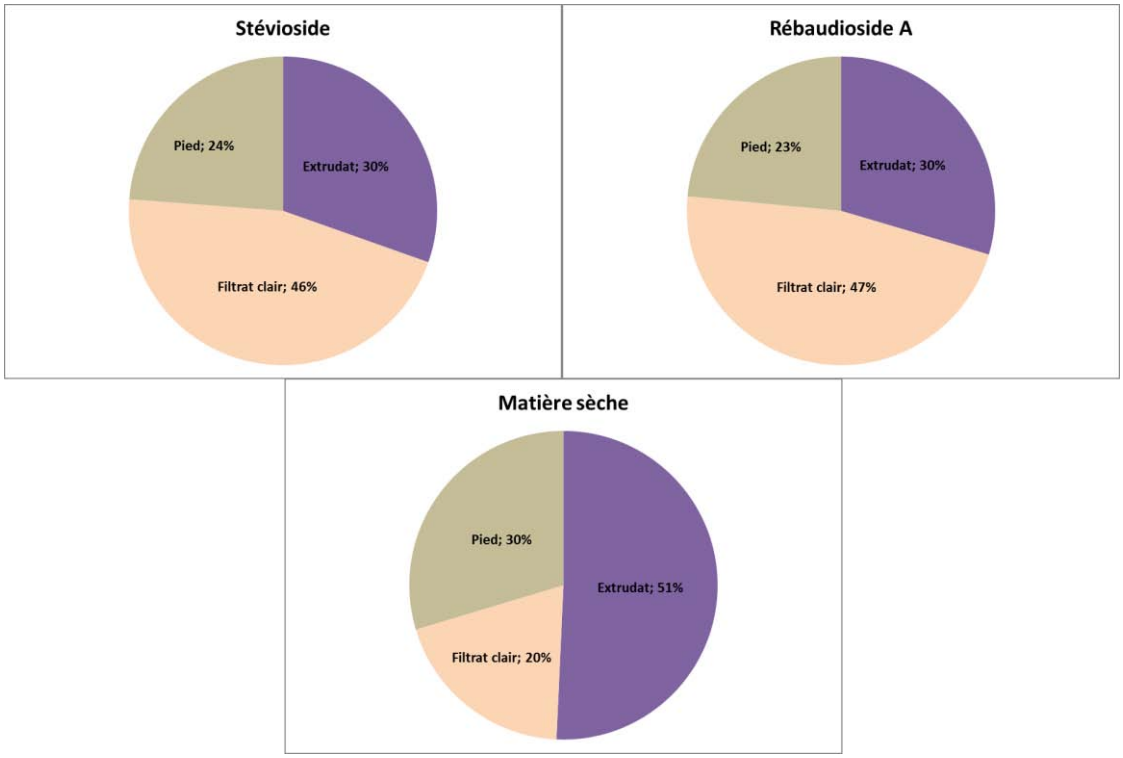


Figure III-35 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV7

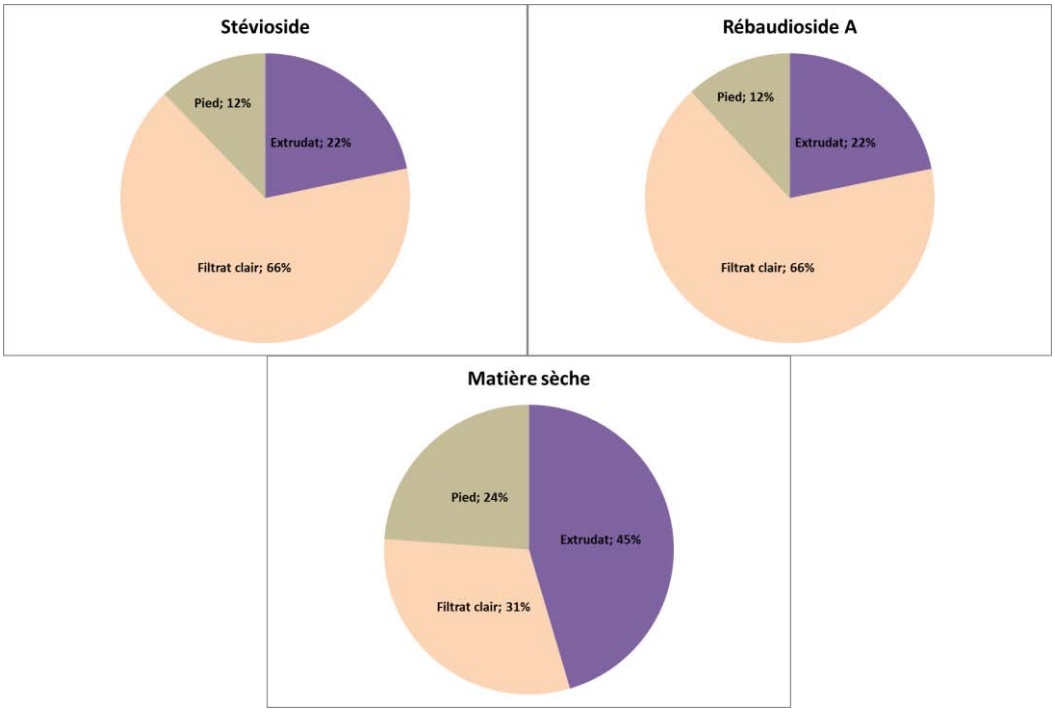


Figure III-36 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV8

Au bilan, l'élévation de la température, bien qu'elle n'augmente pas le rendement en matière sèche extraite au filtrat clair, s'avère surtout défavorable à la pureté en glycosides de stéviol extrait. Par contre, l'augmentation du *ratio* liquide-solide, qui favorise le rendement en matière sèche extraite au filtrat clair, n'agit pas ou peu sur la pureté en glycosides de stéviol. C'est à 60°C et pour un *ratio* liquide-solide proche de 8 que la production horaire de glycosides de stéviol est la plus élevée (180 g/L) pour un débit en matière sèche de feuille de 3 kg/h, soit une productivité de 60 g/h de glycosides de stéviol par kg de matière sèche de feuilles et par heure (Tableau III-18).

Tableau III-18 Production horaire et productivité en glycosides de stéviol extraits et séparés au filtrat de l'extracteur pilote bi-vis BC21

Essai	Débit MS feuilles (kg/h)	*Ratio* L/S (kg/kg)	T (°C)	Rendement dans filtrat clair		Glycosides de stéviol dans filtrat clair		
				Matière sèche	Glycosides de stéviol	Pureté	Production horaire (g/h)	Productivité ($g.h^{-1}/kg.h^{-1}$)
BV5	3	2,9	60	21 %	50 %	21 %	131	44
BV6	3	7,9	60	30 %	66 %	20 %	182	61
BV7	2,91	3,2	90	20 %	46 %	18 %	101	35
BV8	2,91	8,0	90	31 %	66 %	17 %	146	50

L'augmentation de la production horaire en glycosides de stéviol dans l'extracteur bi-vis BC21 pourra être obtenue par augmentation du débit de feuilles introduites.

III.3.5.3 Influence de l'augmentation de la production horaire de glycosides de stéviol

Les essais d'augmentation du débit de feuilles introduites dans l'extracteur bi-vis sont réalisés à une température consigne du fourreau de 60°C et avec un *ratio* liquide-solide faible, maintenu voisin de 4,25, permettant d'augmenter les débits d'eau simultanément au débit de solide sans atteindre trop rapidement les limites d'avalement et de transport du mélange de l'extracteur. En effet, l'augmentation du débit total solide + liquide impose une élévation progressive de la vitesse de rotation des vis pour atteindre un régime stationnaire de fonctionnement et éviter l'engorgement du fourreau. Dans les conditions opératoires adaptées, le taux de remplissage du fourreau, proportionnel au rapport débit d'entrée sur la vitesse de rotation des vis, augmente progressivement (Tableau III-19).

Tableau III-19 Conditions opératoires des essais d'augmentation du débit d'entrée dans l'extracteur pilote bi-vis BC21

Essai	Débit feuilles (kg/h)	Débit Eau (kg/h)	*Ratio* L/S (kg/kg)	Débit entrée total (kg/h)	Vitesse Rotation Vis N (tr/min)	Débit feuilles/N ($kg.h^{-1}/tr.min^{-1}$)	Débit entrée/N ($kg.h^{-1}/tr.min^{-1}$)
BV9	3,26	12,69	4,4	15,95	175	0,0186	0,091
BV10	4,35	16,45	4,3	20,8	200	0,0217	0,104
BV11	5,44	20,2	4,2	25,64	200	0,0272	0,128
BV12	6,52	23,96	4,1	30,48	225	0,0289	0,135

Dans toutes ces conditions opératoires, l'extraction et la séparation solide-liquide sont opérantes (Tableau III-20) et les bilans de matière entrée-sortie sont satisfaisants (Tableau III-21).

Tableau III-20 Débits pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV9, BV10, BV11 et BV12

Essai	Débits entrée (kg/h)				Débits sortie (kg/h)						
	Feuilles		Eau		Extrudat		Filtrat brut				
	Brut	Sec	Pompe 1	Pompe 2	Brut	Sec	Total	Clair		Pied	
								Brut	Sec	Brut	Sec
BV9	3,26	2,96	3,71	8,98	3,44	1,41	12,08	8,75	0,68	3,33	0,80
BV10	4,35	3,95	4,48	11,97	4,66	1,93	16,03	11,66	0,91	4,37	1,10
BV11	5,44	4,94	5,25	14,95	5,99	2,52	19,48	14,47	1,16	5,01	1,32
BV12	6,52	5,92	6,02	17,94	7,39	3,11	23,12	17,05	1,35	6,08	1,55

Tableau III-21 Bilans matières pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV9, BV10, BV11 et BV12

Essai	Débits entrée (kg/h)		Débits Sortie (kg/h)		Ecart relatif/entrée	
	Brut	Sec	Brut	Sec	Brut	Sec
BV9	15,95	15,5	2,96	2,89	2,7%	2,4%
BV10	20,80	20,69	3,95	3,94	0,5%	0,2%
BV11	25,64	25,47	4,94	4,99	0,7%	-1,2%
BV12	30,48	30,51	5,92	6,01	-0,1%	-1,4%

Les débits de filtrat brut et de quantité de particules solides entrainées au pied augmentent logiquement avec l'augmentation des débits de feuille et d'eau injectée, mais avec un rendement de filtration pratiquement constant (75 à 77 % pour le filtrat brut et 26 à 27 % pour la matière sèche insoluble au pied). L'efficacité de la séparation solide-liquide apparait donc peu sensible à l'augmentation des débits. Tout au plus l'efficacité de pressage tend à augmenter (Tableau III-22) avec l'élévation du taux de remplissage du fourreau.

Tableau III-22 Teneurs en matière sèche de l'extrudat pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV9, BV10, BV11 et BV12

Essai	Teneur en matière sèche de l'extrudat (g/g d'extrudat brut)
BV9	41,0%
BV10	41,5%
BV11	42,0%
BV12	42,1%

Les rendements en stévioside et rébaudioside A extraits et récupérés au filtrat clair (Figure III-37, Figure III-38, Figure III-39 et Figure III-40), calculés à partir des débits obtenus (Tableau III-23), restent très voisins de 55 et 57 % respectivement, valeurs proches de celle calculées par interprétation linéaire entre ceux atteints pour les essais BV5 et BV8 à un même débit de feuilles (3,26 kg/h) et 60°C pour des *ratios* liquide-solide plus faibles (BV5 : L/S = 2,9) et plus élevés (BV8 : L/S = 4,9). La production horaire de glycosides de stéviol extraits et récupérés au filtrat clair augmente proportionnellement au débit de matière sèche de feuilles introduites (Figure III-41).

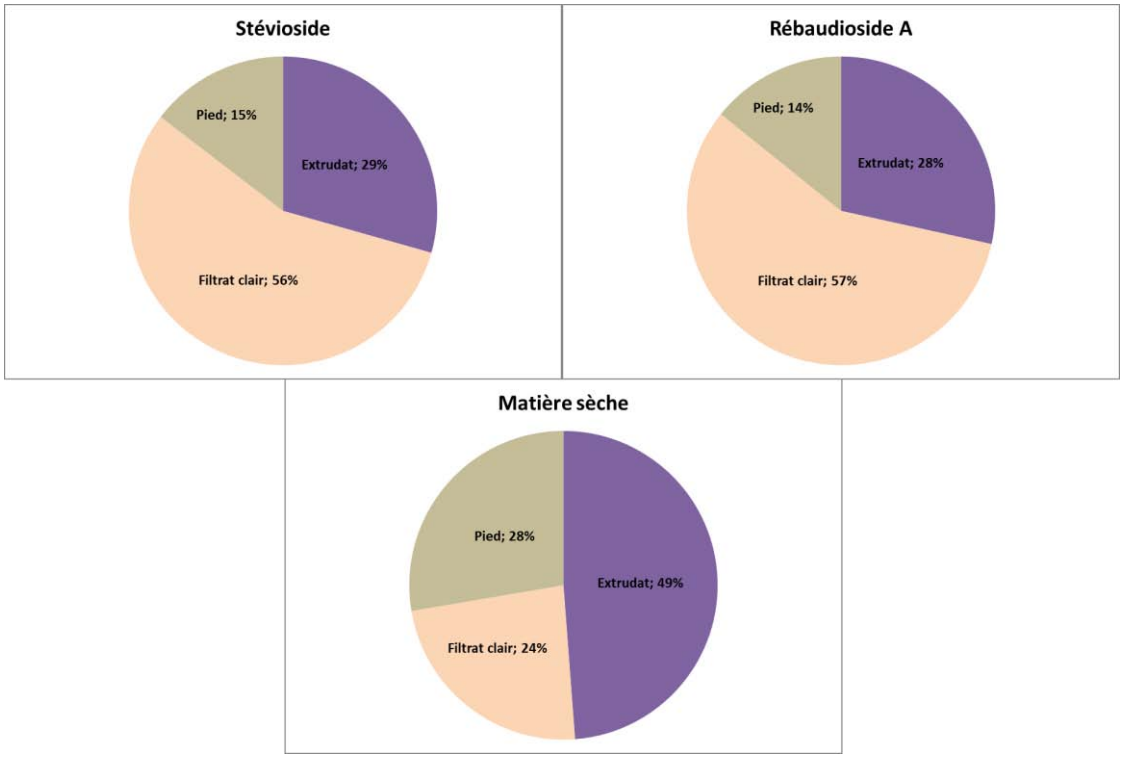


Figure III-37 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV9

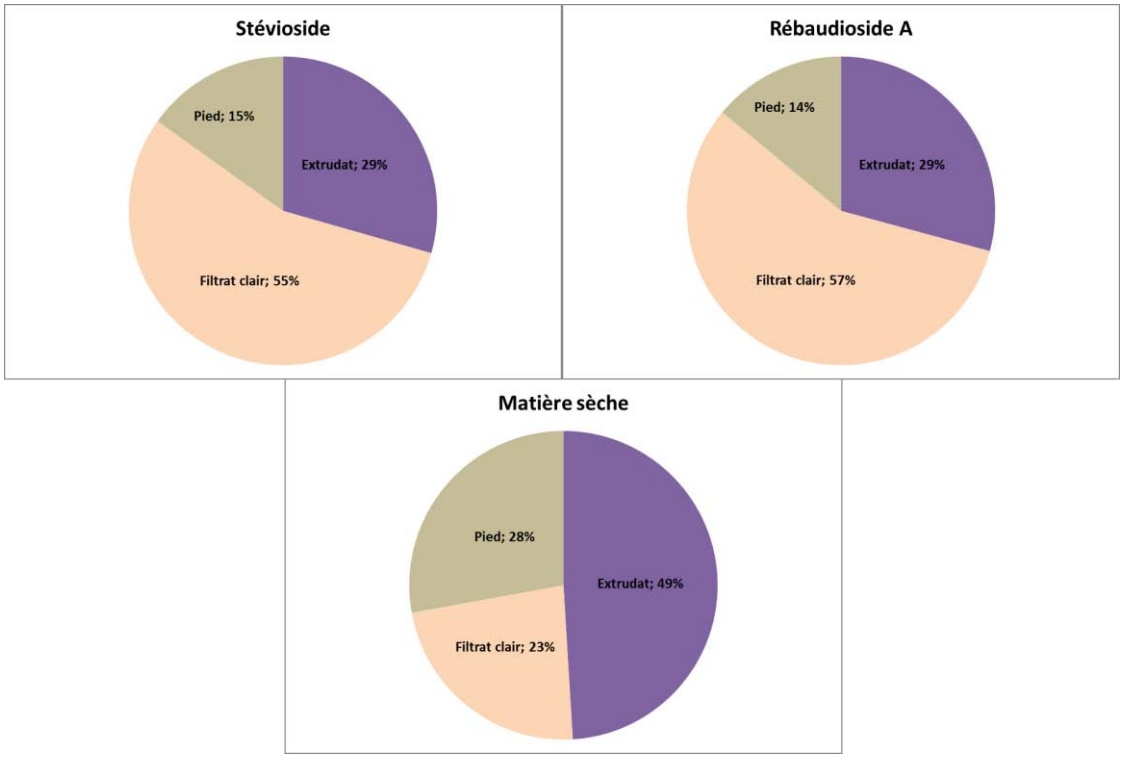


Figure III-38 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV10

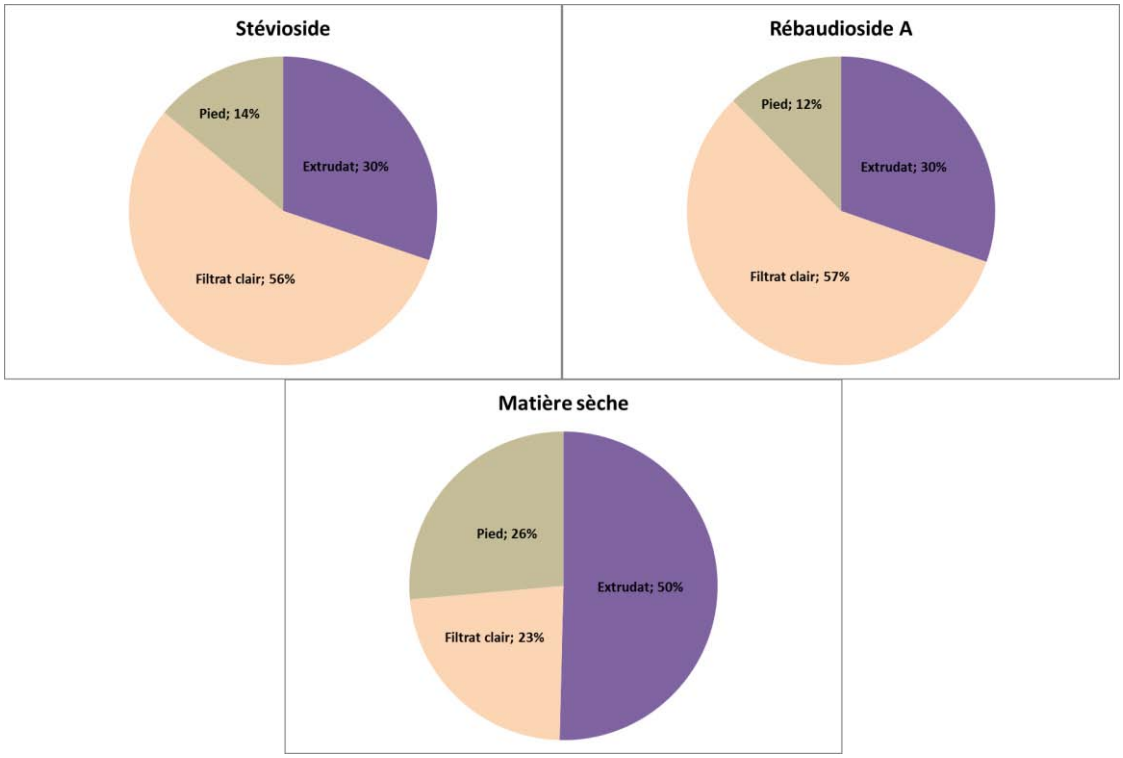


Figure III-39 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV11

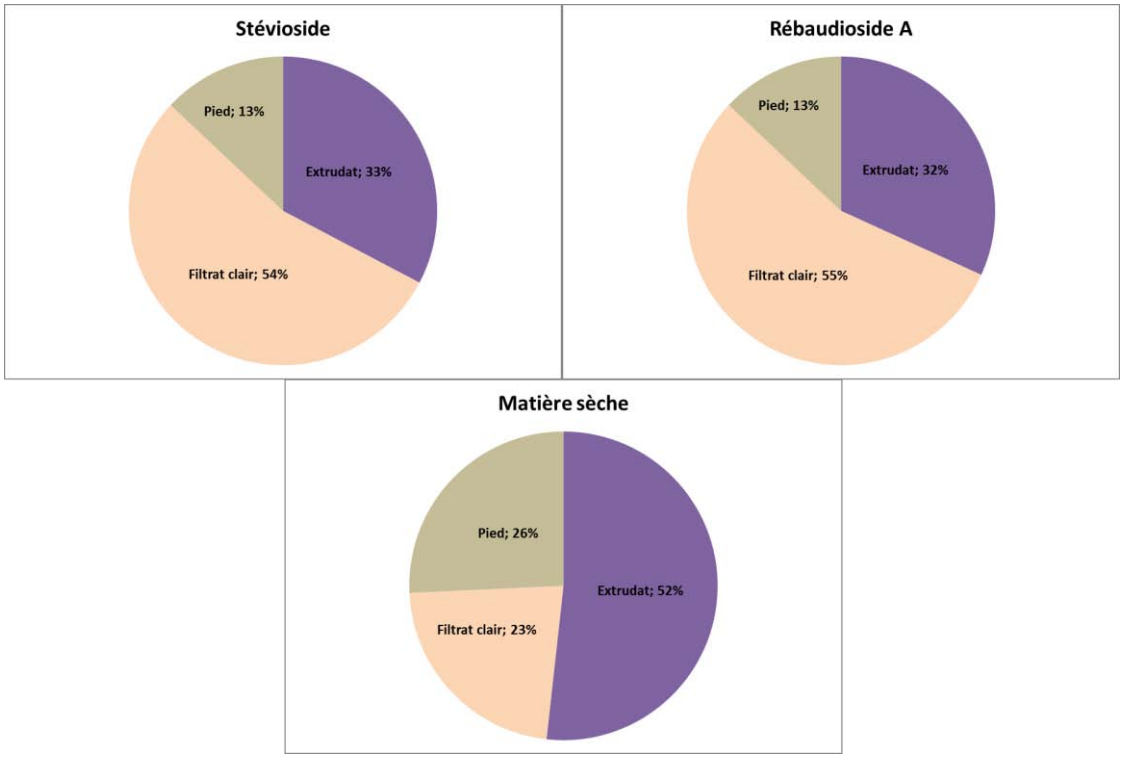


Figure III-40 Rendements d'extraction en stévioside, rébaudioside A et matière sèche dans l'extrudat, le filtrat clair et le pied obtenus pour l'essai BV12

Tableau III-23 Débits en stévioside et en rébaudioside A pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 pour les essais BV9, BV10, BV11 et BV12

Essai	Débits en stévioside (g/h)				Débits en rébaudioside A (g/h)			
	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied	Feuilles	Extrudat	Filtrat clair	Pied
BV9	163	48	91	24	80	23	46	11
BV10	227	67	126	34	117	34	67	16
BV11	292	88	163	41	146	44	84	18
BV12	349	114	190	45	180	57	100	23

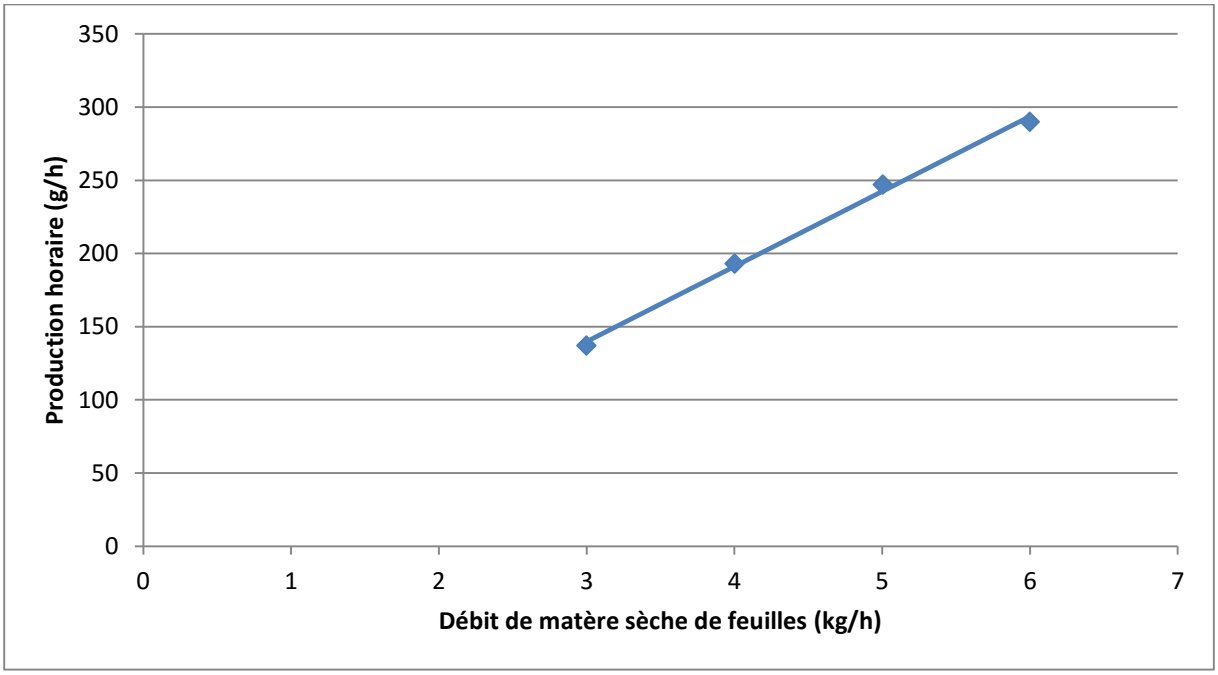


Figure III-41 Augmentation de la production horaire de glycosides de stéviol extraits et séparés au filtrat clair dans l'extracteur pilote BC21

Ainsi pour un *ratio* liquide-solide limité à une valeur proche de 4, la production horaire de glycosides de stéviol extrait dans le filtrat clarifié (290 g/h) est 1,5 fois plus élevé pour un doublement du débit de matière sèche de feuilles introduites, avec une productivité voisine de 50 g/h de glycosides de stéviol par kg de matière sèche de feuilles et par heure.

Ces résultats pourraient théoriquement être encore améliorés :

- par augmentation du débit de feuilles au-delà de 6,5 kg/h, à faible *ratio* liquide-solide (L/S = 4) mais cette orientation se heurte à la capacité d'avalement des feuilles et du fonctionnement stable de l'extracteur bi-vis BC21. Les essais menés dans ce sens n'ont pas permis d'atteindre le régime stationnaire avec la configuration et le profil de vis adapté,

- par augmentation du *ratio* liquide-solide, permettant d'améliorer le rendement d'extraction des glycosides de stéviol (Figure III-42) et donc la productivité de l'extracteur bi-vis BC21. Pour un *ratio* liquide-solide de 5, la production horaire de glycosides de stéviol devrait atteindre 350 g/h pour un débit de matière sèche de feuilles introduite de 6,5 kg/h avec une vitesse de rotation des vis portée à 300 tr/min, maintenant le taux débit d'entrée/vitesse de rotation des vis proche de 0,13, sous hypothèse que le rendement d'extraction et de séparation au filtrat clair se maintienne à 60 % (essai BV3), correspondant à une productivité de 55 g/h de glycosides de stéviol par kg de matière sèche de feuilles et par heure. Par contre, au-delà d'un *ratio* liquide-solide de 5, l'amélioration du rendement d'extraction des glycosides de stéviol semble plus limitée : pour un *ratio* liquide-solide de 8, le gain de rendement n'est que de 5 % (BV6 à 60°C et L/S = 7,9 : 66 % de glycosides de stéviol extraits et récupérés au filtrat clair par rapport au potentiel). Malgré une productivité de l'extracteur bi-vis de 60 g/h par kg/h de matière sèche de feuilles traitées, l'augmentation de la production horaire des glycosides de stéviol par augmentation du débit de feuilles sera limitée par les quantités d'eau injectées, atteignant rapidement la capacité maximum de transport du mélange dans le fourreau de l'extracteur bi-vis BC21.

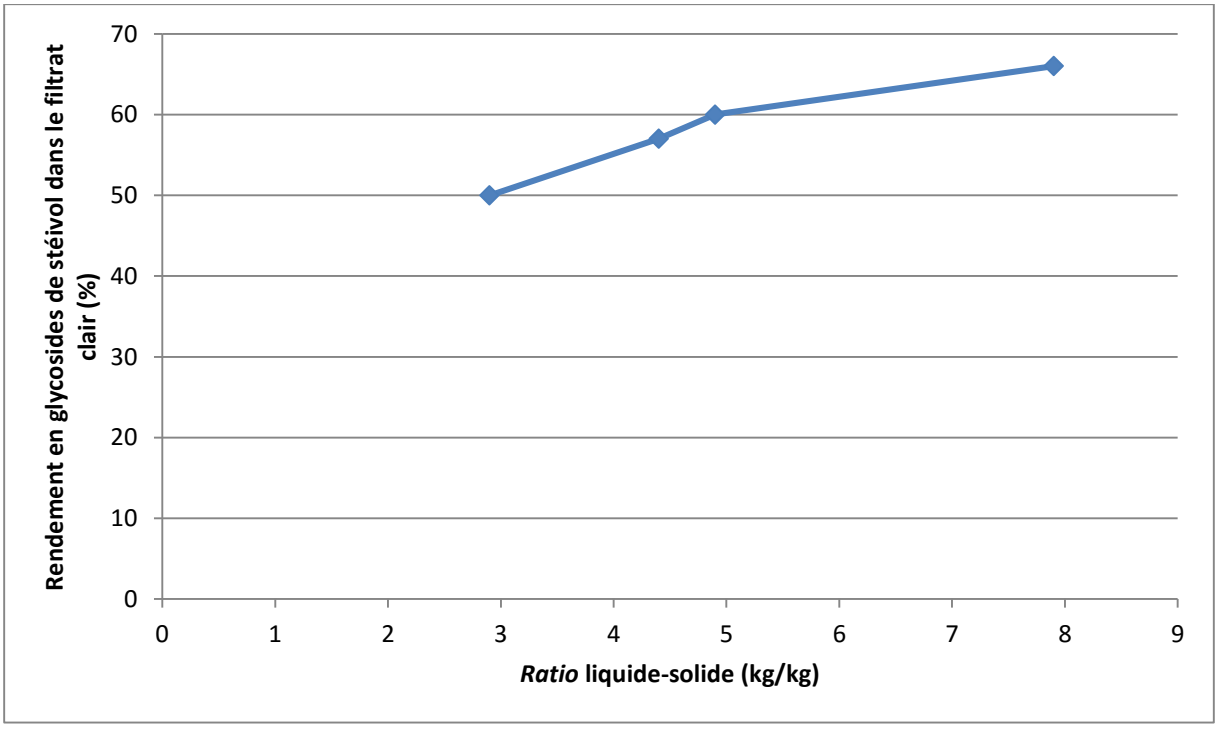


Figure III-42Influence de l'augmentation du *ratio* liquide-solide sur les rendements d'extraction des glycosides de stéviol extraits et séparés au filtrat clair dans l'extracteur pilote bi-vis BC21

III.4 Synthèse des essais pilote d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol à partir des feuilles de Stévia séchées du Paraguay

Les essais d'extraction aqueuse des feuilles de Stévia séchées, en provenance du Paraguay, dans les différents extracteurs pilotes que nous avons mis en œuvre ont confirmé les cinétiques d'extraction des glycosides de stéviol obtenues à l'échelle laboratoire et permettent d'orienter les choix techniques et technologiques pour le transfert d'échelle d'un procédé de production.

1. Dans l'extracteur pilote Reus,

   adapté pour une assistance de l'extraction par les ultrasons :

   - la macération des feuilles séchées et compactées à température ambiante et avec un *ratio* liquide-solide élevé (L/S = 17,1), l'extraction des glycosides est très lente et limitée,

   - l'agitation du mélange par simple brassage accélère bien l'extraction, mais les rendements atteints au bout d'une heure de temps de contact restent limités à 67 % et l'application des ultrasons n'apporte pas d'amélioration significative.

Bien que cette technique d'assistance aux ultrasons soit décrite comme permettant d'améliorer les rendements d'extraction des deux glycosides de stéviol, en particulier à température plus élevée (50 à 90°C), elle n'a pas été retenue pour un transfert du procédé à l'échelle industrielle en raison de la sensibilité de cette technologie aux conditions de mise en œuvre (géométrie de l'extracteur, limite du taux de solide dans le solvant) et du faible gain de rendement espéré par comparaison avec une extraction en contacteur agité à 60°C.

2. Dans l'extracteur pilote agité Tournaire,

l'adaptation de la procédure d'introduction des feuilles et la mise en œuvre d'une pale d'agitation adaptée ont permis d'augmenter les taux de remplissage du contacteur et de diminuer le *ratio* liquide-solide. A partir de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, et pour un milieu dilué (L/S = 10) l'équilibre d'extraction lié à la diffusion intraparticulaire est atteint très rapidement au bout de moins de 20 minutes à 60°C. Cependant à partir des feuilles non broyées et pour un *ratio* liquide-solide équivalent (L/S = 10), la cinétique d'extraction est relativement peu pénalisée avec un rendement d'extraction de 80 % en glycosides de stéviol au bout de 20 minutes de temps de contact et un maximum équivalent au précédent (85 % en glycosides de stéviol) au bout de 40 minutes. La séparation liquide-solide par filtration centrifuge conduit en 15 minutes sur une toile de 1-10 µm à un extrait clair contenant 36,3 g/L de matière sèche (rendement de 33,8 g / 100 g de matière sèche de feuilles) dont 5,7 g/L de stévioside et 2,2 g/L de rébaudioside A (pureté par rapport

à la matière sèche extraite respectivement de 15,6 et 5,9 %) sous l'hypothèse de la réalisation de séparation solide-liquide en parallèle de l'extraction, la production horaire de glycosides de stéviol estimée serait de 1521 g/h pour un extracteur d'une capacité de 200 L, pour une charge de 13,8 kg de matière sèche de feuilles séchées et compactées, avec un *ratio* liquide-solide de 10. La productivité de l'extracteur agité, déjà relativement élevée (73,5 g/h de glycosides de stéviol par kg/h de matière sèche de feuilles séchées et compactées) ne serait pas améliorée avec des feuilles broyées (65,4 g/h de glycosides de stéviol par kg/h de matière sèche de feuilles séchée et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, avec un *ratio* L/S de 10), d'autant plus que le broyage impliquerait un coût énergétique et d'installation supplémentaire, sous condition que la durée de cycle de séparation liquide-solide reste compatible avec la durée réduite de l'extraction.

Ainsi, le procédé d'extraction aqueuse des feuilles de Stévia en extracteur agité apparait adapté pour une production d'extrait de feuilles de Stévia à petite échelle : un contacteur cylindrique à fond plat de 200 L, équipé d'une pale d'agitation adaptée au mélange de 15 kg de feuilles séchées et compactées dans l'eau avec un *ratio* liquide/solide de 10, et d'une double enveloppe pour thermostater le milieu à 60°C, permettrait de produire après séparation liquide-solide par filtration centrifuge, 194 L/h d'extrait à 3,6 % de matière sèche et 41 kg/h de raffinat solide à 33,0 % de matière sèche. La concentration de l'extrait conduirait à une production de 7 kg/h d'extrait sec à 21,5 % de pureté en glycosides de stéviol, soit un potentiel de 1,1 kg/h de stévioside et 0,4 kg/h de rébaudioside A.

La projection de fonctionnement annuel d'un tel atelier d'extraction, sous hypothèse d'un système d'organisation d'horaires de travail en 3 x 8 (soit 8000 h de travail par an), correspondrait à une capacité de 180 T de feuilles séchées et compactées de Stévia, en provenance du Paraguay, et un potentiel de 12 T de glycosides de stéviol.

3. Dans l'extracteur bi-vis BC21,

l'adaptation de la configuration du fourreau et du profil de vis permettent d'obtenir en continu, à 60°C à partir de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, une extraction efficace des glycosides de stéviol (environ 56 % de rendement) pour des temps de séjour du mélange dans le fourreau inférieurs à 5 minutes avec des *ratios* liquide-solide deux fois plus faibles qu'un extracteur agité (L/S = 4 à 5). La séparation solide-liquide est réalisée en ligne par filtration pressage dans la dernière partie du fourreau de l'extracteur bi-vis, conduisant à un filtrat brut chargé en fines particules (de l'ordre de 27 % de matière sèche insoluble entrainée) et un raffinat solide, appelé extrudat, à une matière sèche voisine de 42 %, supérieure de 10 % à celle obtenue par filtration centrifuge des mélanges issus de l'extraction en contacteur agité, et qui peut avantageusement être mise en forme de granulats par extrusion dans une filière montée en sortie du fourreau de l'extracteur bi-vis.

Avec un *ratio* liquide-solide de 4,1, à une température de 60°C, le fractionnement de 6,5 kg/h de feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia dans l'extracteur bi-vis BC21 conduit après clarification du filtrat à la production de 17,1 kg/h de filtrat clair contenant 11,1 g/L de stévioside et 5,9 g/L de rébaudioside A (Figure III-43). La production horaire de glycosides de stéviol est alors de 290 g/h avec une productivité horaire de 49,0 g de glycosides de stéviol par kg de matière sèche de feuilles broyées et par heure.

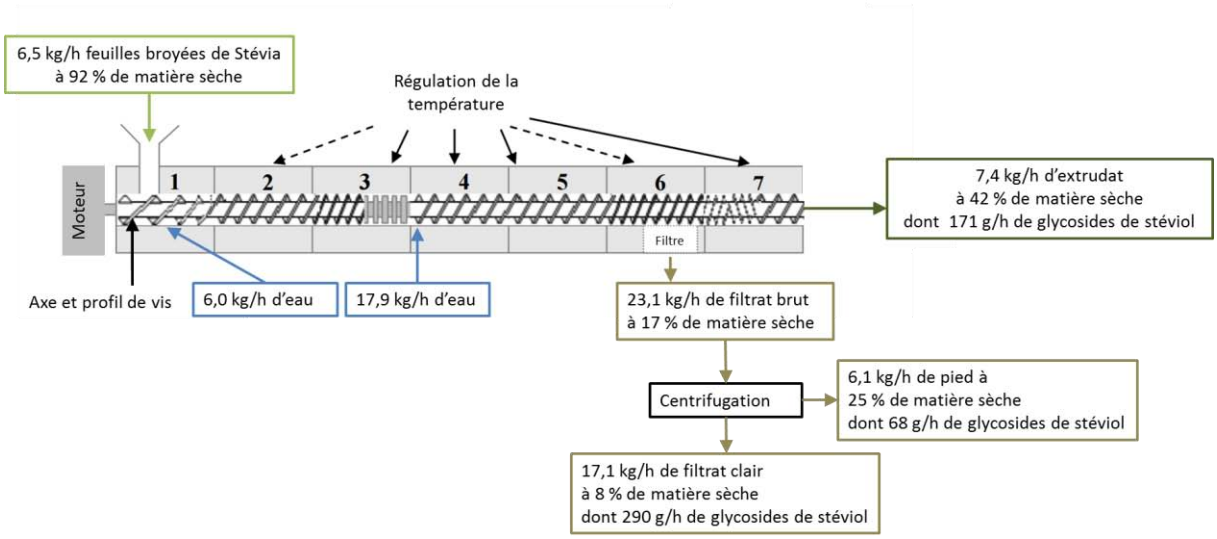


Figure III-43 Bilan de l'extraction des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia du Paraguay en extracteur pilote bi-vis BC21 (essai BV12)

Plusieurs améliorations des résultats obtenus par cette technologie originale et compacte d'extraction solide-liquide peuvent être envisagées pour son transfert à plus grande échelle :

- l'adaptation du système de dosage du solide en tête du fourreau à l'introduction des feuilles entières, ce qui limitera la proportion de fines particules introduites (95 % de particules inférieures à 800 µm dans les feuilles broyées pour moins de 40 % dans les feuilles compactées). Remarquons cependant que les contraintes de cisaillement de la matière exercées par les vis conjuguées à pas direct et les malaxeurs bilobes sont aussi responsables de la génération de fines particules,

- la diminution de la taille des orifices du module de filtration de 1 à 0,5 mm permettant l'écoulement de l'extrait avec moins de particules solides entrainées. Au-delà de cette diminution, techniquement réalisable, les risques d'écrouissage et de rupture mécanique liés à la rotation des vis à la surface des filtres deviennent limitants,

- l'intensification du mélange dans la zone d'extraction du fourreau par allongement des éléments malaxeurs, et/ou leur montage avec un pas négatif, qui augmentent le temps de séjour du mélange dans cette zone et donc les rendements d'extraction,

- l'augmentation du *ratio* liquide-solide, au détriment de la concentration en glycosides de stéviol, mais au bénéfice du rendement d'extraction. Pour un *ratio* liquide-solide de 5, le rendement d'extraction est de 60 % en glycosides de stéviol et la projection pour un débit de 6,5 kg/h de feuilles séchées et broyées, à la limite de l'avalement solide dans le fourreau de l'extracteur bi-vis BC21, conduirait à une production de 317 g/h de glycosides de stéviol, 1,4 fois inférieure à celle obtenue dans l'extracteur agité pour une même charge en feuilles (439 g/h de glycosides de stéviol produit pour 6,5 kg de feuilles séchées de Stévia traitées par heure), mais avec une concentration en stévioside et rébaudioside A dans l'extrait clarifié deux fois plus élevée.

Enfin, deux autres points devraient être validés pour conforter l'apport du procédé :

- le gain en coût d'investissement et de fonctionnement apporté par la clarification par décantation centrifuge des filtrats bruts de l'extraction bi-vis, peu chargés en particules solides, par rapport à la séparation par filtration centrifuge des mélanges issus de l'extraction en contacteur agité correspondant à des volumes à traiter au moins deux fois plus élevés,

- le gain en coût de séchage des raffinats solides et en particulier apporté par la mise en forme du granulat obtenu par extrusion en filière en sortie de l'extracteur bi-vis.

Sans tenir compte de ces améliorations possibles, et sur la base des résultats acquis dans l'extracteur bi-vis pilote BC21, la transposition sur un extracteur de taille du type BC45 ou Evolum 53 devrait permettre de traiter plus de 400 T/an de feuilles séchées de Stévia du Paraguay pour un potentiel de 18 T de glycosides de stéviol produits. Cependant, bien que le dimensionnement des installations et leur coûts de fonctionnement doivent être affinés pour une comparaison avec une installation de capacité équivalente mettant en œuvre l'extraction en contacteur agité (400 T/an de feuilles séchées traités nécessiterait un volume d'extracteur de 450 L pour une production en glycosides de stéviol de 29 T/an), il apparait que les coûts d'investissement des équipements d'extrusion bi-vis (650 à 750 k€ pour un équipement du type Clextral Evolum 53) pénalisent le transfert d'échelle.

C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers la mise au point d'un nouveau procédé d'extraction, adapté au traitement des feuilles séchées et compactées de Stévia, combinant l'extraction et la séparation solide-liquide en continu, mais ne nécessitant pas un coût d'investissement trop élevé.

Chapitre IV
Mise au point d'un extracteur solide-liquide, en continu, à contre-courant et application à l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni



L'extraction solide-liquide est une opération du fractionnement des matières végétales qui a donné lieu au développement de nombreux types d'extracteurs industriels, faisant appel à différentes techniques de mise en contact du solide et du liquide, et à des technologies plus ou moins élaborées pour leur transport permettant le fonctionnement en continu de l'installation (Chapitre I, Partie I.4.2). Les systèmes fonctionnant en percolation du solvant sur un lit de solide mobile (comme l'extracteur Rotocel™ de Dravo (Figure I-49) ou l'extracteur de Bernardini™ (Figure I-51)) nécessitent une préparation de la matière végétale, le plus souvent par broyage et classification, pour contrôler la formation d'un empilement du solide homogène et stable, propice à son gonflement par le solvant et à l'écoulement de ce dernier, sans déformation ou tassement du lit conduisant à l'établissement de chemins préférentiels et une perte d'efficacité des échanges solide-liquide. Ce type d'extracteur par percolation apparait donc moins adapté au traitement direct des feuilles séchées et compactées de Stévia que les systèmes privilégiant le transport du solide par une vis à contre-courant du liquide extractant, comme c'est le cas dans l'extracteur Vatron Mau (Figure I-56) ou Contex™ de GEA Niro (Figure I-57). Cependant, la plupart de ces extracteurs ont été développés pour le traitement de tonnages élevés de matières végétales (> 12 T/j, Tableau I-11) pour limiter l'impact des coûts d'investissement sur les coûts de production ; les équipements de petite capacité sont peu disponibles en standard auprès des équipementiers, ce qui pénalise leur coût de fabrication à façon pour une installation de faible dimension, adaptée au traitement de quelques tonnes par jour. A titre indicatif, le prix d'un extracteur pilote Contex™ GEA Niro d'un volume de 27 L se situe entre 300 et 850 k€ selon les options. A ce coût, il conviendrait de rajouter celui du système de séparation solide-liquide permettant de mieux essorer le raffinat solide que par simple égouttage et de limiter ainsi la dilution du milieu par le solvant lors de l'étape de lavage du solide.

Sur la base des résultats obtenus avec les extracteurs pilote agité et bi-vis, notre objectif a donc été de concevoir et réaliser une nouvelle installation pilote d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles séchées de Stévia mettant en œuvre des technologies disponibles, robustes et éprouvées pour le transport de solide, la mise en contact du solide et du liquide à contre-courant, et le pressage du solide hydraté. Ce dispositif pilote devra fonctionner en continu, directement à partir des feuilles séchées et compactées de Stévia, avec un débit de solide supérieur à 5 kg/h, en assurant :

- un mélange efficace des feuilles et de l'eau pour des *ratios* liquide-solide inférieurs ou égaux à 10, avec des temps de contact du liquide et du solide compris entre 20 et 40 minutes, à une température comprise entre 20 et au moins 60°C,

- et une séparation solide-liquide avec une teneur en matière sèche du raffinat solide d'au moins 25 % et une teneur en matière sèche insoluble au pied entraîné au filtrat inférieure ou égale à 5 %.

IV.1 Conception et réalisation de l'extracteur pilote

IV.1.1 Choix de la technologie de transport des feuilles de Stévia pour l'extraction et la séparation solide-liquide

Les systèmes vis-fourreau sont largement mis en œuvre pour la transformation des matières végétales, que ce soient pour leur convoyage simple par une vis pleine dans un fourreau fermé pour le transport du solide (chargement et déchargement des appareillages), pour leur pressage par une vis de compression radiale ou axiale dans un fourreau filtrant, voire leur extrusion en filière, ou pour leur extraction solide-liquide. Dans ce dernier cas, la forme et la géométrie des vis doivent être adaptées pour permettre le mélange du solide et du liquide et la circulation du liquide et du solide.

La technologie des vis hélicoïdales sans âme, mise en œuvre dans les convoyeurs à vis et les compacteurs (traitement des eaux, élimination des déchets, industrie alimentaire, chimique, *etc.*) peut apporter une solution originale pour la mise au point d'un extracteur solide-liquide. En effet, les essais préliminaires réalisés dans un compacteur à vis sans âme (Figure IV-1) mis à disposition par la société Elhyss (Azay le Rideau, France) spécialisée dans la chaudronnerie industrielle et en particulier de ce type d'équipement, se sont avérés concluants pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay :

- l'appareil mis en œuvre pour ces essais (Figure IV-2) est constitué d'une vis de convoyage sans âme de 2 m de long, d'un diamètre extérieur de 160 mm, avec un pas de vis de 160 mm, installée dans une auge en U de 200 mm de diamètre, inclinée avec un angle de 10° par rapport à l'horizontale. En sortie de l'auge, en partie haute de l'équipement, une zone de pressage du solide, constituée d'un tube de tôle en acier perforé entourant la vis et d'un clapet de fermeture, est installée. En partie basse de l'auge, une grille de filtration est aussi installée pour permettre l'écoulement du liquide. Les surfaces filtrantes en partie basse et haute de l'appareil ont une longueur de 500 mm avec des orifices de 10 mm de diamètre,

- l'introduction des feuilles dans l'appareil permet d'observer leur mouvement lors du transport par les vis en rotation (Figure IV-3) : les feuilles au milieu de l'auge sont poussées par la spire avec un mouvement ascendant contre le côté droit de l'auge et s'accumulent devant la spire puis retombent par gravité au milieu de l'auge, pour être reprises par la spire et continuer ainsi de suite leur parcours. Le mouvement en boucle du solide lors de son transport (Figure IV-4) est particulièrement intéressant pour le mélange solide-liquide et son agitation par brassage. L'augmentation de la vitesse de rotation des vis intensifie le brassage du solide et accélère son transport vers la zone de pressage, à la limite de sa capacité d'avalement (Figure IV-5),

- dans des conditions stables de transport des feuilles par la vis sans âme, l'introduction d'eau dans la partie supérieure de l'auge en U, avant la zone de pressage, avec un *ratio* liquide-solide estimé à 6, a permis d'obtenir un régime stable de fonctionnement conduisant à la production d'un extrait clair qui s'écoule à travers la grille de filtration installée en partie basse de l'auge et d'un extrait plus coloré qui s'écoule à travers la grille de filtration de la zone de pressage. Le rapport massique des deux extraits haut et bas est respectivement de 1 pour 4. Le dosage du stévioside et du rébaudioside A dans ces deux extraits conduit à une estimation des rendements d'extraction de 10 % dans chacun d'entre eux. Ce qui confirme que l'extraction solide-liquide par l'eau s'écoulant à contre-courant des feuilles transportées par la vis sans âme est bien opérante, et que le pressage des feuilles imprégnées est efficace, permettant de récupérer 20 % d'extrait supplémentaire contenant près de la moitié des glycosides de stéviol extraits au total.

Ces premiers résultats, encourageants du point de vue des rendements d'extraction (20 % en glycosides de stéviol pour un *ratio* liquide-solide de 6 et des temps de contact relativement faibles avec une eau à 10°C), établissent la faisabilité technique de la mise en œuvre d'une vis sans âme pour l'extraction aqueuse et la séparation solide-liquide des feuilles de Stévia dans un seul appareillage.

Un nouveau pilote d'extraction continu a donc été défini et réalisé à notre demande par la société Elhyss.

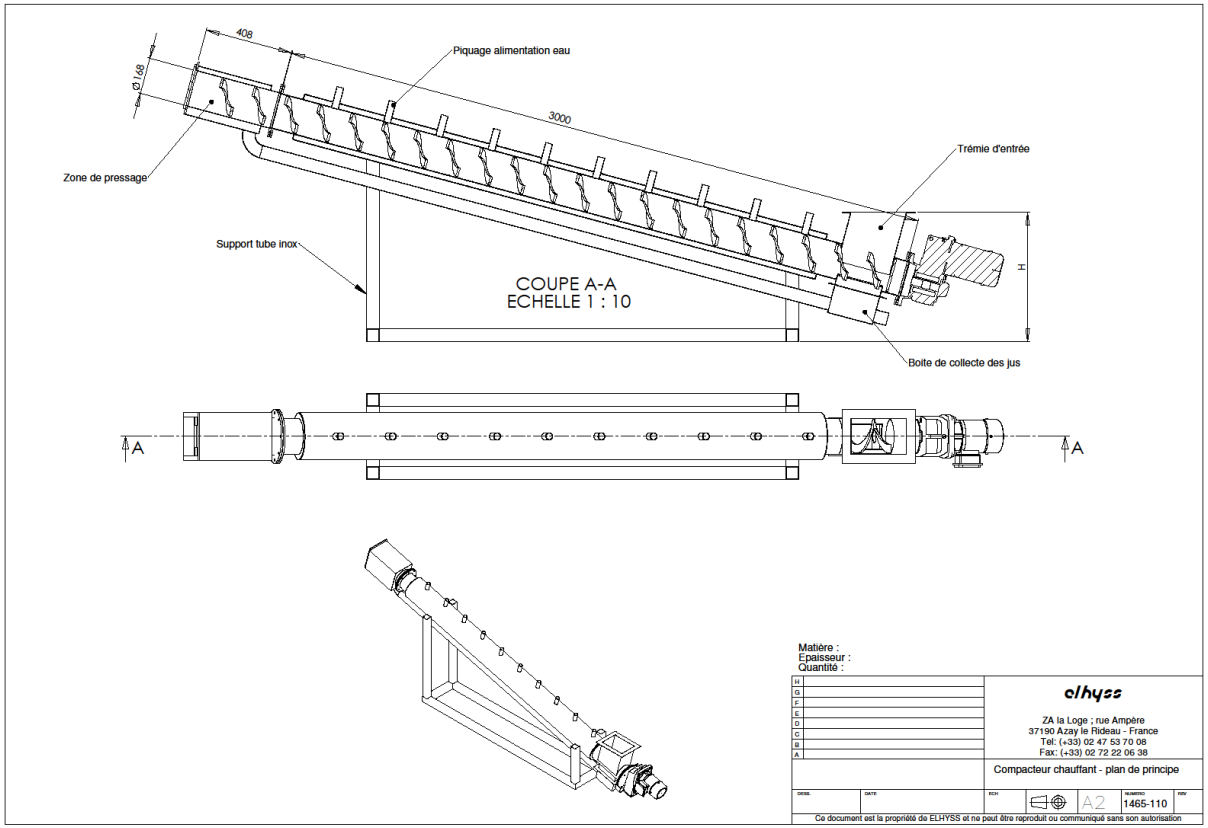


Figure IV-1 Schéma de principe d'un compacteur à vis sans âme proposé par la société Elhyss



Figure IV-2 Photographies du compacteur à vis sans âme fourni par la société Elhyss pour effectuer les tests de faisabilité de l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia

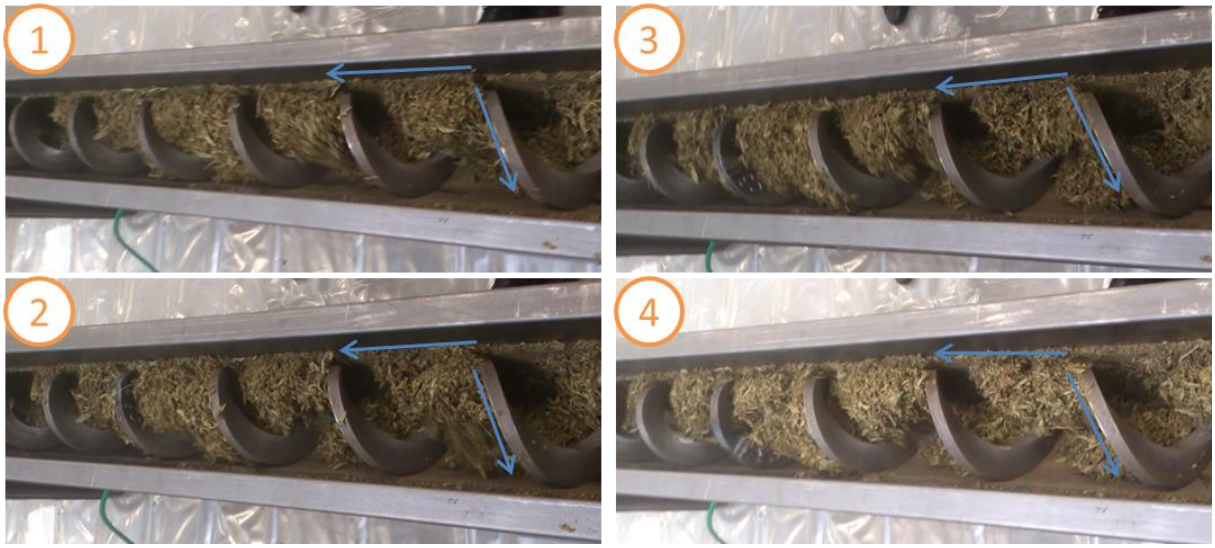


Figure IV-3 Photographies (vue du dessus) successives de la vis sans âme en fonctionnement avec seulement des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay. Les flèches bleues indiquent le mouvement des feuilles.

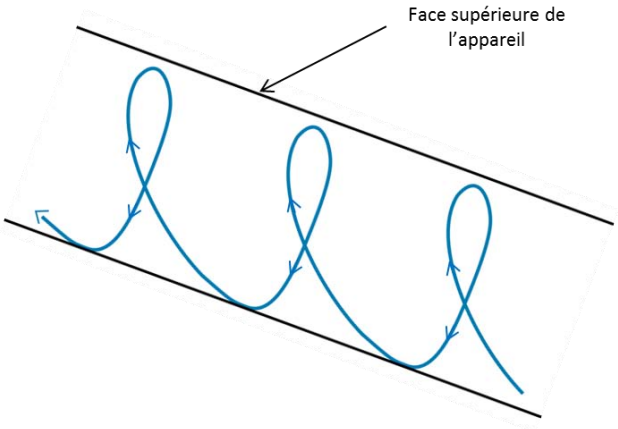


Figure IV-4 Schématisation du mouvement des feuilles



Figure IV-5 Débordement des feuilles de Stévia lors des essais de convoyage dans le compacteur à vis sans âme

IV.1.2 Description de l'extracteur-séparateur solide-liquide continu à vis sans âme

Le plan de l'appareil pilote, que nous nommerons par la suite extracteur pilote VHSA (pour Vis Hélicoïdale Sans Ame) est présenté sur la Figure IV-6 et la Figure IV-7 donne une vue d'ensemble.

L'équipement est constitué d'une vis sans âme en acier inoxydable, d'une longueur de 2700 mm, de diamètre de 160 mm et de pas de 150 mm. Cette vis est installée dans une auge en U, en acier inoxydable, de diamètre de 170 mm, et munie d'une double enveloppe. L'auge et la vis sont disposées de façon inclinée sur un support en acier inoxydable équipé de roulettes. L'inclinaison de l'extracteur est réglable entre 5 et 20°.

Le moteur d'entraînement (Figure IV-7), possédant une puissance de 0,37 kW, est équipé d'un variateur de fréquence afin de pouvoir réguler la vitesse de rotation de la vis de 0 à 15 tr/min. La pompe de recirculation (Figure IV-7), possédant une puissance de 0,78 kW, est aussi équipée d'un variateur de fréquence pour pouvoir contrôler le débit de recirculation de l'extrait de 0 à 3 m^3/h. La mise en route de ce moteur et de cette pompe sont effectuées à partir d'une armoire électrique (Figure IV-7).

En partie basse de l'appareil (Figure IV-7 et Figure IV-8), au-dessus de la vis est disposée la trémie d'alimentation de la matière végétale dont l'ouverture est rectangulaire, de 170 mm de large et 470 mm de long, et est équipée d'une grille de protection. En dessous de la vis, l'auge est munie d'une tôle en acier perforée à 3 mm, d'une longueur de 194 mm et qui permet l'évacuation de l'extrait descendant.

L'évacuation de l'extrait (Figure IV-7), située aussi en partie basse de l'équipement, est amovible afin de pouvoir faire recirculer ou non l'extrait. Dans le cas où l'extrait doit être recirculé, l'évacuation est dirigée vers le haut, obligeant l'extrait à aller vers le bac tampon et être repris par la pompe de recirculation. L'extrait est ensuite convoyé dans les rampes de recirculation (Figure IV-7 et Figure IV-9) et aspergé dans l'extracteur au travers des buses d'aspersion situées de chaque côté de l'auge (Figure IV-9). Une fois le régime permanent atteint, l'extrait peut sortir par l'évacuation, par débordement.

L'arrivée du solvant, elle aussi localisée en bas de l'extracteur, est équipée d'une vanne pointeau permettant de contrôler le débit de solvant. Ce dernier est envoyé dans les rampes d'alimentation de solvant (Figure IV-7 et Figure IV-9) et peut être introduit dans l'extracteur au travers des buses d'aspersion (Figure IV-9).

La partie haute de l'installation (Figure IV-7 et Figure IV-9) est une zone de compression. La vis est entourée d'un tube de tôle en acier perforée à 3 mm, de longueur réglable de 105 mm à 250 mm, permettant l'évacuation de l'extrait de pressage qui peut être combiné avec l'extrait obtenu en partie basse ou être récupéré séparément par la dérivation (Figure IV-7). Au-dessus de cette zone de

compression est disposée une rampe de lavage. Enfin la sortie de l'extracteur est constituée d'un clapet amovible muni de contrepoids afin de pouvoir exercer une pression sur la matière végétale situé dans la zone de compression.

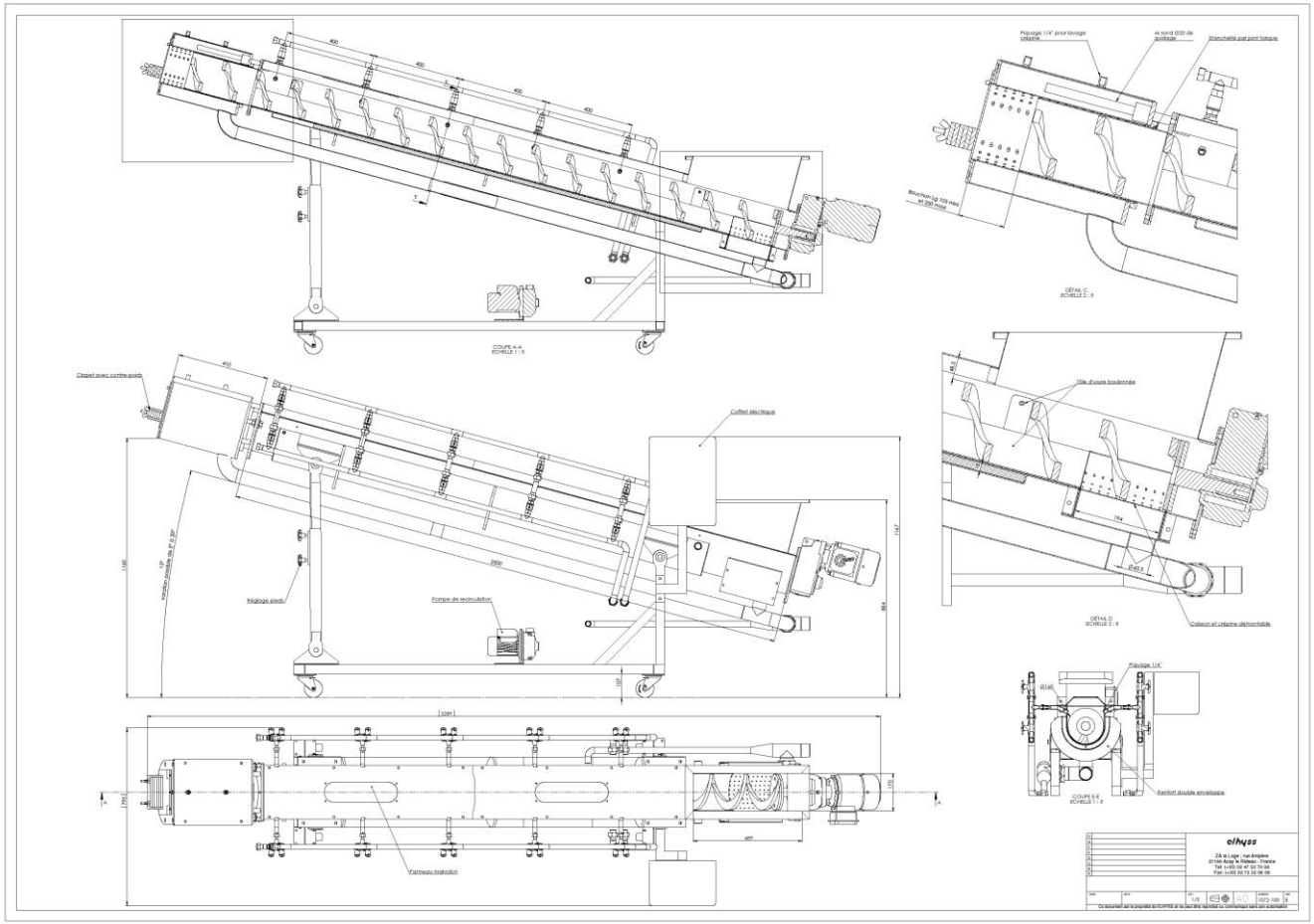


Figure IV-6 Schéma de l'extracteur pilote VHSA

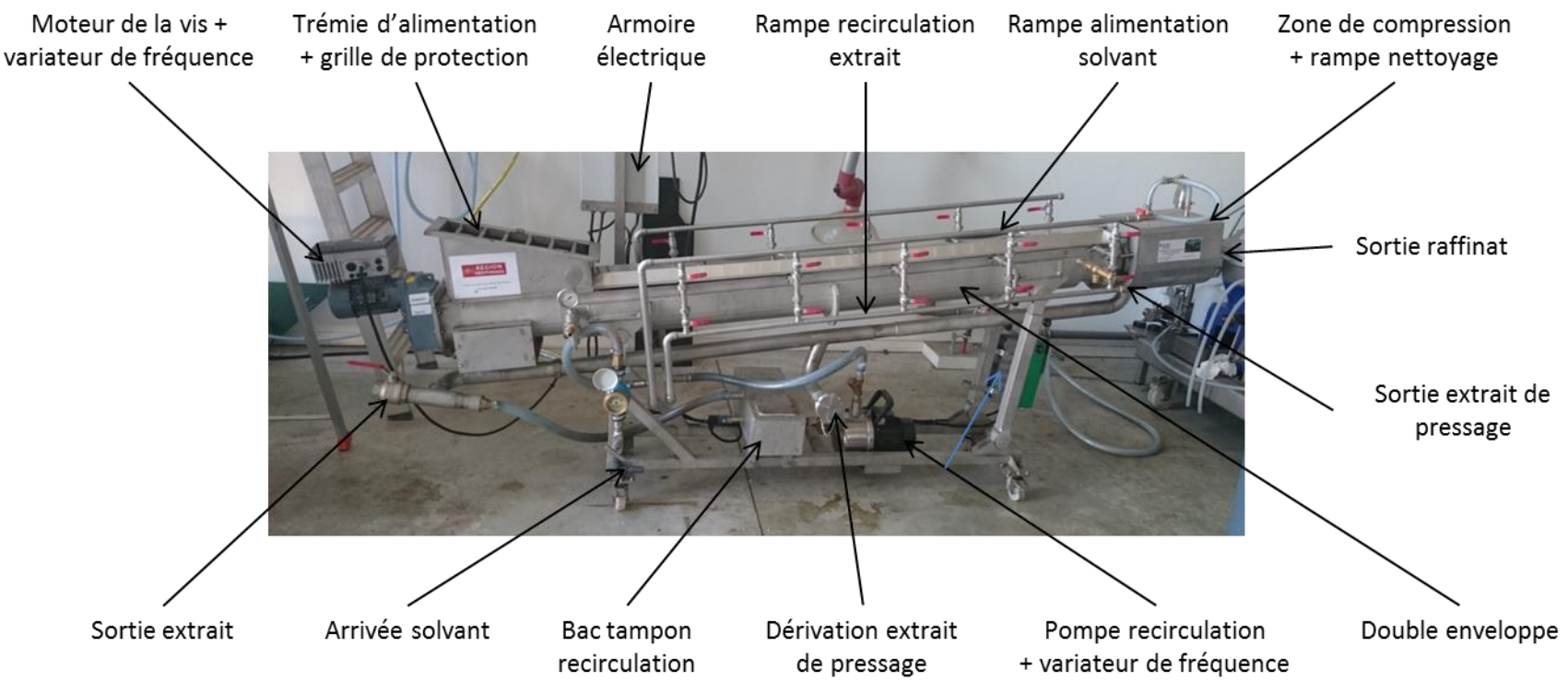


Figure IV-7 Photographie de l'extracteur pilote VHSA

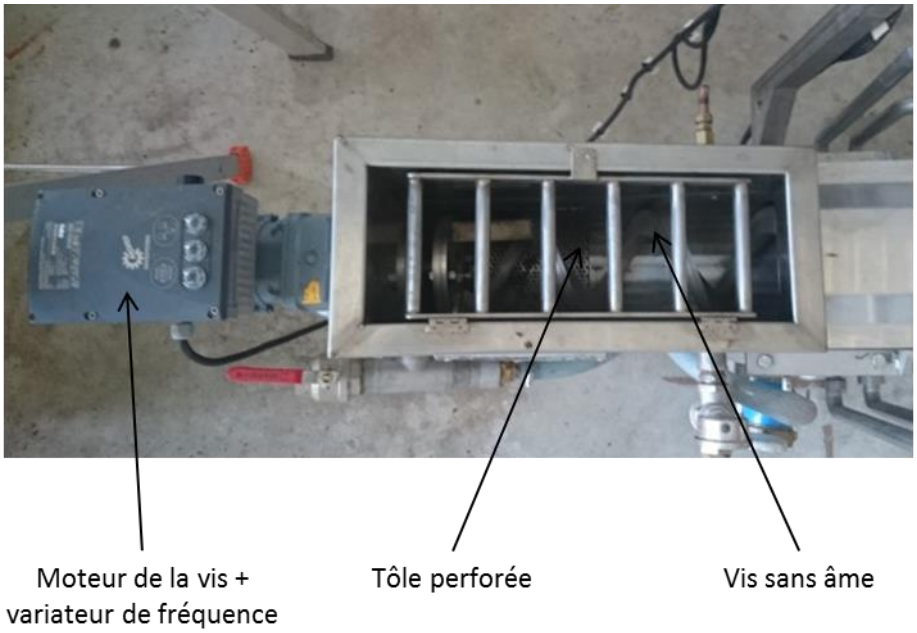


Figure IV-8 Photographie (vue de dessus) de la partie basse de l'extracteur pilote VHSA

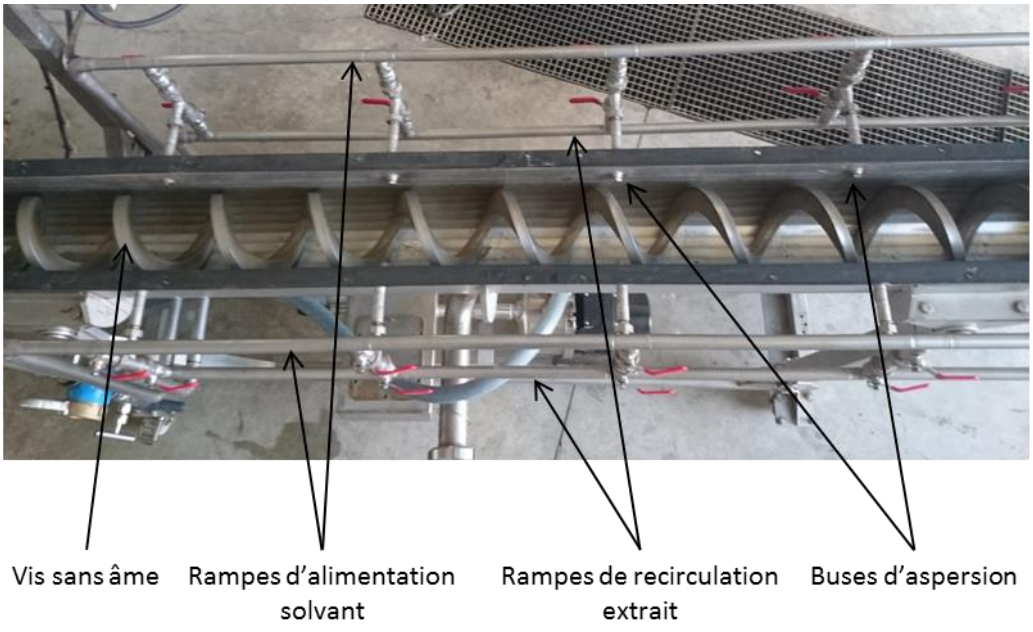


Figure IV-9 Photographie (vue du dessus) de la partie centrale de l'extracteur pilote VHSA

La Figure IV-10 représente les différents points d'alimentation en feuille et en eau ainsi que les sorties du raffinat et du filtrat brut rassemblant les deux extraits :

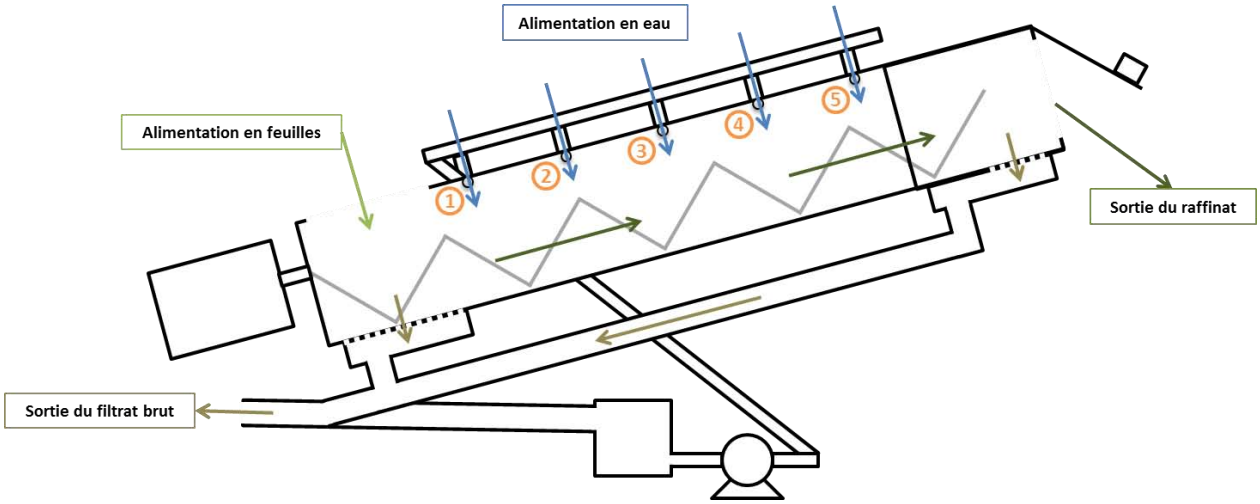


Figure IV-10 Représentation schématique de l'extracteur pilote VHSA

L'eau peut être introduite par l'intermédiaire de deux rampes d'alimentation situées de part et d'autre de l'auge en U, équipées chacune de 5 buses condamnables réparties régulièrement le long de la vis sans âme, de la zone d'introduction des feuilles (emplacement 1) à l'entrée dans la zone de pressage (emplacement 5). Le débit maximum d'alimentation en eau à pression du réseau, sans débordement, en l'absence de feuilles mais en rotation de la vis est de 725 ± 6 L/h pour toutes les buses ouvertes et de 219 ± 6 L/h pour les seules buses ouvertes à l'emplacement 5. Le débit maximum de la pompe de recirculation du filtrat est de 3 m^3/h.

Le solide est introduit par l'intermédiaire d'une vis de convoyage, fournie par la SICA l'Epi Salvagnacois et modifiée par nos soins (Figure IV-11). Cette vis de convoyage à âme pleine de 3,15 m avec un diamètre de 150 mm et un pas de 150 mm, placée dans une auge en U de diamètre 192 mm, entraînée par un moteur de 2,2 kW pouvant réguler la vitesse de rotation de 0 à 1420 tr/min par l'intermédiaire d'un variateur de fréquence, permet de transporter les feuilles séchées et compactées de Stévia d'une trémie placée au niveau du sol à l'alimentation du pilote par gravité. Le débit maximum d'alimentation en feuilles séchées et compactées de Stévia du pilote, sans débordement de l'auge et en l'absence de contrepoids du clapet de fermeture de la zone de pressage, est fonction de la vitesse de rotation de la sis sans âme (Figure IV-12). En l'absence d'injection d'eau, il atteint 130 kg/h pour une vitesse de rotation de la vis de 11 à 15 tr/min.

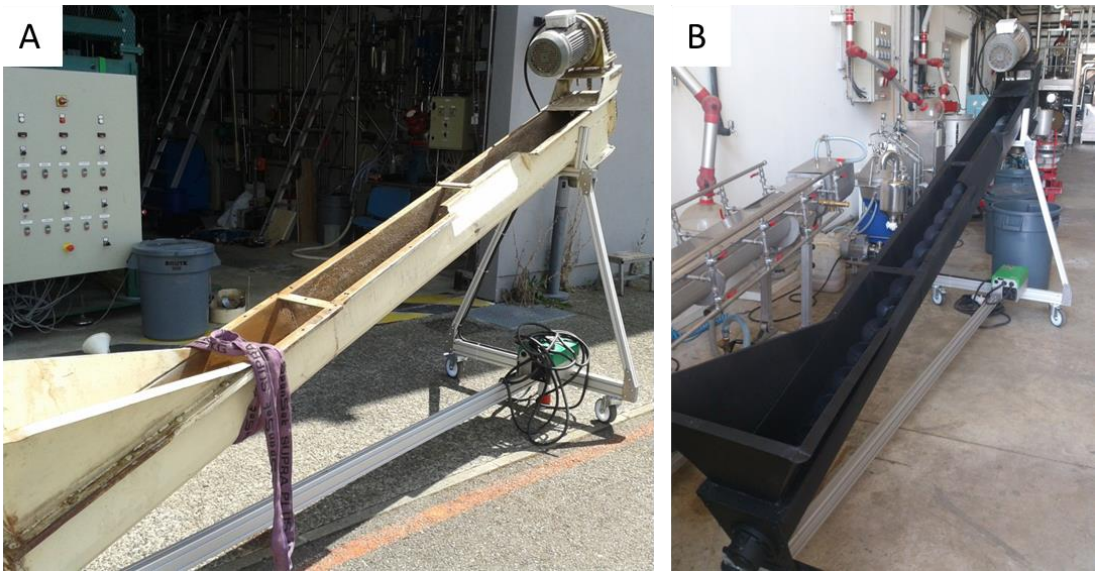


Figure IV-11 (A) Vis d'alimentation fournie par société d'intérêt collectif agricole l'Epi Salvagnacois montée sur un châssis mobile et équipée d'un variateur de fréquence (B) et traitée par un revêtement de peinture anti-rouille

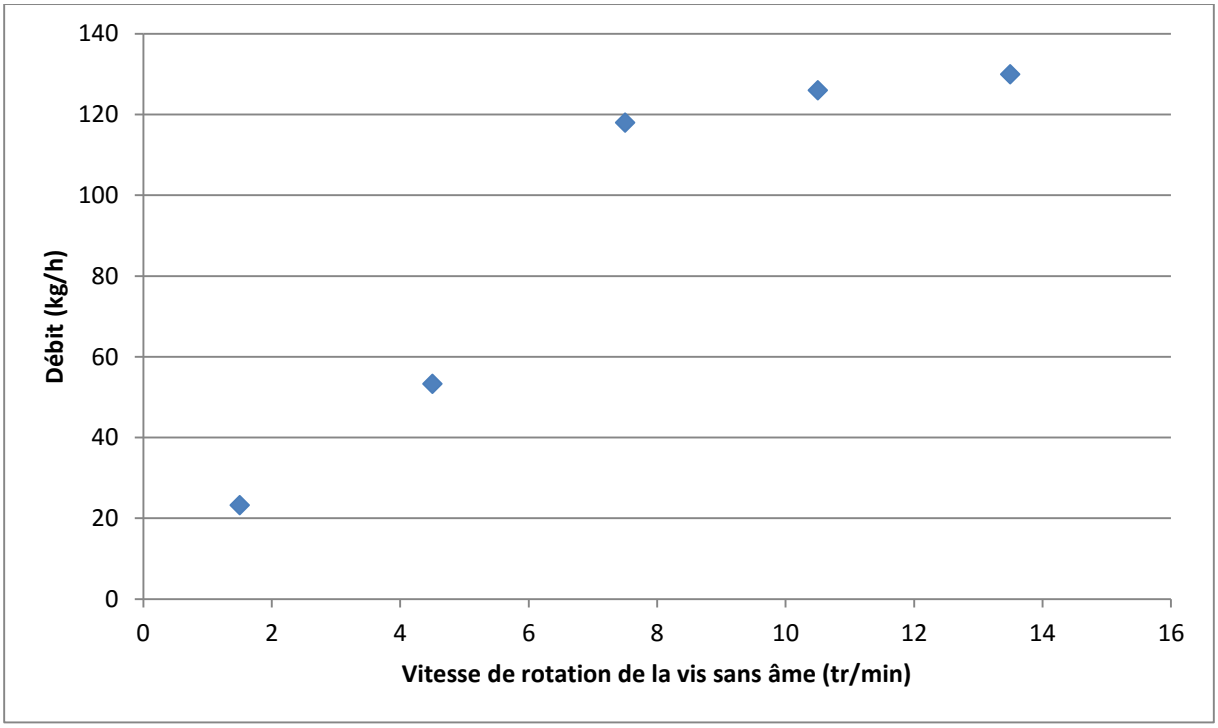


Figure IV-12 Evolution du débit maximal de feuilles selon la vitesse de rotation de la vis de l'extracteur pilote VHSA

Le Tableau IV-1 rassemble les différentes variables opératoires et leur domaine de variation qui doivent être fixés pour la mise en route de l'installation pilote :

Tableau IV-1 Conditions opératoires d'extraction modulables de l'extracteur pilote VHSA

Condition opératoire	Valeurs accessibles
Débit de feuilles à traiter	0 à 130 kg/h
Débit d'eau	0 à 725 kg/h
Emplacement de l'alimentation de l'eau	Buses n°1 à 5
Recirculation du filtrat brut	0 à 3 m^3/h
Emplacement de la recirculation du filtrat brut	Buses n°1 à 5
Inclinaison de l'extracteur	5° à 20°
Vitesse de rotation de la vis	0 à 15 tr/min
Longueur de bouchon	10,5 à 250 cm
Contrepoids	0 à 3,375 kg
Température d'extraction	20 à 120 °C

Le protocole des essais réalisés dans ce nouvel extracteur pilote VHSA est le suivant :

Le débit de feuilles séchées et compactées délivré par la vis d'alimentation est vérifié par pesée pendant une durée de 15 minutes. La configuration du pilote est vérifiée (inclinaison, longueur de bouchon, contrepoids, point d'alimentation en eau et de recirculation de l'extrait). La vis sans âme est mise en rotation à la vitesse souhaitée et les feuilles et l'eau sont ensuite introduites. Lorsque le régime stationnaire de fonctionnement est atteint, au bout de 30 à 60 minutes selon les conditions opératoires pour obtenir un débit de filtrat brut et de raffinat stables, leur prélèvements sont effectués pendant une durée de 20 minutes et les débits réels de sortie sont calculés. Ces prélèvement sont pesés et stockés en chambre froide à 4°C pour être analysés selon les mêmes protocoles que ceux décrits pour les essais pilotes avec l'extracteur bi-vis (Chapitre III, Partie III.3.2). C'est-à-dire que le raffinat a été réextrait et ses teneurs en glycosides de stéviol et en matière sèche ont été déterminés. Le filtrat brut a été clarifié par filtration puis centrifugation et les teneurs en glycosides de stéviol et en matière sèche, du filtrat clair et du pied, ont été mesurées.

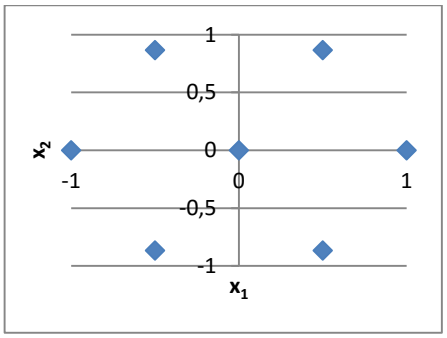
IV.2 Etude des conditions de fonctionnement de l'extracteur-séparateur solide-liquide continu à vis sans âme

Les essais préliminaires de mise en marche de la nouvelle installation pilote ont montré qu'un fonctionnement stable pourrait être obtenu dans une large gamme de variation de *ratio* liquide-solide et de vitesse de rotation de la vis sans âme, pour une température de l'eau de 20°C (température ambiante), une inclinaison de l'auge en U minimum de 5°, en l'absence de recirculation, un contrepoids de 3,375 kg au clapet de sortie du raffinat et une longueur de bouchon de 11 cm. Nous avons donc choisi d'étudier l'influence de ces deux facteurs en première approche dans ces conditions fixées pour les 5 autres.

IV.2.1 Etude de l'influence du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme sur l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia

L'influence de la vitesse de rotation de la vis et du *ratio* liquide-solide sur l'extraction des glycosides des feuilles de Stévia dans l'extracteur pilote est réalisée grâce à un plan d'expériences de type Doehlert à deux facteurs (Doehlert, 1970) (Tableau IV-2) :

Tableau IV-2 Coordonnées codées des variables 1 et 2 d'un plan d'expériences de type Doehlert à deux facteurs



Essai	x_1	x_2
1	0	0
2	1	0
3	0,5	0,866
4	-0,5	0,866
5	-1	0
6	-0,5	-0,866
7	0,5	-0,866

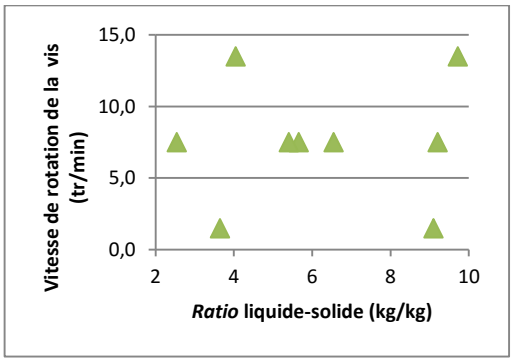
Le domaine expérimental établi pour ces deux facteurs est :

- pour le *ratio* liquide-solide (R) de 3, valeur minimale en dessous de laquelle les feuilles absorbent la quasi-totalité de l'eau, et 10, la valeur qui nous a permis d'obtenir de bons résultats à l'échelle laboratoire et pilote,

- pour la vitesse de rotation de la vis sans âme (V) de 1,5 tr/min à 13,5 tr/min, représentant respectivement 10 % et 90 % de la puissance utilisable du moteur qui entraîne la vis. Cependant, l'eau est injectée au travers des buses n°5 à un débit fixé, et le *ratio* liquide-solide a été ajusté par le débit d'alimentation en feuilles. Les valeurs réellement atteintes pour le *ratio* liquide-solide sont légèrement décalées par rapport à la répartition des points expérimentaux délivrés par le plan de Doehlert, et les coordonnées codées de la matrice d'expérience ont été corrigées (Tableau IV-3). Deux expériences supplémentaires ont été réalisées au voisinage du centre du domaine.

Tableau IV-3 Coordonnées réelles et codées des variables *ratio* liquide-solide et vitesse de rotation de la vis du plan d'expériences pour les extractions des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA

Essai	x_R	x_V	R (kg/kg)	V (tr/min)
1	-0,240	0,000	5,7	7,5
2	0,774	0,000	9,2	7,5
3	0,921	0,866	9,7	13,5
4	-0,701	0,866	4,0	13,5
5	-1,131	0,000	2,5	7,5
6	-0,814	-0,866	3,6	1,5
7	0,742	-0,866	9,1	1,5
8	-0,314	0,000	5,4	7,5
9	0,014	0,000	6,6	7,5



Les autres conditions opératoires sont rappelées dans le Tableau IV-4 :

Tableau IV-4 Autres conditions opératoires du plan d'expériences pour les extractions des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA

Facteur	Valeur
Température de l'eau	20°C

Inclinaison	5°
Recirculation	Non
Contrepoids	3,375 kg
Longueur de bouchon	11 cm

Les réponses étudiées sont les rendements en stévioside (Y_{Stev}) et en rébaudioside A (Y_{RebA}) dans le filtrat clair, exprimés comme suit :

$$Y_{Stev} = \frac{Débit\ de\ stévioside\ dans\ le\ filtrat\ clair}{Débit\ de\ stévioside\ dans\ l'alimentation\ en\ feuilles}$$

$$Y_{RebA} = \frac{Débit\ de\ rébaudioside\ A\ dans\ le\ filtrat\ clair}{Débit\ de\ Rébaudioside\ A\ dans\ l'alimentation\ en\ feuilles}$$

Le Tableau IV-5 et le Tableau IV-6 rassemblent respectivement, les débits globaux et les débits en glycosides de stéviol obtenus pour le plan d'expériences. Les réponses déterminées pour ces essais sont présentées dans le Tableau IV-7.

Tableau IV-5 Débits du plan d'expériences de Doehlert à deux facteurs pour l'étude de l'influence du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme sur l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA

Essai	R (kg/kg)	V (tr/min)	Débit feuilles		Débit eau	Débit filtrat				Débit raffinat	
						Filtrat clair		Pied			
			Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)
1	5,7	7,5	9,18	8,45	47,07	33,79	1,14	1,46	0,25	21,00	7,06
2	9,2	7,5	5,97	5,50	50,13	38,63	1,02	1,50	0,23	15,97	4,25
3	9,7	13,5	5,66	5,21	50,16	40,07	0,84	1,88	0,40	13,87	3,96
4	4,0	13,5	13,00	11,96	47,38	28,02	1,10	1,60	0,34	30,76	10,52
5	2,5	7,5	21,11	19,42	47,69	18,98	0,93	1,02	0,22	48,80	18,27
6	3,6	1,5	14,31	13,16	46,89	27,99	1,49	0,81	0,19	32,40	11,48
7	9,1	1,5	5,99	5,51	49,65	41,29	1,03	0,81	0,16	13,53	4,32
8	5,4	7,5	9,62	8,85	47,01	32,36	1,09	1,39	0,24	22,88	7,52
9	6,6	7,5	8,15	7,50	48,47	34,15	1,15	1,47	0,26	21,00	6,09

Tableau IV-6 Débits en glycosides de stéviol du plan d'expériences de Doehlert à deux facteurs pour l'étude de l'influence du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme sur l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA

Essai	Stévioside				Rébaudioside A			
	Débit feuilles (g/h)	Débit filtrat		Débit raffinat (g/h)	Débit feuilles (g/h)	Débit filtrat		Débit raffinat (g/h)
		Filtrat clair (g/h)	Pied (g/h)			Filtrat clair (g/h)	Pied (g/h)	
1	464	151	8	305	180	56	3	121
2	349	142	7	200	124	54	3	68
3	319	124	7	189	124	48	3	72
4	645	166	11	468	260	59	4	197
5	1020	130	7	883	422	45	3	375
6	801	210	6	585	292	72	2	218
7	368	158	4	207	142	61	1	79
8	530	166	8	356	198	61	3	134
9	435	156	8	271	164	55	3	106

Tableau IV-7 Réponses dans les conditions opératoires définies par le plan d'expériences de Doehlert à deux facteurs pour l'étude de l'influence du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme sur l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA

Essai	R (kg/kg)	V (tr/min)	Y_{Stev}	Y_{RebA}
1	5,7	7,5	32%	31%
2	9,2	7,5	41%	43%
3	9,7	13,5	39%	39%
4	4,0	13,5	26%	23%
5	2,5	7,5	13%	11%
6	3,6	1,5	26%	25%
7	9,1	1,5	43%	43%
8	5,4	7,5	31%	31%
9	6,6	7,5	36%	33%

Le calcul des coefficients du modèle polynomial du second degré reliant les variables codées aux réponses étudiées (voir Annexe 2 pour plus de détails) conduit aux équations suivantes :

$$Y_{Stev} = 0{,}359(\pm 0{,}007) + 0{,}107(\pm 0{,}006)x_R - 0{,}019(\pm 0{,}007)x_V - 0{,}002(\pm 0{,}009)x_R x_V - 0{,}082(\pm 0{,}011){x_R}^2 + 0{,}032(\pm 0{,}011){x_V}^2$$

$$Y_{RebA} = 0{,}350(\pm 0{,}013) + 0{,}128(\pm 0{,}011)x_R - 0{,}026(\pm 0{,}013)x_V + 0{,}001(\pm 0{,}016)x_R x_V - 0{,}069(\pm 0{,}021){x_R}^2 + 0{,}017(\pm 0{,}021){x_V}^2$$

Le Tableau IV-8 rassemble les valeurs des coefficients de régression (R^2) de ces modèles pour les deux molécules extraites. Joglekar et May (1987) ont suggéré que pour avoir une bonne concordance du modèle, il faut que le coefficient de régression ait une valeur minimum de 0,80. Pour le stévioside nous avons obtenu un R^2 de 0,99 et pour le rébaudioside A un R^2 de 0,98. Ainsi les rendements d'extraction sont représentés de façon adéquate par le modèle dans le domaine expérimental choisi. La Figure IV-13 et la Figure IV-14 montrent que le *ratio* liquide-solide est le facteur le plus influent, et que l'interaction entre le *ratio* liquide-solide et la vitesse de rotation de la vis n'est pas significative. Les deux facteurs n'auraient donc pas ou peu d'interaction entre eux, et donc les rendements d'extraction dépendraient principalement de la variation individuelle des variables indépendantes.

Tableau IV-8 Valeurs des coefficients de régression R^2 des modèles pour le stévioside et le rébaudioside A

Molécule	R^2
Stévioside	0,9942
Rébaudioside A	0,9837

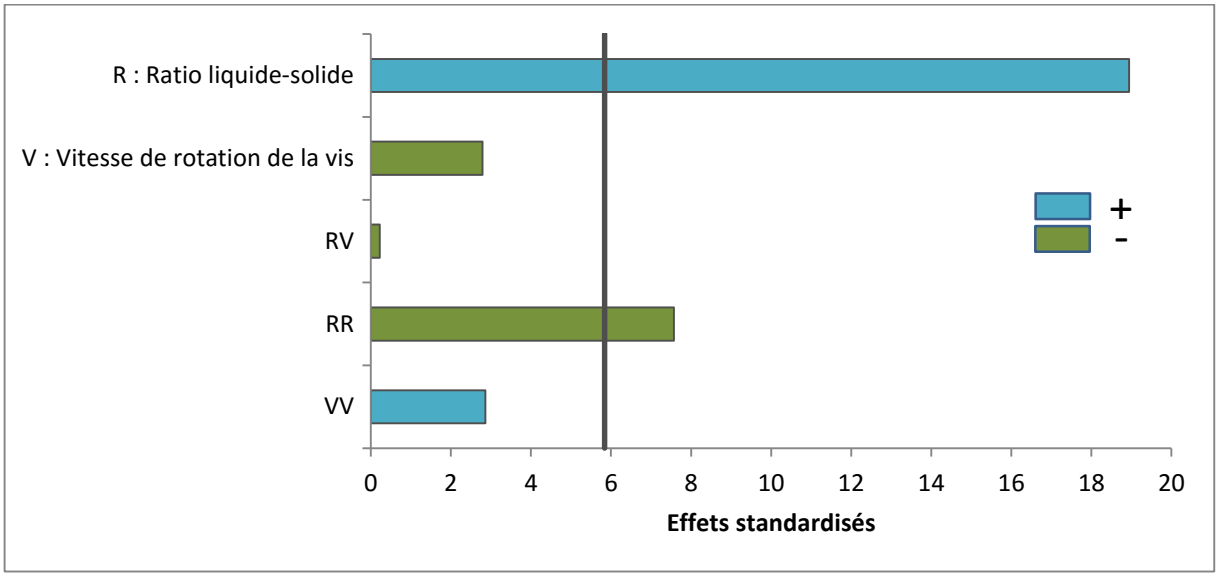


Figure IV-13 Diagramme de Pareto standardisé montrant l'effet des différents coefficients des facteurs sur les valeurs de rendement d'extraction du stévioside. Les barres dépassant la ligne verticale sur le graphe indiquent que les coefficients des facteurs correspondants sont significatifs (p < 0,05)

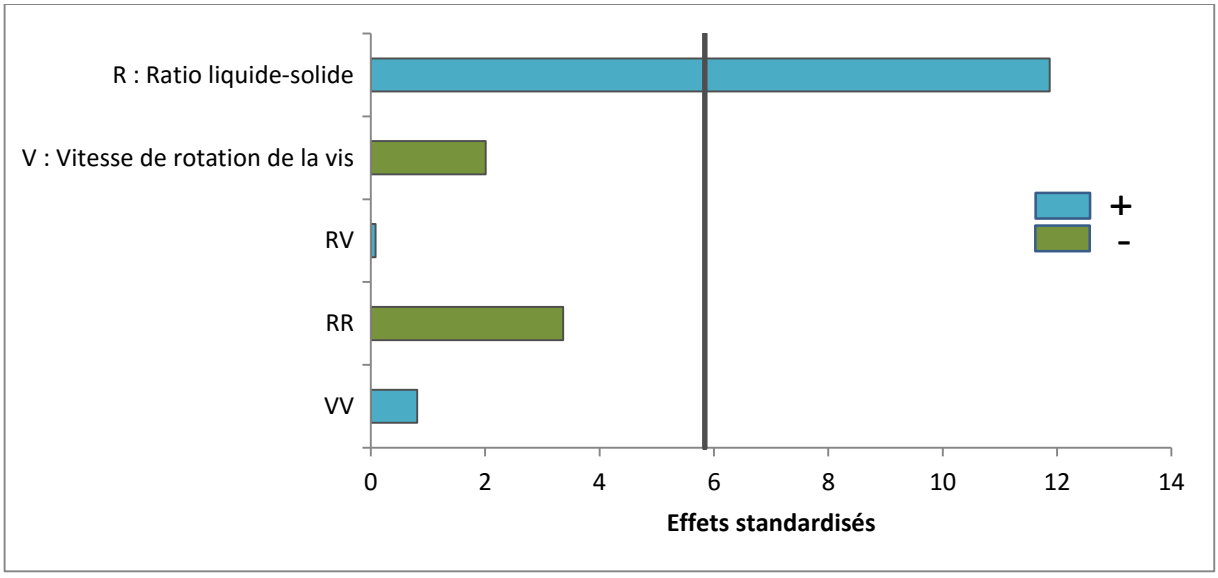
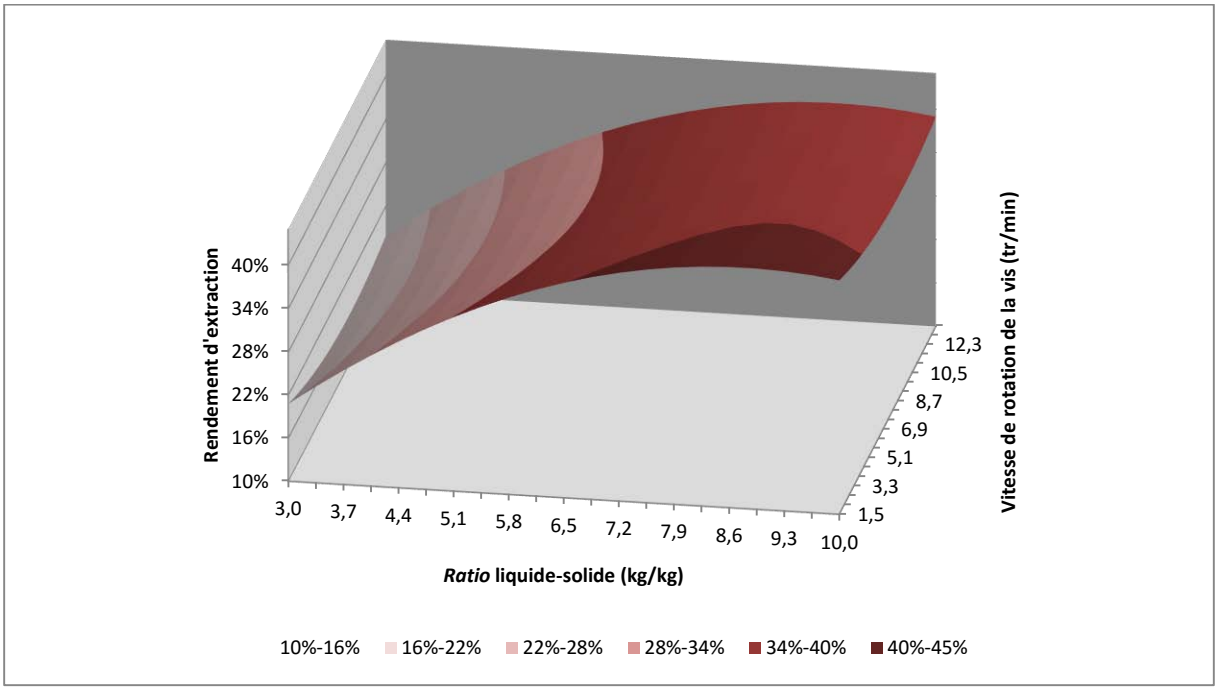


Figure IV-14 Diagramme de Pareto standardisé montrant l'effet des différents coefficients des facteurs sur les valeurs de rendement d'extraction du rébaudioside A. Les barres dépassant la ligne verticale sur le graphe indiquent que les coefficients des facteurs correspondants sont significatifs (p < 0,05)

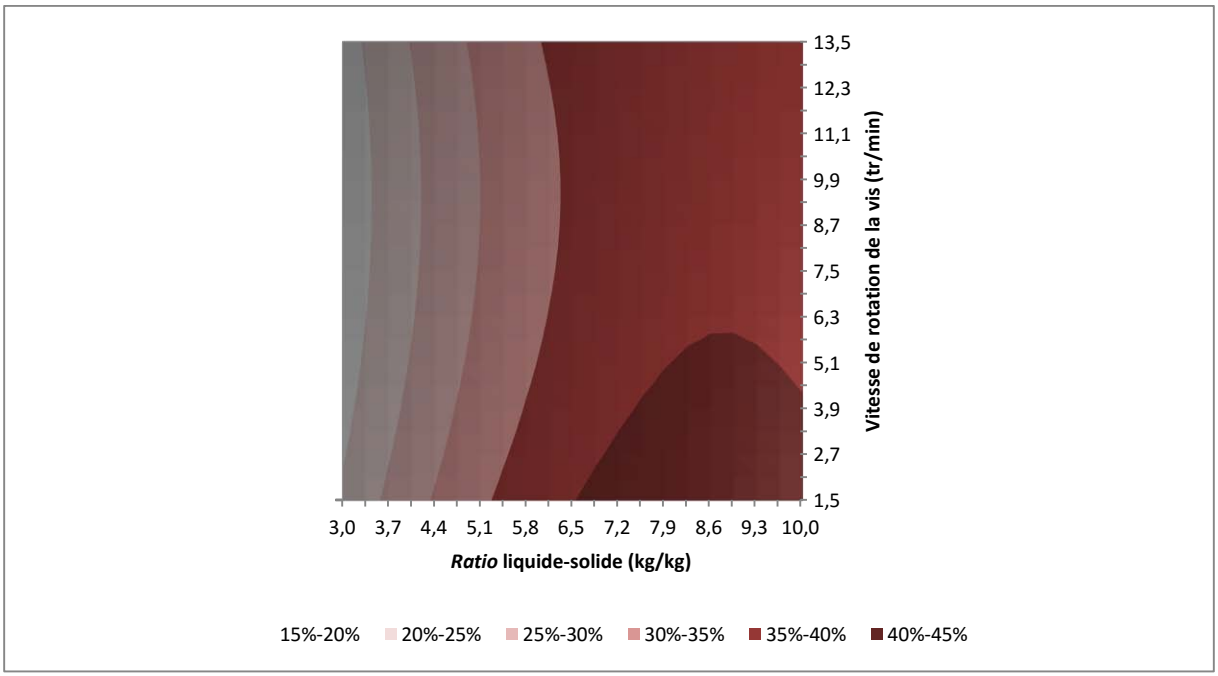
Les surfaces de réponse tracées grâce à ces modèles illustrent parfaitement l'influence de ces deux facteurs sur le rendement en stévioside (Figure IV-15), et en rébaudioside A (Figure IV-16) extraits :

- l'augmentation du *ratio* liquide-solide d'une valeur de 3 à 6 conduit, quelle que soit la vitesse de rotation de la vis, à une augmentation du rendement d'extraction des deux glycosides de stéviol, d'une valeur de 15 à 20 % et 10 à 15 % pour un L/S voisin de 3 à une valeur de 35 à 40 % pour un L/S voisin de 6, respectivement pour le stévioside et le rébaudioside A,

- au-delà d'un *ratio* liquide-solide de 6, les rendements d'extraction évoluent peu, et ce n'est qu'à plus faible vitesse de rotation de la vis qu'ils atteignent leur valeur maximale, proche de 45 %.

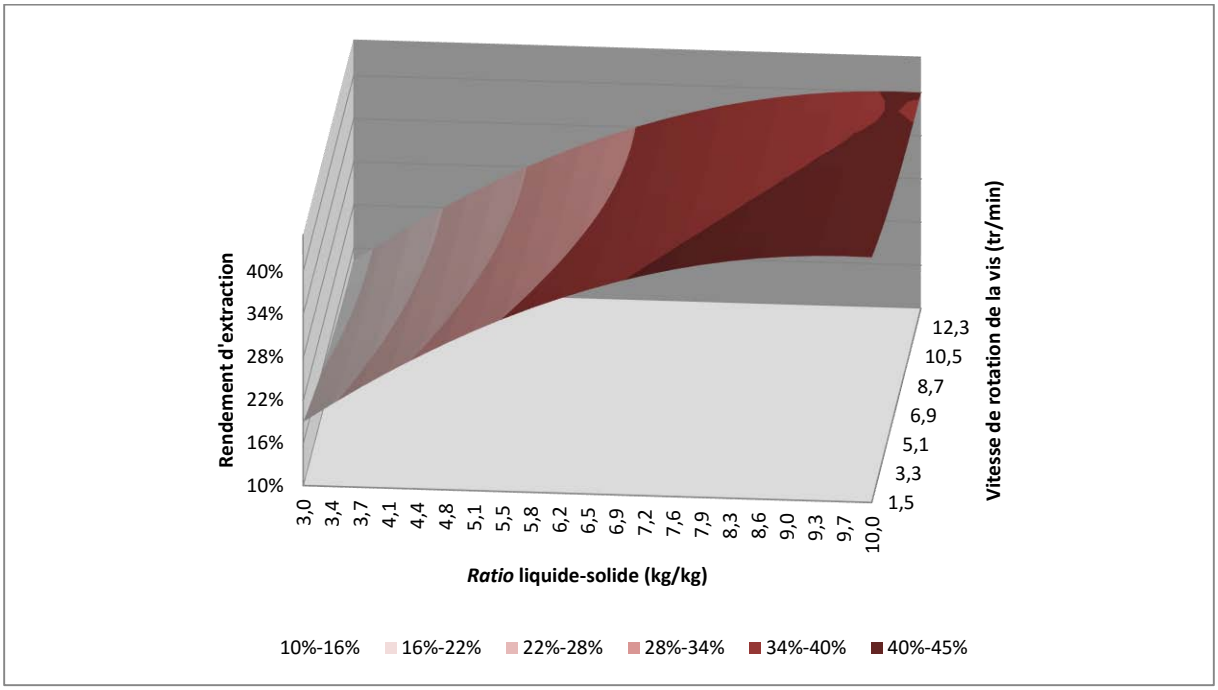


Courbes d'isoréponse en représentation 3D

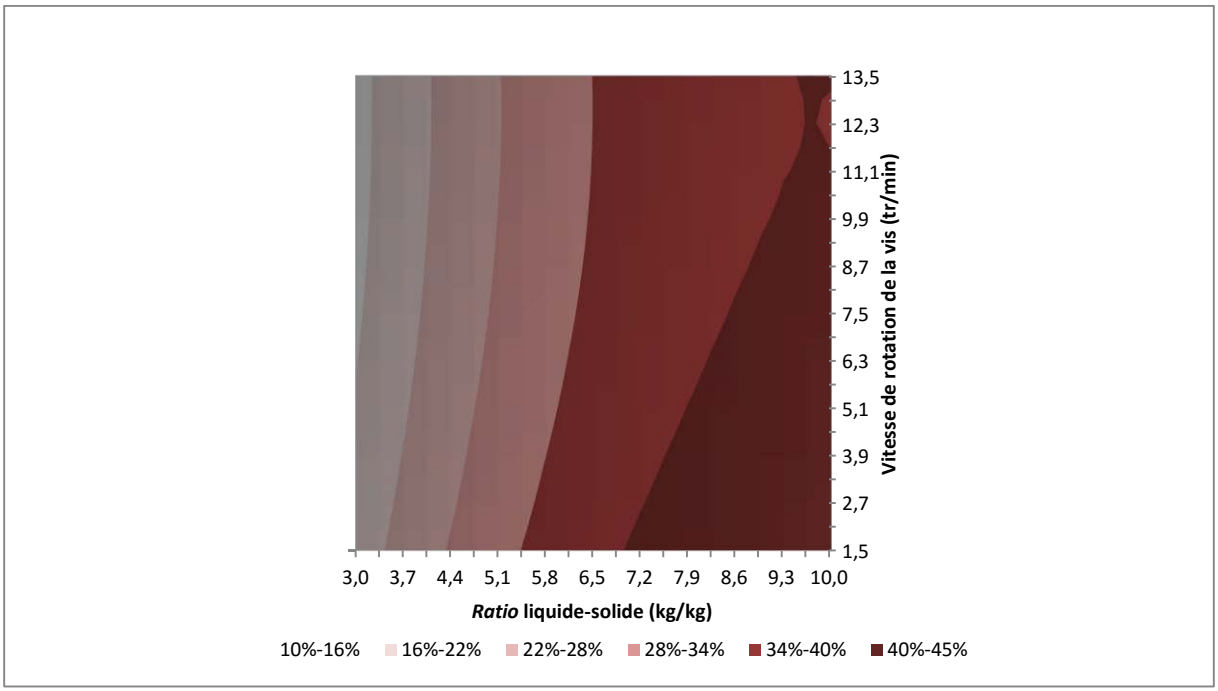


Projection de courbes d'isoréponse dans le plan

Figure IV-15 Surface de réponse du rendement d'extraction en stévioside en fonction du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme



Courbes d'isoréponse en représentation 3D



Projection de courbes d'isoréponse dans le plan

Figure IV-16 Surface de réponse du rendement d'extraction en rébaudioside A en fonction du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme

Ces résultats, qui paraissent cohérents avec l'effet attendu d'une dilution du milieu d'extraction avec l'augmentation du *ratio* liquide-solide, le sont aussi au regard de l'évolution du rendement en glycosides de stéviol extraits en fonction du débit d'introduction des feuilles à débit d'introduction d'eau pratiquement constant (voisin de 48,4 kg/h), quelle que soit la vitesse de rotation de la vis (Figure IV-17).

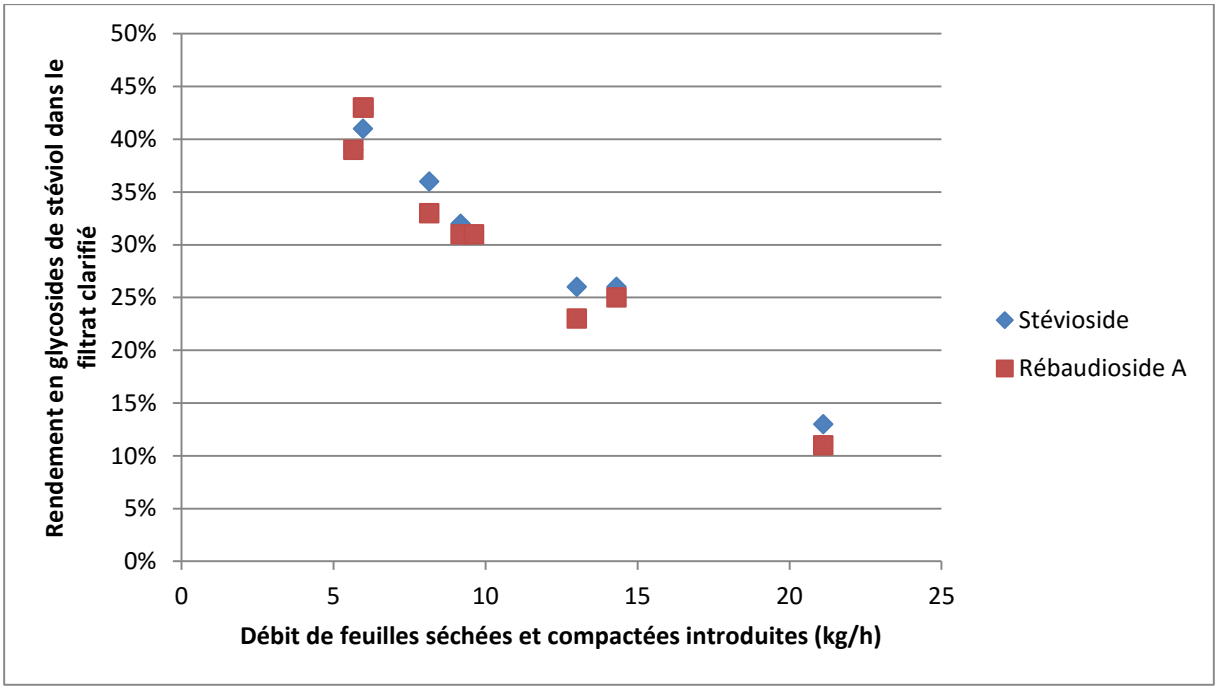


Figure IV-17 Evolution du rendement d'extraction des glycosides de stéviol en fonction du débit de feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay introduites à débit d'eau constant (voisin de 48,4 kg/h) dans l'extracteur pilote VHSA

La linéarité de cette évolution confirme la faible influence de la vitesse de rotation de la vis sans âme, mais fait aussi apparaître l'importance du taux de remplissage de l'extracteur-séparateur. A faible *ratio* liquide-solide (L/S ≤ 3) et fort débit de feuilles, toute l'eau introduite serait absorbée par les feuilles et le mélange peu hydraté serait transporté par la vis pour être pressé efficacement jusqu'à des valeurs de matière sèche du raffinat supérieures à 35 %. Le fonctionnement du pilote s'apparenterait alors à celui d'une presse ou d'un compacteur. Avec la diminution du taux de remplissage en solide à débit de liquide constant (et donc à *ratio* liquide-solide croissant), l'extraction solide-liquide dans le système vis sans âme-auge en U devient de plus en plus efficace et le fonctionnement du pilote s'apparente à un extracteur agité couplé à une presse. Le faible effet d'une augmentation du *ratio* liquide-solide au-delà de 6, observé sur les courbes d'isoréponse de rendements en glycosides de stéviol (Figure IV-15 et Figure IV-16) s'expliquerait alors pas la moindre

efficacité de mélange à taux de remplissage en solide élevé (fort débit de feuilles) dans la partie extracteur, et de pressage, comme le montre la tendance à l'augmentation de la matière sèche des raffinats avec la diminution du débit de feuilles à débit d'eau constant (Figure IV-18).

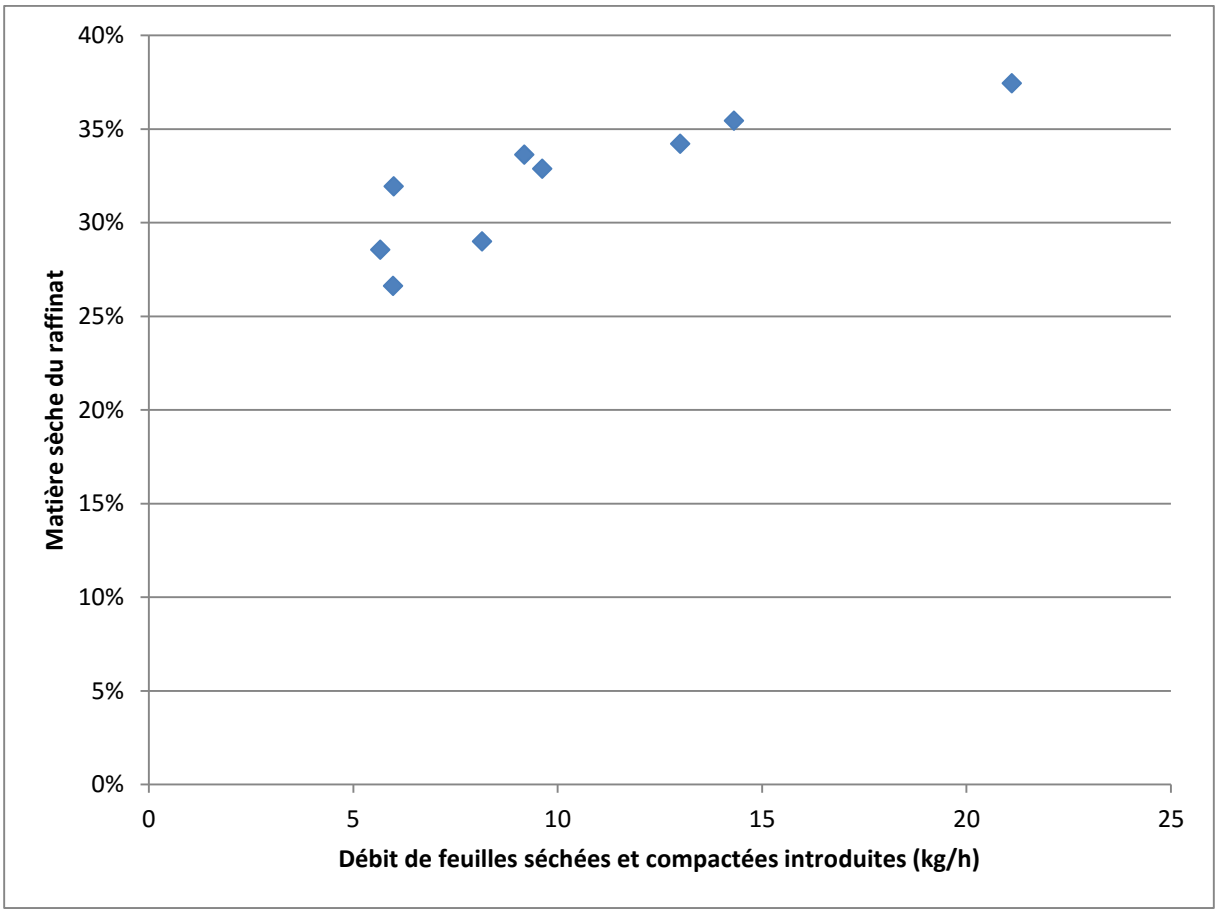
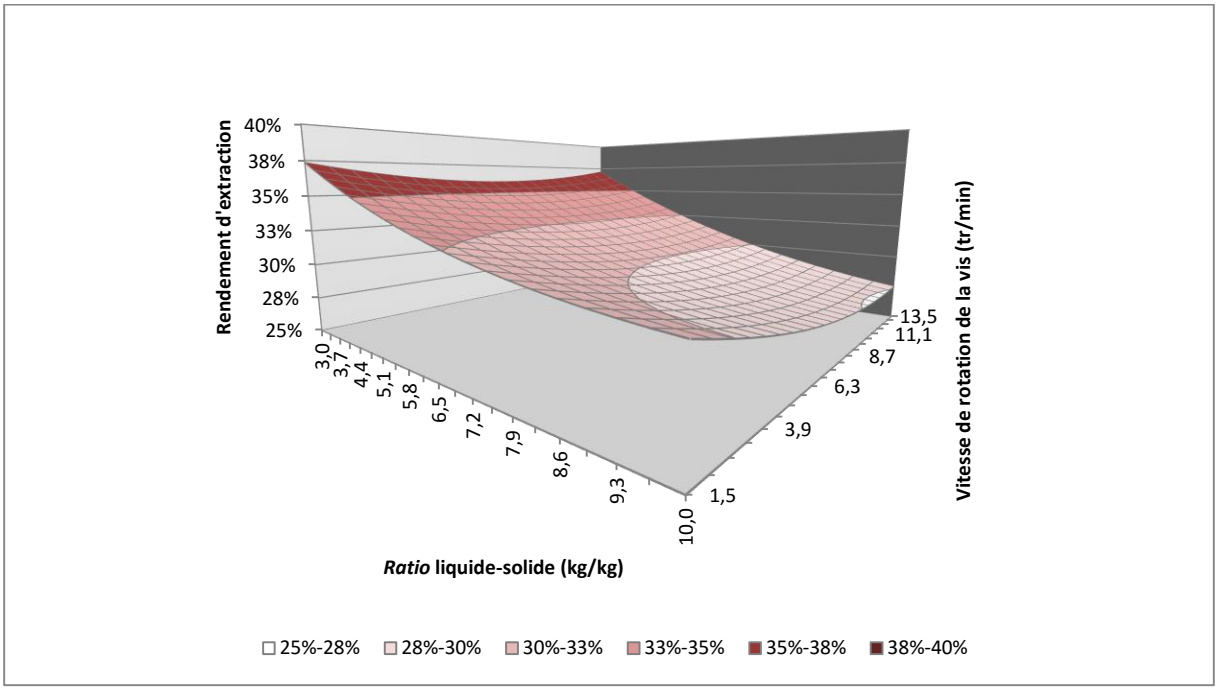
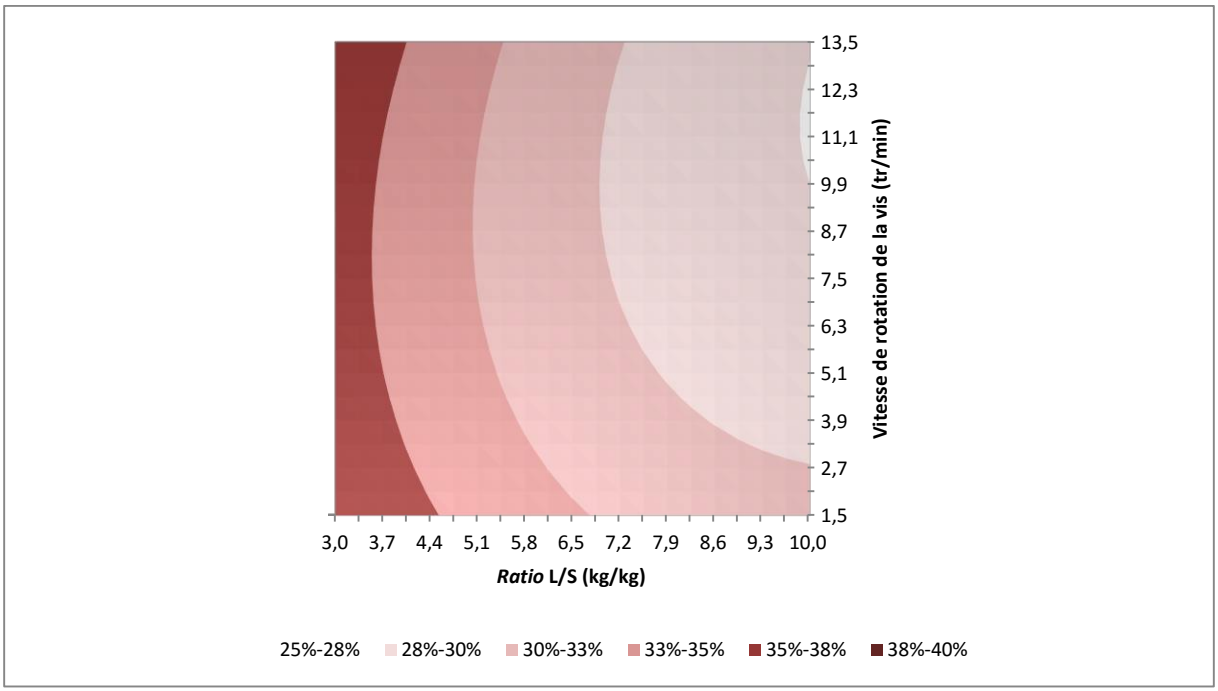


Figure IV-18 Evolution de la matière sèche des raffinats solides en fonction du débit de feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay introduites à débit d'eau constant (voisin de 48,4 kg/h) dans l'extracteur pilote VHSA

Cette tendance est aussi confirmée par l'analyse des surfaces de réponse des matières sèches des raffinats obtenus à partir du plan d'expérience (Figure IV-19), bien que le modèle obtenu soit à la limite de la signification (R^2 = 0,8696, Annexe 3). Remarquons qu'une diminution de la vitesse de rotation de la vis sans âme pour un *ratio* liquide-solide élevé (L/S ≥ 6), et donc un taux de remplissage en solide plus faible, tends à augmenter légèrement le pressage du mélange conduisant à des raffinats à plus de 30 % de matière sèche.



Courbes d'isoréponse en représentation 3D



Projection de courbes d'isoréponse dans le plan

Figure IV-19 Surface de réponse de la teneur en matière sèche du raffinat en fonction du *ratio* liquide-solide et de la vitesse de rotation de la vis sans âme

Ainsi, dès lors que le taux de remplissage en solide sera faible, voisin de celui obtenu pour un débit de feuille de 5 kg/h, et que le *ratio* liquide-solide supérieur à 6, l'efficacité du mélange solide-liquide dans l'extracteur sera préservé, même à faible vitesse de rotation de cette dernière, sans pénaliser outre mesure celle du pressage. Dans ces conditions opératoires, l'augmentation du *ratio* liquide-solide obtenue en augmentant le débit d'eau introduite dans l'extracteur, à faible débit de solide (Tableau IV-9), favorise bien l'extraction des glycosides de stéviol (Tableau IV-10 et Tableau IV-11) et augmente significativement les rendements en stévioside et rébaudioside A extraits dans le filtrat brut. Plusieurs remarques s'imposent au vu de ces résultats :

- les rendements en glycosides de stéviol sont supérieurs à ceux calculés à partir des modèles tirés du plan d'expériences mais ces modèles ne tiennent pas compte de l'impact du taux de remplissage en solide. Les essais E1 et E2, correspondent à une extrapolation des valeurs de *ratio* liquide-solide de 11 et 12,9 hors du domaine expérimental du plan d'expériences, à des valeurs faibles du débit de feuille. Quant à l'essai V1, mené à un *ratio* liquide-solide de 7,4, les rendements obtenus restent proches de ceux de la prévision tirée du plan d'expériences,

- une diminution du débit de feuilles (essai E1 : 4,13 kg/h) ne pénalise pas le pressage (matière sèche du raffinat de 31,7 %) malgré l'augmentation du débit d'eau introduite pour atteindre un *ratio* liquide-solide de 11,

- enfin, les rendements en glycosides de stéviol (66 % pour le stévioside et 62 % pour le rébaudioside A) pour un *ratio* liquide-solide proche de 13 sont équivalents à ceux obtenus dans l'extracteur pilote Reus, sous agitation avec un *ratio* liquide-solide de 18 au bout de 60 minutes à une température de 21°C. La séparation liquide-solide du filtrat, aussi efficace que l'essorage par filtration centrifuge (matière sèche des raffinats de 23 à 33 %) est obtenue en ligne de l'extraction solide-liquide, avec un entrainement de particules insolubles ou pied dans le filtrat brut de moins de 6 % de la matière sèche des feuilles introduites, nettement plus faible que ceux observés dans le cas de l'extracteur bi-vis (de l'ordre de 25 %).

Ces résultats nous ont conduit à étudier le temps de séjour du liquide et du solide dans notre extracteur-séparateur à vis sans âme pour mieux comprendre son fonctionnement et permettre une meilleure comparaison avec les autres types d'extracteur.

Tableau IV-9 Débits pour l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA pour les essais V1, E1 et E2

Essai	R (kg/kg)	V (tr/min)	Débit feuilles		Débit eau	Débit filtrat				Débit raffinat	
						Filtrat clair		Pied			
			Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)
V1	7,4	1,5	5,44	5,01	36,56	27,03	0,97	1,34	0,22	13,64	3,82
E1	11,0	1,5	4,13	3,80	41,30	35,96	0,99	1,11	0,16	8,36	2,65
E2	12,9	1,5	5,88	5,41	69,12	60,17	1,50	2,17	0,31	12,67	3,60

Tableau IV-10 Débits en glycosides de stéviol l'extraction des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote VHSA pour les essais V1, E1 et E2

Essai	Stévioside				Rébaudioside A			
	Débit feuilles (g/h)	Débit filtrat		Débit raffinat (g/h)	Débit feuilles (g/h)	Débit filtrat		Débit raffinat (g/h)
		Filtrat clair (g/h)	Pied (g/h)			Filtrat clair (g/h)	Pied (g/h)	
V1	274	131	7	136	116	52	3	61
E1	264	144	6	114	103	56	2	45
E2	341	224	7	110	143	88	4	51

Tableau IV-11 Rendements expérimentaux et théoriques en glycosides de stéviol dans le filtrat clair, et teneurs en matière sèche des raffinats obtenus lors des essais V1, E2 et E1

Essai	Rendement dans filtrat clair				Matière sèche du raffinat
	Expérimental		Modèle		
	Stévioside	Rébaudioside A	Stévioside	Rébaudioside A	
V1	48%	45%	43%	42%	28,0%
E1	54%	54%	41%	44%	31,7%
E2	66%	62%	33%	39%	28,4%

IV.2.2 Etude des temps de séjour du solide et du liquide dans l'extracteur pilote VHSA

IV.2.2.1 Protocole pour la détermination des distributions des temps de séjour

La détermination des distributions des temps de séjour (DTS) est effectuée par traçage de la phase solide par un colorant (érythrosine). Ce traceur a été choisi pour ses caractéristiques neutres envers le procédé d'extraction et parce qu'il permet une bonne coloration de la matière végétale comme nous pouvons le remarquer sur la Figure IV-20.



Figure IV-20 (A) Feuilles de Stévia compactées du Paraguay colorée avec de l'érythrosine (B) Feuilles de Stévia compactées du Paraguay

Les feuilles sont préalablement imprégnées d'érythrosine. Pour ce faire, 200 g de feuilles compactées du Paraguay ont été mises en contact avec 2 L d'une solution aqueuse d'érythrosine à 1 % (m/v) pendant 24 heures. Puis l'échantillon est séché à l'étuve à 50°C jusqu'à masse constante. En quelques secondes, une masse de 15 g de cet échantillon coloré est introduite à la main au niveau de l'entrée du solide de l'extracteur. L'introduction du traceur dans l'extracteur est considérée comme une impulsion Dirac. Elle est donc supposée ne pas perturber le régime permanent.

Pour la DTS du solide, à partir du temps initial, le raffinat solide en sortie de la zone de pressage est prélevé jusqu'à disparition de la coloration. Les échantillons sont ensuite pesés et séchés à l'étuve à 80°C jusqu'à masse constante. Ils sont ensuite broyés finement pendant 30 secondes pour analyse de leur coloration (Partie expérimentale IV.14).

La détermination des DTS pour la phase liquide est réalisée en même temps que pour la phase solide. A partir du temps initial, le filtrat du bas est prélevé toutes les minutes et le filtrat du haut est prélevé toutes les 45 secondes. Les échantillons sont ensuite stockés en chambre froide à 4°C avant leur analyse colorimétrique (Partie expérimentale IV.14)

IV.2.2.2 Analyse des courbes de distribution des temps de séjour

Les conditions opératoires pour l'étude de la distribution des temps de séjour dans l'extracteur pilote VHSA sont choisies, à partir des résultats précédents, pour être représentatives d'un fonctionnement du pilote comme extracteur solide-liquide avec un bon mélange (taux de remplissage en solide limité avec un débit de feuilles de 4,1 kg/h et *ratio* liquide-solide supérieur à 6), et comme presse avec une bonne efficacité de séparation liquide-solide (Tableau IV-12)

Tableau IV-12 Conditions opératoires d'extraction pour l'étude des distributions des temps de séjour des phases solide et liquide dans l'extracteur pilote VHSA

Facteur	Valeur
Température de l'eau	20°C
Inclinaison	5°
Recirculation	Non
Contrepoids	3,375 kg
Longueur de bouchon	11 cm
Débit de feuilles	4,1 kg/h
Débit d'eau	25,1 kg/h
***Ratio* liquide-solide**	6,7 kg/kg
Vitesse de rotation de la vis	1,5 tr/min

Les courbes des distributions des temps de séjour obtenues dans le filtrat en partie basse de l'auge en U, et dans le filtrat de pressage, ainsi que dans le raffinat solide sont rapportées dans la Figure IV-21.

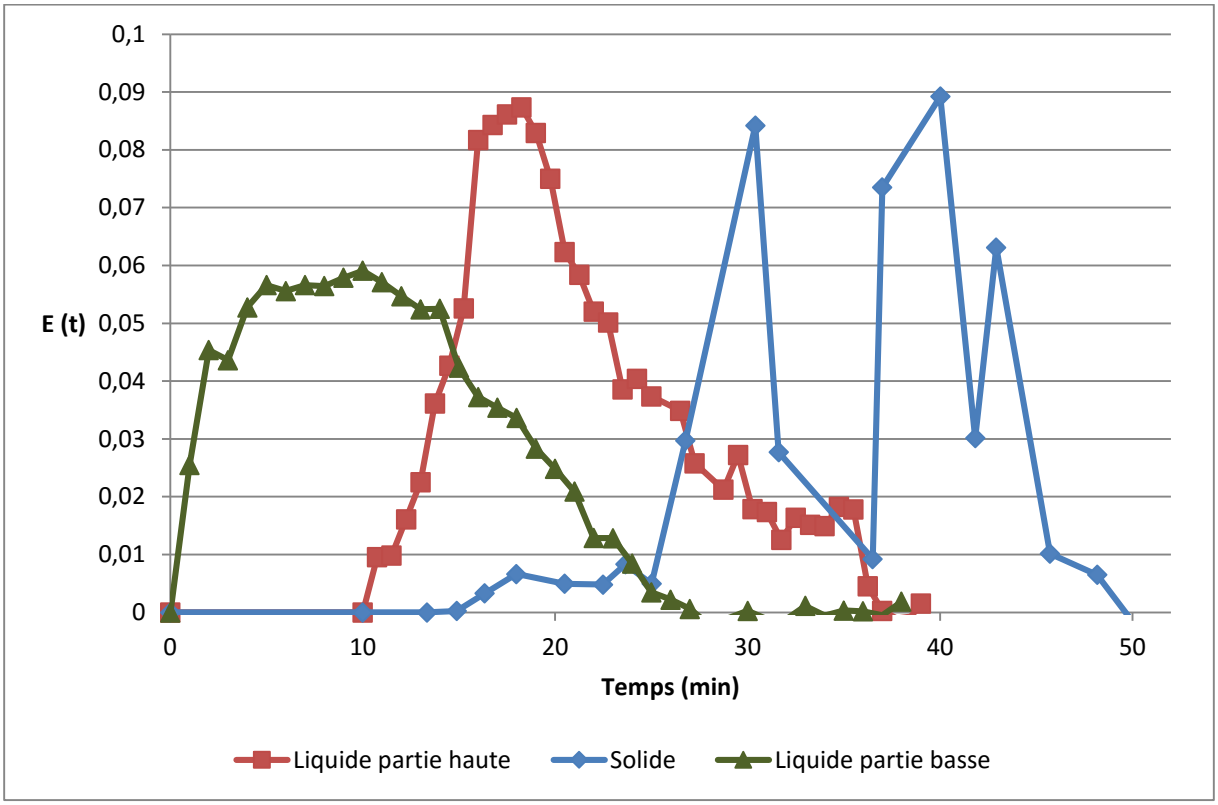


Figure IV-21 Distributions des temps de séjour, pour les phases solide et liquide lors de l'extraction solide-liquide en extracteur pilote VHSA (conditions opératoires, débit d'alimentation solide : 4,1 kg/h, vitesse de rotation de la vis sans âme : 1,7 tr/min, *ratio* liquide-solide : 6,7, température : 21°C, longueur de bouchon : 11 cm, contrepoids : 3,375 kg, inclinaison : 15°, recirculation : non)

Plusieurs points doivent être rappelés pour permettre l'interprétation de ces courbes :

- le solide est introduit sec dans la partie basse de l'extracteur : il s'imprègne de solvant au contact de l'eau, injectée en haut de l'auge en U, avant la zone de pressage, par l'intermédiaire des buses en position 5. Lorsque le *ratio* liquide-solide est suffisamment élevé pour que toute l'eau ne soit pas absorbée par les feuilles, ce qui est le cas pour un L/S ≥ 6, le solide arrivant au point d'injection de l'eau est théoriquement saturé et l'eau excédentaire s'écoule à contre-courant du solide vers le bas de l'auge. L'entrainement d'eau libre avec le solide imprégné vers la zone de pressage n'a pas été observé. Elle serait le signe d'un disfonctionnement de l'extracteur, tout comme la présence de feuilles non imprégnées dans le raffinat,

- le traceur coloré est introduit avec le solide, et il est extrait par l'eau. L'extraction est considérée comme instantanée, à rendement constant. Les courbes d'évolution de la coloration des phases liquides recueillies à la grille de la partie basse de l'auge en U et à

celle de la partie haute traduisent donc le temps de séjour du liquide au contact du solide coloré et dans la partie extracteur solide-liquide et dans la partie séparateur solide-liquide du pilote d'extraction ; et donc indirectement aussi le temps de séjour du solide coloré dans l'extracteur,

- le solide est récupéré sous forme de raffinat en sortie de la zone de pressage, par effondrement du bouchon sous l'effet de la gravité. La présence de feuilles colorées peut y être directement observée, mais leur répartition dans le bouchon à la sortie n'est pas homogène, ce qui indique qu'il n'y a pas de réabsorption significative du colorant extrait en phase liquide sur le solide et que ce dernier n'est pas totalement remélangé au cours de son transport et de son pressage. Par ailleurs, bien que la progression du bouchon de matière dans la zone de pressage sous l'effet de poussée exercée par la rotation de la vis sans âme soit parfaitement régulière, l'effondrement de ce bouchon en sortie ne l'est pas, ce qui explique l'allure de la courbe d'apparition du solide coloré. Cependant, elle permet d'apprécier le temps de séjour du solide dans la totalité de l'extracteur pilote VHSA.

Ainsi, l'apparition du traceur coloré dans le filtrat bas de l'extracteur dès les premières minutes de contact du solide et du liquide à l'entrée du solide dans la zone d'extraction confirme bien que la quantité d'eau injectée est suffisante pour permettre un écoulement d'eau libre, et que l'extraction du colorant dans la phase liquide est quasi instantanée. La détection du traceur coloré dans le filtrat d'extraction (liquide partie basse) se poursuit jusqu'à plus de 25 minutes avec une distribution relativement régulière et un temps moyen de 10,5 minutes. Dans les conditions opératoires mises en œuvre, le temps de séjour moyen du liquide au contact du solide dans la zone d'extraction constituée par le système vis sans âme-auge en U serait de 10,5 minutes.

L'apparition du traceur coloré dans le filtrat haut issu de la zone de pressage (liquide partie haute) au bout de 10 minutes confirme bien que le solide met au moins 10 minutes pour traverser la zone d'extraction, transporté par la vis sans âme à une vitesse de rotation de 1,5 tr/min. La courbe de coloration du filtrat se développe sur plus de 40 minutes, avec un maximum net autour de 17 minutes et une forme régulière jusqu'à 25 minutes. L'étalement de la coloration observée au-delà de cette durée pourrait être relié à un phénomène de remélange du colorant dans la zone de pressage et/ou au gradient de pression exercée sur le mélange solide-liquide dans le bouchon. Cependant, le temps de séjour moyen du solide dans la zone de pressage peut être estimé à 21 minutes.

La courbe traduisant l'apparition du solide coloré en sortie de la zone de pressage montre qu'il séjourne au moins 15 minutes et au maximum 50 minutes dans l'appareillage pilote avec les conditions opératoires choisies. Bien que la courbe d'évolution de la coloration soit irrégulière du fait du mode de prélèvement du raffinat, le calcul du temps moyen de séjour conduit à une valeur de 35,5 minutes, proche de la somme des temps de séjour moyen dans la partie extracteur et la partie presse du pilote.

En conclusion, l'analyse de la distribution des temps de séjour dans le nouveau pilote que nous avons mis en œuvre confirme le principe de fonctionnement que nous avions conçu : une extraction

solide-liquide à contre-courant du solvant avec le solide transporté par une vis sans âme, couplée à un pressage du mélange dans une presse à vis. Les résultats obtenus par sa mise en œuvre pour l'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay montrent que pour un *ratio* liquide-solide suffisamment élevé (L/S ≥ 6), à température ambiante, le mélange solide-liquide opéré par la vis sans âme est suffisamment efficace pour permettre l'extraction des glycosides de stéviol, et que le pressage en ligne des feuilles est opérant avec une matière sèche du raffinat élevée (≥ 25 %) et un entrainement de particules insolubles faible (de l'ordre de 5 %), ce qui répond d'ores et déjà à plusieurs critères définis pour le procédé. Les rendements d'extraction en stévioside et rébaudioside A obtenus pour un débit de feuilles, séchées et compactées de Stévia du Paraguay, proche de 5 kg/h et un *ratio* liquide-solide voisin de 13 sont du même ordre que ceux obtenus en extracteur pilote agité Reus (environ 64 % avec l'extracteur pilote VHSA et 68 % avec l'extracteur pilote Reus), à température ambiante (T = 21°C) et pour un *ratio* liquide-solide plus élevé (L/S = 18), mais pour des temps de contact dans l'extracteur pilote VHSA réduit d'un facteur 6 (10 minutes dans l'extracteur pilote VHSA et 60 minutes dans l'extracteur pilote Reus), l'ensemble de l'opération d'extraction et de séparation liquide-solide réalisée en continu nécessitant près de deux fois moins de temps pour traiter la même quantité de feuille (4,5 kg de feuilles séchées et compactées traitées en 35 minutes avec l'extracteur pilote VHSA et en plus de 1h15 avec l'extracteur pilote Reus et l'essoreuse centrifuge Rousselet). En dehors du *ratio* liquide-solide, plusieurs facteurs devraient nous permettre d'améliorer ces résultats.

IV.2.3 Adaptation du mode de fonctionnement de l'extracteur pilote VHSA

L'étude des cinétiques d'extraction des glycosides de stéviol à partir des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay menée en réacteur agité, à forte dilution du solide dans le liquide (L/S = 44) et à 25°C, des temps de contact solide-liquide de plus de 120 minutes pour atteindre l'équilibre d'extraction (Figure II-24 et Figure II-25, Chapitre II, Partie II.2.2). Dans l'extracteur pilote VHSA tel que mis en œuvre jusqu'à présent, une partie de l'eau injectée en haut de l'extracteur est absorbée par le solide, à proportion d'environ 3 kg d'eau / kg de matière sèche de feuilles. Ce qui pour un *ratio* liquide-solide de 6 ne laisserait qu'environ 3 kg d'eau libre, extérieure au solide par kg de feuilles saturées en eau, disponible pour les échanges de matière et l'extraction hors du solide des solutés. Or cette étape de diffusion intraparticulaire est l'étape limitante du processus d'extraction (Chapitre II, Partie II.2) et des temps de contact solide-liquide de l'ordre de 10 minutes dans l'extracteur pilote VHSA ne seront pas favorables au rendement d'extraction. Pour pallier cet inconvénient, une modification du pilote permettant la recirculation des extraits à contre-courant du solide a été réalisée :

- les extraits provenant de la partie basse et de la partie haute de l'extracteur sont dirigés vers un bac tampon et repris par une pompe de recirculation pour être réinjecté par les buses n°1 (Figure IV-22),

- en régime stationnaire, le filtrat brut est récupéré par débordement du bac tampon.

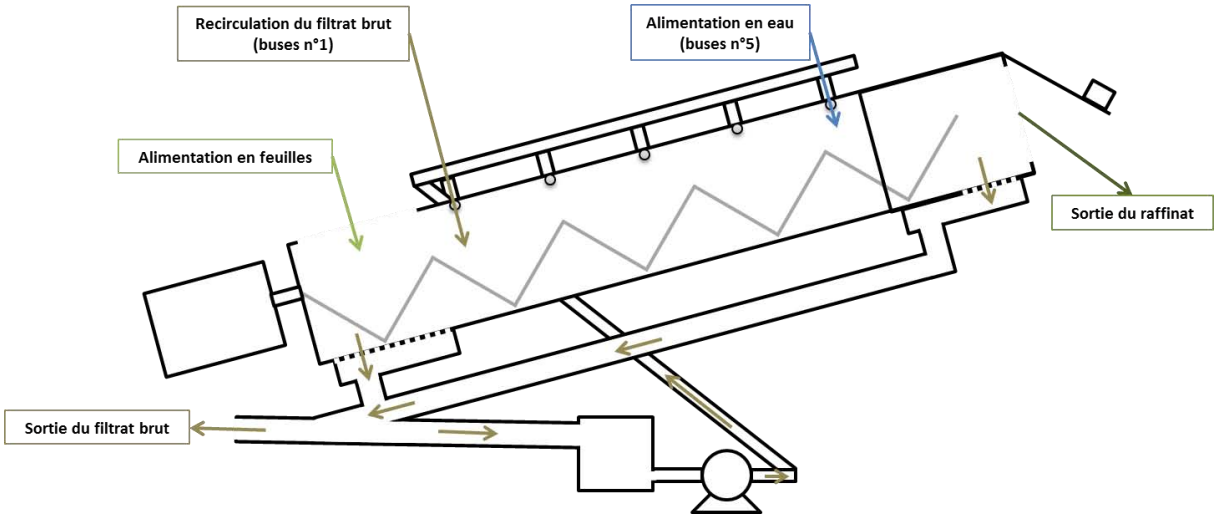


Figure IV-22 Schéma descriptif de l'extracteur pilote VHSA avec recirculation du filtrat brut

IV.2.3.1 Description du fonctionnement de l'extracteur pilote VHSA avec la recirculation des extraits

Pour mieux comprendre le fonctionnement du pilote dans cette nouvelle configuration (Figure IV-23), des prélèvements de matière à l'introduction des feuilles, le long de leur trajet dans l'auge en U et en sortie de pressage sont réalisés (Figure IV-24). L'observation directe du mélange (Figure IV-25) pour des conditions opératoires proches de celles mises en œuvre précédemment, en l'absence de recyclage (*ratio* liquide-solide de 6, vitesse de rotation de la vis de 1,5 tr/min pour un débit de feuilles de 6,2 kg/h) montre que :

- en partie basse de l'appareil, le niveau de liquide est relativement haut, à mi-hauteur de l'auge, dans la zone d'injection du filtrat recyclé, et le solide y est partiellement immergé,

- le niveau d'extrait diminue ensuite jusqu'à la zone du prélèvement 4 (en face des buses n°4 fermées), puis il réaugmente jusqu'à la zone du prélèvement 6 où l'eau est injectée par l'intermédiaire des buses n°5,

- le solide est, quant à lui, plus tassé en partie basse de l'extracteur sous l'effet du contre-courant liquide, mais se maintient à mi-hauteur de la vis sans âme.

Les teneurs en matière sèche et en glycosides de stéviol des différents prélèvements de matière solide sont déterminées.

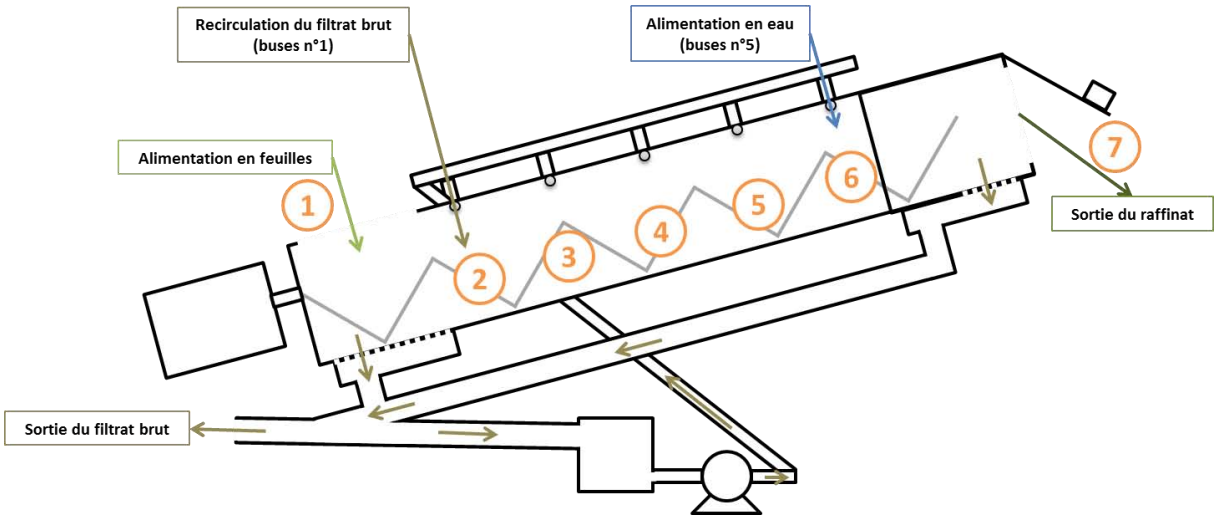


Figure IV-23 Schéma descriptif de l'extracteur pilote VHSA avec recirculation du filtrat brut, les sphères numérotées orange représentent les différents points de prélèvement



Figure IV-24 Photographie de l'extracteur pilote VHSA et de la vis d'alimentation en feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay pendant l'essai de description du fonctionnement du pilote, les sphères numérotées orange représentent les différents points de prélèvements



Figure IV-25 Photographies des différents points de prélèvement lors de l'essai de description du fonctionnement du pilote dans l'extracteur pilote VHSA

La Figure IV-26 rassemble les teneurs en matière sèche des prélèvements de matière végétale. Le premier prélèvement est représentatif de la teneur en matière sèche initiale des feuilles, 92%. La teneur en matière sèche de la matière végétale chute ensuite à environ 23% pour le prélèvement n°2 car les feuilles sont dans la zone de recirculation du filtrat brut, où le *ratio* liquide-solide est élevé, elles baignent dans le liquide et s'imbibent très rapidement. Pour le prélèvement 3 la teneur en matière sèche augmente légèrement car une partie du liquide absorbé par les feuilles est relargué par gravité et le niveau de liquide dans l'auge en U est moins élevé. La teneur en matière sèche diminue de nouveau de façon progressive du prélèvement 4 au prélèvement 6 à cause de l'alimentation en eau par les buses n°5. Ces évolutions sont en accord avec nos descriptions visuelles précédentes des niveaux de liquide et de solide dans l'extracteur. Enfin la teneur en matière sèche de la matière végétale augmente au prélèvement 7 car les feuilles ont été pressées. Ainsi d'après ces résultats l'extracteur pourrait être divisé en plusieurs zones décrivant la nature des échanges solide-liquide (Figure IV-27).

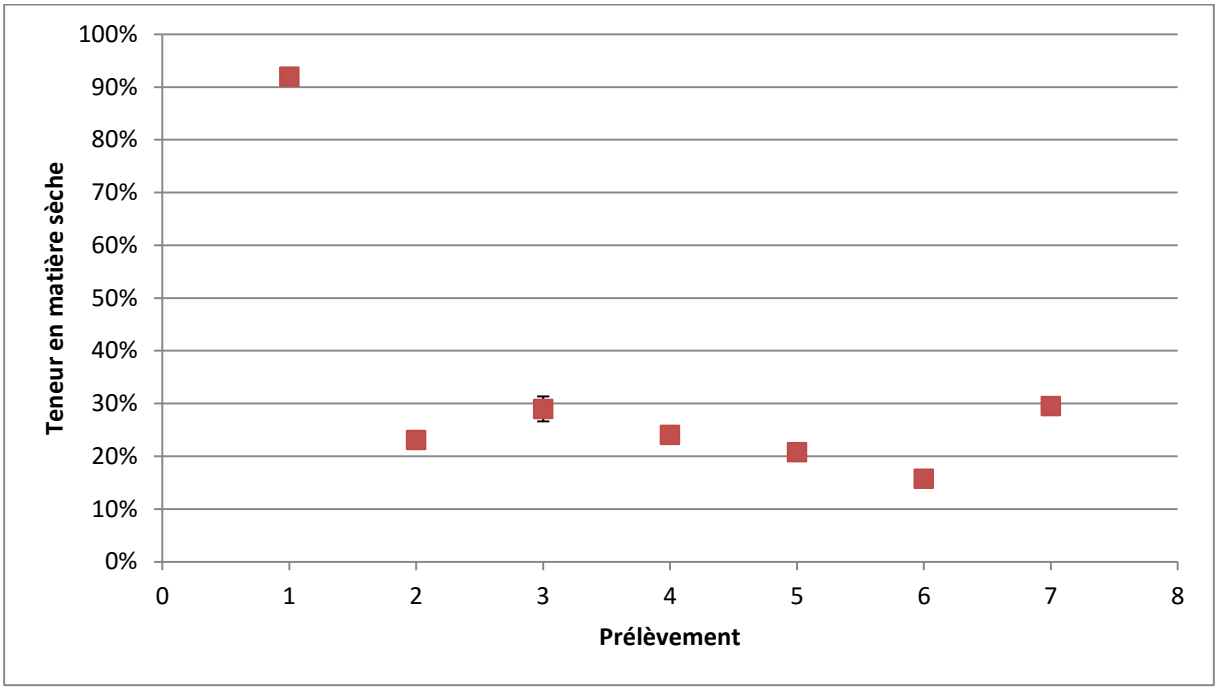


Figure IV-26 Teneurs en matière sèche des prélèvements de matière végétale effectués lors de l'essai de description du fonctionnement du pilote en extracteur pilote VHSA

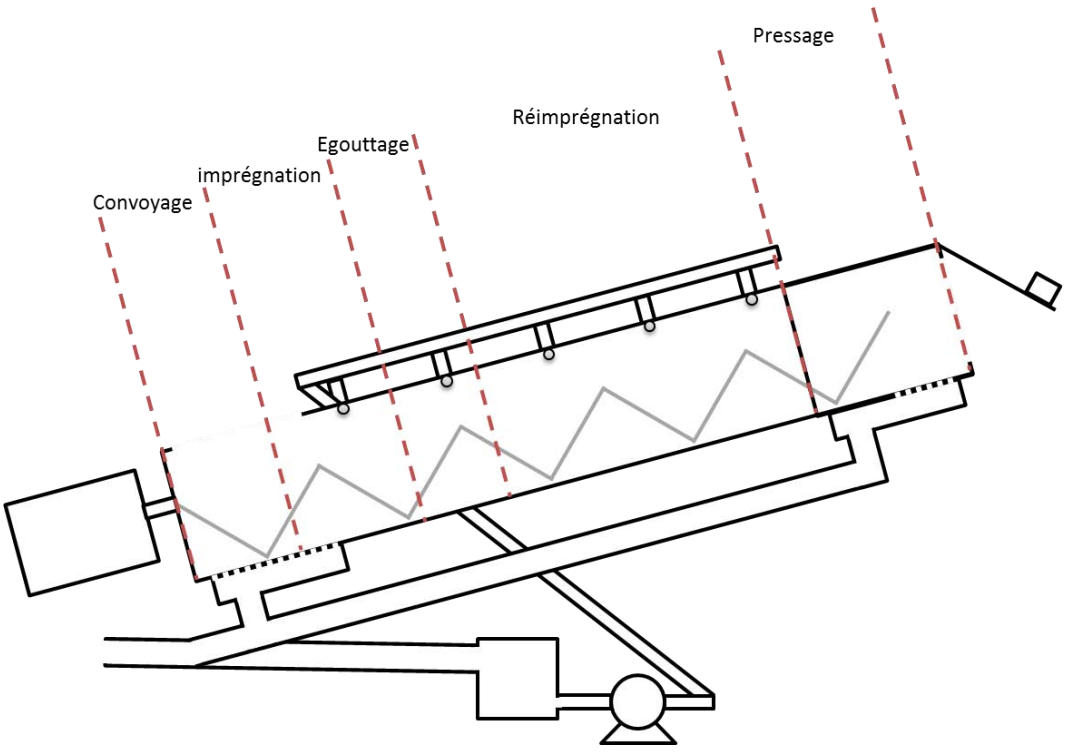


Figure IV-27 Première représentation schématique du fonctionnement de l'extracteur pilote VHSA

La Figure IV-28 rassemble les teneurs en glycosides de stéviol des prélèvements de matière végétale. La teneur en édulcorant du prélèvement 1 représente le potentiel de stévioside et de rébaudioside A par rapport à la matière sèche des feuilles de Stévia. La teneur en glycosides de stéviol dans le prélèvement 2 est supérieure à ce potentiel. Cette augmentation est due à un enrichissement du solide lié à la recirculation du filtrat brut déjà concentré en glycosides de stéviol : lors de l'imprégnation, les feuilles se chargent en édulcorants. Ensuite la teneur en glycosides de stéviol diminue au prélèvement 3 car il y a extraction liquide-solide. En effet, dans les feuilles, les concentrations en glycosides de stéviol sont plus élevées qu'à l'extérieur et les solutés diffusent vers l'extrait. Les teneurs en glycosides de stéviol des prélèvements 4 et 5 sont sensiblement les mêmes et indiquent qu'un équilibre est atteint entre le liquide et le solide : les concentrations en solutés dans le solide et dans le liquide doivent être équivalentes. Pour le prélèvement 6, les teneurs en glycosides de stéviol diminuent car de l'eau fraîche est apportée ; elle dilue donc la phase liquide et déplace l'équilibre d'extraction. Enfin les teneurs diminuent encore pour le prélèvement 7 car la matière végétale est pressée et perd donc de l'extrait chargé en édulcorants. Ainsi le schéma de fonctionnement du pilote avec recirculation des extraits peut être décrit en 5 zones (Figure IV-29).

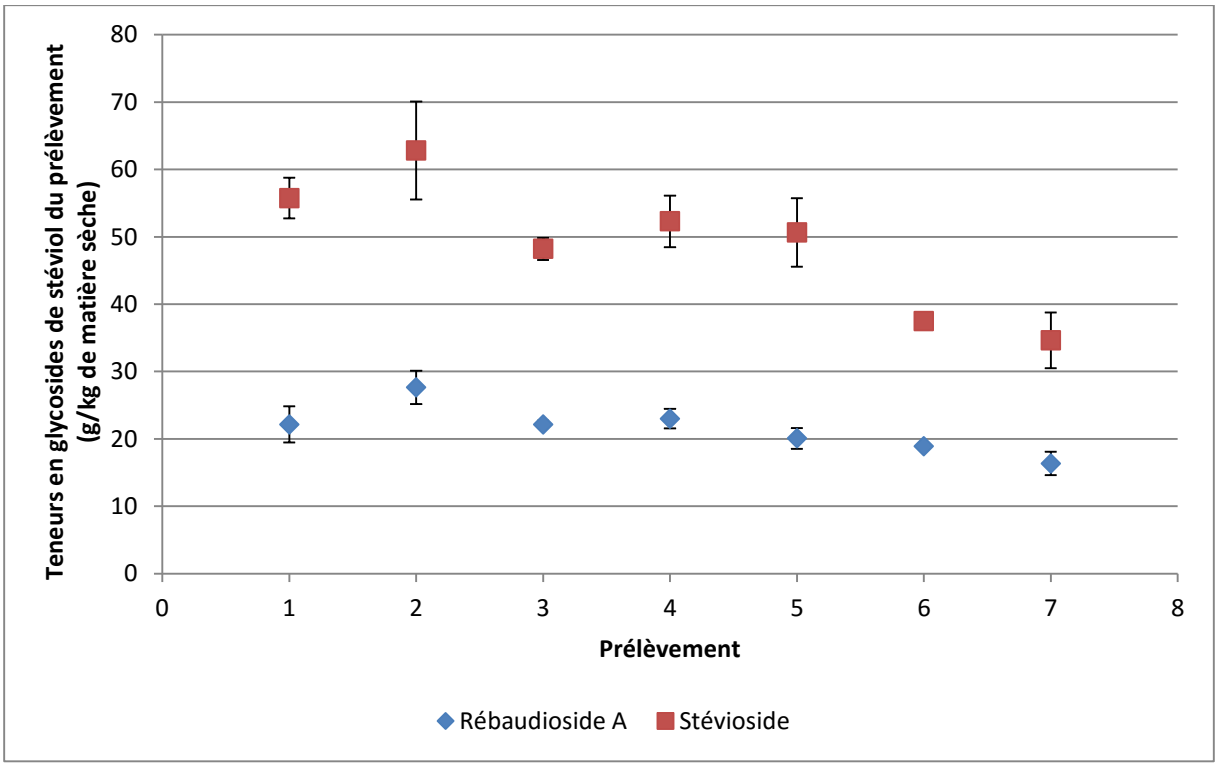


Figure IV-28 Teneurs en glycosides de stéviol des prélèvements de matières végétale effectués lors de l'essai de description du fonctionnement du pilote en extracteur pilote VHSA

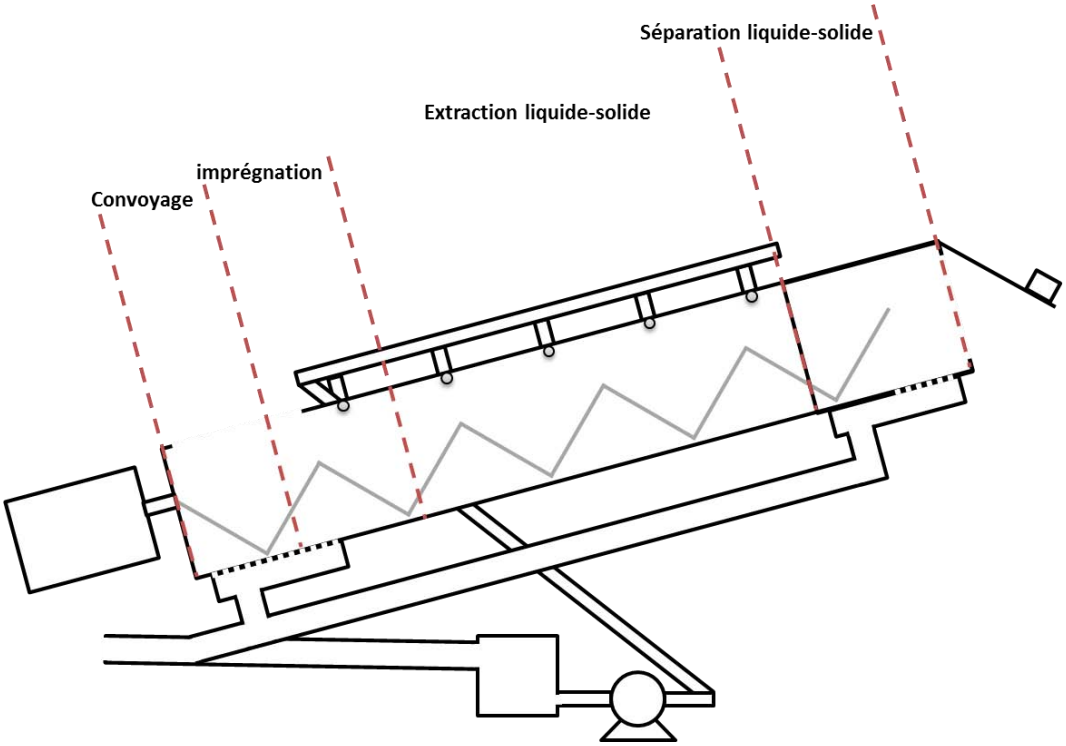


Figure IV-29 Seconde représentation schématique de fonctionnement de l'extracteur pilote VHSA

Ainsi, la recirculation des filtrats en partie basse du pilote apportera une étape supplémentaire : l'imprégnation efficace des feuilles séchées et compactées de Stévia à l'entrée de l'extracteur, qui devrait favoriser l'extraction des glycosides de stéviol par l'eau introduite à contre-courant du solide imprégné et transporté par la vis sans âme.

IV.3 Influence de la recirculation du filtrat brut sur les rendements d'extraction en glycosides de stéviol

Les conditions opératoires des essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA avec la nouvelle configuration de recyclage des filtrats sont rassemblées dans le Tableau IV-13 et le Tableau IV-14.

Tableau IV-13 Conditions opératoires d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA dans la configuration avec recyclage des filtrats bruts

Facteur	Valeur						
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
Température de l'eau (°C)	20						
Recirculation	Oui						
Contrepoids (kg)	3,375						
Longueur de bouchon (cm)	11						
Inclinaison	5°						20°
Débit de feuilles (kg/h)	11,3	13,1	15,7	19,7	6,2	5,1	5,4
Débit d'eau (kg/h)	49,6	76,9	92,7	92,5	33,8	31,6	33,7
***Ratio* liquide-solide (kg/kg)**	4,8	6,5	6,5	5,2	6,0	6,8	6,9
Vitesse de rotation de la vis (tr/min)	4,5	7,5	9,9	12,0	1,5	1,5	1,5

Les résultats obtenus (Tableau IV-15 et Tableau IV-16) montrent que le recyclage des filtrats ne perturbe pas l'extraction des glycosides de stéviol dans la gamme des concentrations atteinte à l'équilibre de fonctionnement de l'extracteur (4 à 8 g de glycosides de stéviol par kg de filtrat brut). Ce qui est conforme aux résultats obtenus lors des essais de recyclage des extraits en extracteur agité à l'échelle laboratoire (Chapitre II, Partie II.4.2). En effet, les rendements en stévioside et en rébaudioside A atteints pour des *ratios* liquide-solide compris entre 4,8 et 6,9 et des vitesses de rotation de la vis sans âme croissante de 1,5 à 12 tr/min sont proches de ceux obtenus sans recirculation des filtrats dans les conditions opératoires équivalentes pour le plan d'expériences (Figure IV-15 et Figure IV-16, Partie IV.2.1).

Comme l'absence de recyclage des filtrats bruts, l'augmentation du débit de feuilles tend à diminuer les rendements en glycosides de stéviol extraits (essais R1 à R4), et c'est aux faibles débits de feuilles, pour des vitesses de rotation de la vis minimales, à L/S = 6 que l'extracteur reste le plus efficace (essai R5). L'apport du recyclage des extraits peut alors être mesuré par le fait que pour atteindre des rendements identiques, proches de 50 %, l'augmentation du *ratio* liquide-solide nécessaire est plus faible avec recyclage des extraits (essai R6 : L/S = 6,8, pour 48 et 46 % de rendement en stévioside et rébaudioside A) qu'en son absence (essai V1 : L/S = 7,4, pour 48 et 45 % de rendement).

L'influence de plusieurs autres facteurs susceptibles d'agir sur le temps de séjour du liquide et du solide dans l'extracteur comme l'inclinaison de l'auge qui améliore légèrement les rendements d'extraction (essai R7 20° d'inclinaison, 51 % de glycosides de stéviol extraits), sur le temps de séjour dans la zone de pressage comme le contrepoids appliqué au clapet de sortie ou la longueur du bouchon sur la grille de filtration, ou encore sur la diffusion intraparticulaire comme la température qui agit sur la diffusivité des glycosides de stéviol, doit encore être étudiée. Cependant les résultats d'ores et déjà acquis permettent d'établir la faisabilité de la mise en œuvre du nouveau procédé d'extraction aqueuse, en continu, des feuilles séchées et compactées de Stévia dans l'extracteur pilote VHSA, et de le comparer aux extractions réalisées en contacteur agité ou en extracteur bi-vis.

Tableau IV-14 Débits entrée et sortie obtenus pour les essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA dans la configuration avec recyclage des filtrats bruts

Essai	R (kg/kg)	V (tr/min)	Débit feuilles (kg/h)		Débit eau (kg/h)	Débit filtrat (kg/h)				Débit raffinat (kg/h)	
						Filtrat clair		Pied			
			Brut	Sec	Brut)	Brut	Sec	Brut	Sec	Brut	Sec
R1	4,8	4,5	11,33	10,43	49,57	33,76	1,38	1,04	0,19	26,10	8,85
R2	6,5	7,5	13,08	12,04	76,92	56,61	2,02	2,19	0,38	31,20	9,64
R3	6,5	9,9	15,70	14,45	92,70	65,60	1,44	2,11	0,27	40,70	12,74
R4	5,2	12,0	19,66	18,06	92,47	61,45	1,80	2,68	0,42	48,00	15,87
R5	6,0	1,5	6,15	5,66	33,75	25,01	1,10	0,49	0,08	14,40	4,48
R6	6,8	1,5	5,11	4,70	31,58	25,30	0,95	0,54	0,11	10,85	3,63
R7	6,9	1,7	5,41	4,98	33,72	26,83	1,21	0,56	0,10	11,74	3,67

Tableau IV-15 Débits en glycosides de stéviol obtenus pour les essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA dans la configuration avec recyclage des filtrats bruts

Essai	Débit de stévioside (g/h)				Débit de rébaudioside A			
	Feuilles	Filtrat brut		Raffinat	Feuilles	Filtrat brut		Raffinat
		Filtrat clair	Pied)			Filtrat clair	Pied)	
R1	614,2	173,6	6,5	434,1	225,3	66,8	2,4	156,1
R2	664,8	245,4	11,9	407,5	270,3	93,2	4,4	172,7
R3	953,1	198,1	7,5	747,4	398,9	75,5	2,8	320,6
R4	875,8	208,2	11,6	656,0	353,1	79,5	4,4	269,2
R5	340,2	141,2	3,1	195,9	131,6	55,83	1,2	74,7
R6	275,0	131,2	4,0	139,8	111,6	51,0	1,5	59,1
R7	275,1	136,3	3,5	132,3	108,6	55,1	1,3	52,1

Tableau IV-16 Rendements en glycosides de stéviol dans le filtrat clair et teneur en matière sèche du raffinat obtenus pour les essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA dans la configuration avec recyclage des filtrats bruts

Essai	Rendement dans filtrat clair		Matière sèche du raffinat
	Stévioside	Rébaudioside A	
R1	28%	30%	33,9%
R2	37%	34%	30,9%
R3	21%	19%	31,3%
R4	24%	23%	33,1%
R5	41%	42%	31,1%
R6	48%	46%	33,5%
R7	51%	51%	31,2%

IV.4 Comparaison de l'extraction aqueuse des feuilles séchées de Stévia du Paraguay en extracteur pilote agité, bi-vis et VHSA

La comparaison de l'extracteur pilote VHSA avec l'extracteur bi-vis d'une part et l'extracteur agité d'autre part est effectuée à partir des résultats obtenus dans des conditions opératoires comparables (Tableau IV-17), pour lesquelles des résultats satisfaisants ont été obtenus :

- avec un *ratio* liquide-solide limité à 6, à 60°C et en présence d'un contrepoids pour maintenir un effet de pressage élevé, pour la comparaison avec l'extracteur bi-vis,
- avec un *ratio* liquide-solide élevé (L/S = 10,6), à 60°C, en l'absence de contrepoids mais pour une longueur de bouchon plus élevée, pour se rapprocher des conditions de mise en œuvre en extracteur agité et séparation par filtration centrifuge.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau IV-18 et dans le Tableau IV-19.

Tableau IV-17 Conditions opératoires d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA pour la comparaison avec les extracteurs pilotes agité et bi-vis

Facteur	Valeur	
	AT1	**AT2**
Température de l'eau (°C)	60	60
Inclinaison	5°	5°
Recirculation	Oui	Oui
Contrepoids (kg)	3,375	0
Longueur de bouchon (cm)	11	15
Débit de feuilles (kg/h)	5,0	4,5
Débit d'eau (kg/h)	27,1	43,8
***Ratio* liquide-solide (kg/kg)**	6,0	10,6
Vitesse de rotation de la vis (tr/min)	1,5	1,5

Avec un *ratio* liquide-solide limité à 6, les rendements en stévioside et en rébaudioside A sont de 51 et 50 %, avec une production de 155 g de glycosides de stéviol par heure pour un débit de de feuilles séchées et compactées de 5,0 kg/h, soit une productivité de 34 g/kg de matière sèche de feuilles et une concentration dans le filtrat clair de 7,7 g/kg pour une matière sèche du raffinat de 31 % (Tableau IV-20). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour des conditions similaires (T = 60°C, débit de 5,4 kg/h de feuilles séchées et broyées, avec une grille de 1 mm, et L/S = 4,2, essai BV11, Chapitre III, Partie III.3.5.3) dans l'extracteur bi-vis, avec un rendement en glycosides de stéviol de 56 et 57 %, une productivité de 50 g/kg de matière sèche de feuilles à 17,1 g/kg de filtrat clair. Si la matière sèche du raffinat est plus élevée en sortie de l'extracteur bi-vis (42 % MS), le filtrat brut obtenu contient nettement plus de particules insolubles entrainées (27 % de la matière sèche des feuilles) que dans le

cas de l'extracteur pilote VHSA (moins de 2 %), ce qui facilitera d'autant plus l'opération de clarification des extraits bruts. Ainsi, bien qu'il n'offre pas exactement les mêmes perspectives de valorisation du raffinat solide, l'extracteur à vis sans âme apparait tout aussi efficace que l'extracteur bi-vis pour l'extraction aqueuse des feuilles de Stévia à faible *ratio* liquide-solide.

Avec un *ratio* liquide-solide plus élevé (L/S = 10,6), les rendements en stévioside et rébaudioside A sont de 77 et 78 %, ce qui confirme que dans la zone d'extraction solide-liquide, avec recyclage des extraits, les temps de contact du liquide et du solide sont largement suffisants pour obtenir une extraction des glycosides de stéviol aussi efficace qu'en extracteur agité dans des conditions équivalentes (80 % pour 15 kg de feuilles séchées et compactées traitées en 2 h 25 min (extraction = 40 min et séparation = 105 min (7 batchs de 25 kg de milieu traité (extrait + raffinat) en 15 minutes) soit 6,2 kg/h de feuilles traitées) à 60°C avec un L/S de 10,4. La productivité de 69 g/kg de matière sèche de feuilles, soit 290 g de glycosides de stéviol pour un débit de 4,5 kg/h de feuilles, est proche de celle obtenue dans l'extracteur agité (73 g/kg de matière sèche soit 309 g de glycosides de stéviol pour 4,5 kg de feuilles traitées en 1 h), pour une même quantité de feuilles en une heure, la concentration en glycosides de stéviol dans le filtrat clarifié est alors de 7,8 g/kg, pour une matière sèche du raffinat proche de 25 % et moins de 3 % de pied sec.

Ainsi, l'extracteur pilote VHSA apparait aussi performant que l'extracteur agité, dès lors que le *ratio* liquide-solide est suffisamment élevé. Cependant le fonctionnement continu, sans séquence de chargement-déchargement du contacteur, et la compacité de l'appareillage couplant l'extraction et la séparation solide-liquide grâce au système à vis sans âme constituent des avantages certains pour le transfert du procédé à plus grande échelle. D'ores et déjà, le pilote tel que configuré, d'un volume intérieur de 61 m^3, permettrait de produire près de 7 kg de glycosides de stéviol par jour, à partir de 120 kg de feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay, sous forme d'un extrait (34 kg de matière sèche extraite dont 20% de glycosides de stéviol). Pour atteindre une telle production, le volume de l'extracteur agité serait de 60 L associé à un filtre centrifuge séparé.

Tableau IV-18 Débits entrée et sortie obtenus pour les essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA pour la comparaison avec les extracteurs pilotes agité et bi-vis

Exp	R (kg/kg)	V (tr/min)	Débit feuilles		Débit eau	Débit filtrat				Débit raffinat	
						Filtrat clair		Pied			
			Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)	Brut (kg/h)	Sec (kg/h)
AT1	6,0	1,7	4,99	4,59	27,12	20,14	0,91	0,45	0,08	11,51	3,60
AT2	10,6	1,7	4,54	4,17	43,80	36,90	1,42	0,57	0,11	10,87	2,65

Tableau IV-19 Débits en glycosides de stéviol obtenus pour les essais d'extraction aqueuse des feuilles séchées et compactées de Stévia du Paraguay dans l'extracteur pilote VHSA pour la comparaison avec les extracteurs pilotes agité et bi-vis

Exp	Stévioside				Rébaudioside A			
	Débit feuilles (g/h)	Débit filtrat		Débit raffinat (g/h)	Débit feuilles (g/h)	Débit filtrat		Débit raffinat (g/h)
		Filtrat clair (g/h)	Pied (g/h)			Filtrat clair (g/h)	Pied (g/h)	
AT1	217,3	111,2	2,9	103,1	87,5	44,1	1,1	42,3
AT2	268,3	207,5	3,6	57,2	105,9	82,1	1,4	22,5

Tableau IV-20 Rendements en glycosides de stéviol dans le filtrat clair et teneur en matière sèche du raffinat obtenus pour les expériences de l'influence de l'augmentation de la température de l'eau dans l'extracteur Elhyss

Expérience	Rendement dans filtrat clair		Matière sèche du raffinat
	Stévioside	Rébaudioside A	
AT1	51%	50%	31,2%
AT2	77%	78%	24,4%

Conclusion générale

Les glycosides de stéviol extraits des feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni sont des édulcorants d'origine naturelle, acaloriques à fort pouvoir sucrant et réputés inoffensifs pour la santé humaine, sont considérés par l'industrie agroalimentaire comme une solution alternative prometteuse à l'aspartame. Depuis leur autorisation sur le marché européen en fin d'année 2011, de nombreux projets de recherche et de développement ont vu le jour sur le vieux continent afin d'adapter et d'optimiser la culture de la plante sur le sol européen, de mettre en œuvre et d'optimiser l'extraction et la purification des glycosides de stéviol, ou encore d'intégrer ces édulcorants dans différentes formulations. C'est dans ce contexte que le projet STEVIANOV a éclos, dont le but est de développer une filière française tracée de *Stevia rebaudiana* Bertoni, depuis la culture de la plante jusqu'à l'extrait purifié.

L'objectif de notre étude était de comprendre et de décrire le phénomène d'extraction solide-liquide des glycosides de stéviol, à l'eau, à partir des feuilles de Stévia, ainsi que d'identifier et lever les verrous au développement et à l'optimisation d'un procédé d'extraction innovant, en continu, à l'échelle pilote.

Dans un premier temps nous avons mené notre étude à l'échelle laboratoire. Les extractions aqueuses des feuilles de Stévia ont été réalisées dans un contacteur agité de 1 L. Nous avons pu mettre en évidence plusieurs points clés :

- même dans des conditions de forte dilution (L/S = 70), sous agitation magnétique et à température ambiante (T = 25°C), l'extraction aqueuse des glycosides de stéviol à partir des feuilles fraîches n'a pas eu lieu. Ainsi les feuilles fraîches de Stévia doivent d'être déstructurées pour permettre la pénétration du solvant et la libération des solutés dans le milieu d'extraction. Parmi les nombreuses possibilités permettant cette déstructuration le séchage de la matière végétale est le plus intéressant, car en plus de faciliter l'extraction des solutés, il permet de conserver la matière première ainsi que de faciliter son conditionnement, son stockage et son transport.

- L'étude et la modélisation, selon la seconde loi de Fick, des cinétiques d'extraction aqueuses des glycosides de stéviol à partir des feuilles séchées de Stévia dans des conditions de dilution élevée (L/S = 44) a montré que la diffusion des solutés dans la matrice végétale est le principal facteur limitant de l'extraction, sans contribution significative d'une réaction chimique car les solutés sont présents sous forme libre dans la vacuole des cellules des feuilles de Stévia, ni de gonflement de la matière ou de modification de sa porosité pendant le processus d'extraction. L'élévation de la température d'extraction, qui augmente les coefficients de diffusion effectifs du stévioside (2,20 ± 0,15 et 6,2 ± 0,4 10^{-12} m²/s respectivement à 25 et 60°C) et du rébaudioside A (1,80 ± 0,15 et 5,0 ± 0,4 10^{-12} m²/s respectivement à 25 et 60°C), du *ratio*

liquide-solide qui dilue le milieu d'extraction et de l'efficacité du mélange par agitation favorisent l'extraction des glycosides de stéviol.

- Le rébaudioside A est extrait plus lentement que le stévioside (coefficient de diffusion effectif du rébaudioside A inférieur à celui du stévioside à 25 et 60°C) car d'après leur modélisation moléculaire dans l'eau à 25°C, la conformation moléculaire du rébaudioside A est plus volumineuse (767 $Å^3$) que celle du stévioside (639 $Å^3$).

- Le broyage des feuilles séchées de Stévia, avec une grille de refus de 1 mm, (80 % des particules de taille comprise entre 800 et 200 μm) permet d'améliorer considérablement l'extraction des édulcorants, que ce soient en termes de rapidité ou d'efficacité, par rapport aux feuilles séchées et entières. Cependant un simple compactage des feuilles séchées et entières, permettant leur conditionnement pour le transport, conduit à un broyage partiel des feuilles (40 % des particules de taille comprise entre 4 et 1,25 mm) et est suffisant pour apporter une amélioration significative de l'extraction.

- D'après l'étude de l'épuisement des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia, par extraction étagée à 60°C, sous agitation, avec un *ratio* liquide-solide élevé (L/S = 44) et une durée d'extraction de 60 minutes, 86 % des glycosides de stéviol sont récupérés au premier étage d'extraction dans le filtrat de séparation solide-liquide sur toile en nylon de porosité 100 μm. Les deux étages suivants ne sont que des étapes de lavage et permettent d'épuiser totalement la matière végétale. Ainsi l'étape de séparation solide-liquide et le *ratio* liquide-solide ont un impact très important sur les rendements de récupération en glycosides de stéviol dans l'extrait après extraction et séparation solide-liquide, le liquide contenu dans les feuilles ayant la même concentration en solutés que le solvant « libre » autour de la matière végétale. Dans ces conditions, l'extraction des édulcorants est très efficace et le potentiel plante des feuilles séchées provenant du Paraguay est de 5,74 ± 0,02 g / 100 g de matière sèche de feuilles pour le stévioside et 3,00± 0,03 g / 100 g de matière sèche de feuilles pour le rébaudioside A.

- Lors de l'extraction étagée des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia par recyclage de l'extrait, nous avons pu montrer que, dans les conditions d'extraction choisies (T = 60°C, *ratio* extrait/feuilles = 10, agitation magnétique = 600 tr/min, durée = 60 min), le pouvoir d'extraction de l'extrait n'est pas affecté par sa concentration en solutés au bout de 10 extraction.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la mise en œuvre de l'extraction à l'échelle pilote. Les résultats ont permis de confirmer les cinétiques d'extraction aqueuse des glycosides de stéviol

obtenues à l'échelle laboratoire et d'orienter les choix techniques et technologiques pour le transfert d'échelle de leur production.

Dans un extracteur pilote de type contacteur agité Reus, la macération des feuilles séchées et compactées de Stévia, à température ambiante (T = 21°C) et dilution élevée (L/S = 17) reste lente et limitée. L'agitation du mélange par une pale raclante permet d'accélérer l'extraction et les rendements d'extraction en glycosides de stéviol au bout de 60 minutes de temps de contact, après séparation solide-liquide s'élèvent à 67 %. Dans ces conditions d'extraction la mise en œuvre d'une assistance par application séquentielle d'ultrasons de 15 minutes espacées de 5 minutes (P = 1600 W, fréquence = 23 kHz) n'a pas eu d'effet significatif sur l'extraction.

Dans un extracteur pilote de type contacteur agité, équipé d'une pâle d'agitation adaptée pour obtenir une imprégnation rapide du solide et un mélange solide-liquide efficace, classiquement proposé par l'équipementier Tournaire pour l'extraction et l'hydrodistillation de plantes aromatiques, les résultats obtenus à partir de feuilles séchées et compactées ou broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia, au bout de 40 minutes de temps de contact à 60°C, pour un *ratio* liquide-solide limité à 10 et une vitesse de rotation de l'agitateur de 15 tr/min. Le rendement d'extraction des glycosides de stéviol est sensible au taux de remplissage du contacteur, mais près de 80 % de stévioside et de rébaudioside A sont extraits au bout de 40 minutes à partir de 15 kg de feuilles séchées et compactées avec 140 kg d'eau, pour une valeur utile de l'extracteur agité estimée à 180 L. La séparation solide-liquide du mélange par filtration centrifuge dans une essoreuse de type Rousselet équipée d'une poche filtrante en polypropylène de porosité 1-10 μm permet alors d'obtenir un raffinat solide à 30 % de matière sèche et un filtrat clair en 15 minutes, sous forme d'extrait contenant 3,6 % de matière sèche, correspondant à 34 % de matière sèche des feuilles extraites, avec 5,7 g/L de stévioside et 2,2 g/L de rébaudioside A dans 130 kg de filtrat clair. Une première projection de dimensionnement pour une capacité de traitement de 400 T/an de feuilles séchées et compactées (pour le stockage et le transport) de Stévia, mais non broyées, avec 3648 T/an d'eau, fonctionnant de façon continue en parallèle pour l'étape d'extraction en contacteur agité et de séparation par filtration centrifuge nécessiterait un volume utile pour le contacteur de 450 L apte à traiter 50 kg/h de feuilles et une capacité de filtration centrifuge de 525 kg/h de mélange extrait-raffinat, pour produire 750 T/an de raffinat à 30 % de matière sèche, et 3500 T/an d'extrait contenant 29 T/an de glycosides de stéviol.

La mise en œuvre de la technologie d'extrusion bi-vis dans un équipement pilote de type Clextral BC21 dont la configuration et le profil de vis ont été adaptés pour assurer l'extraction et la séparation solide-liquide des feuilles séchées et broyées, avec une grille de refus de 1 mm, de Stévia, permet de travailler dans des conditions de *ratio* liquide-solide beaucoup plus faibles que dans le contacteur agité, proches des limites de la capacité d'adsorption d'eau des feuilles séchées de Stévia. Avec un *ratio* liquide-solide de 4,1, à 60°C et un débit de feuilles de 6,5 kg/h, pour une vitesse de rotation des vis de 225 tr/min, l'extrudat qui constitue le raffinat solide est obtenu avec une matière sèche élevée de 40 % qui montre l'efficacité du pressage en ligne avec l'extraction solide-liquide. Mais le cisaillement imposé à la matière associé à la faible granulométrie des feuilles broyées (80 % des particules de taille comprise entre 800 et 200 μm) se traduisent par l'entrainement au filtrat de

pressage de 26 % de fines particules insolubles (aussi appelées « pied »), nécessitant une opération supplémentaire de séparation centrifuge pour obtenir un filtrat clair contenant 8% de matière sèche extraite des feuilles, avec une concentration de 11,1 g/L de stévioside et 5,9 g/L de rébaudioside A dans 17 kg/h de filtrat clarifié, correspond à un rendement de 56 % en glycosides de stéviol. Sans préjuger des améliorations possibles pour le rendement d'extraction et l'efficacité de séparation solide-liquide offertes par la mise en œuvre des feuilles entières, l'adaptation du profil de vis pour un mélange solide-liquide plus efficace avec des temps de séjour plus élevés, l'augmentation du *ratio* liquide-solide, l'élévation de la température de l'eau injectée, et la diminution de la taille des orifices du filtre, un extracteur bi-vis de plus grande capacité de type Evolum 53 pourrait permettre de traiter 400 T/an de feuilles broyées en continu, avec 1477 T/an d'eau, conduisant à 1050 T/an de filtrat clair deux fois plus concentré en glycosides de stéviol (11,1 g/L de stévioside et 5,9 g/L de rébaudioside A) que dans le cas de l'extraction menée en contacteur agité (5,7 g/L de stévioside et 2,2 g/L de rébaudioside A) pour une production de 18 T/an de glycosides de stéviol. Cependant, l'installation nécessitant la mise en œuvre d'un clarificateur centrifuge apte à traiter 180 kg/h de filtrat brut et produisant 390 T/an de pied. La valorisation de cette fraction de fines particules et des raffinats à 40 % de matière sèche devra être étudiée pour compenser le coût matière première supérieur lié aux rendements d'extraction des glycosides de stéviol plus faibles.

Sur la base des résultats obtenus par ces deux procédés, un nouveau système d'extraction et de séparation solide-liquide continu des feuilles séchées et compactées de Stévia a été mise au point et une installation pilote a été réalisée. Il exploite la technologie des vis de transport sans âme connue pour le convoyage et le compactage de solides hydratés, mais qui n'a jamais été décrite pour l'extraction et la séparation solide-liquide de solide : la qualité du mélange feuilles-eau est combinée à son transport à contre-courant du liquide et du solide et à un pressage efficace en ligne de l'extracteur. L'imprégnation des feuilles séchées, renforcée par la recirculation des extraits, est quasi instantanée ; l'extraction par l'eau introduite à contre-courant du solide hydraté est rapide, avec des temps de contact du solide et du liquide limités, de l'ordre de 10 minutes pour une vitesse de rotation de la vis sans âme de 1,5 tr/min, et l'extrait récupéré par simple filtration en partie basse de l'extracteur. En partie haute de ce dernier, le pressage des feuilles transportées permet de séparer un second filtrat et un raffinat solide à 25 % de matière sèche. Avec un débit de feuilles introduites de 4,5 kg/h et un débit d'eau de 44 kg/h, correspondant à un *ratio* liquide-solide de 10,6, à une température de 60°C, ce pilote d'extraction solide-liquide continu à vis sans âme, original et compact, un filtrat clair avec un débit de 36,9 kg/h à 3,8 % de matière sèche est obtenu avec une concentration en stévioside de 5,6 g/L de stévioside et 2,2 g/L de rébaudioside A équivalente à celle estimée avec le contacteur agité (5,7 g/L de stévioside et 2,2 g/L de rébaudioside A) pour un rendement estimé à 78 % en glycosides de stéviol. La transposition de cet équipement pour traiter 400 T/an de feuilles séchées et compactées nécessiterait 3900 T/an d'eau et conduirait à une production de 3280 T/an de filtrat clair contenant 26 T/an de glycosides de stéviol. L'installation nécessiterait un clarificateur centrifuge pouvant traiter 420 kg/h de filtrat brut et produisant 53 T/an de pied.

Finalement, concernant les perspectives de ces travaux de recherche, la mise à l'échelle de l'extracteur-séparateur solide-liquide continu à vis sans âme nécessiterait, selon nos résultats et

l'équipementier Elhyss, afin d'éviter des contraintes mécaniques trop élevés sur la vis sans âme et ainsi épargner sa rupture, la séparation de l'équipement en deux installations de vis sans âme logées dans des auges en U :

- la première serait équipée d'une vis d'une longueur et d'une largeur élevées, permettant le mélange et le convoyage efficaces du mélange solide-liquide pour réaliser l'extraction des glycosides de stéviol avec des temps de séjour du solide et du liquide supérieurs à 10 minutes. Cette installation serait munie d'une seule grille de filtration située en bas de l'appareil et n'aurait pas de clapet de compression au niveau de sa partie haute. L'eau serait injectée en haut de l'appareil et il serait muni d'un système de recirculation de l'extrait qui serait injecté en partie basse. L'extrait serait aussi récupéré en partie basse et le solide hydraté sortirait en haut de l'installation, et serait directement alimenté dans :

- le deuxième équipement, qui lui serait muni d'une vis plus courte et résistante avec un clapet de compression, situé dans la partie au niveau de la sortie du raffinat, permettant un pressage efficace de la matière végétale. Cette installation serait équipée de deux grilles de filtration localisées au niveau de sa partie haute et de sa partie basse. Les extraits récupérés seraient eux aussi recirculés dans le premier équipement.

Il serait aussi intéressant d'effectuer des études complémentaires sur l'influence de la température de l'eau introduite (l'augmentation de la température conduit à une meilleure diffusion des glycosides de stéviol), de l'inclinaison de l'extracteur (l'augmentation de l'inclinaison permettrait d'avoir des temps de séjour du solide et du liquide plus élevés) et des points d'injection de l'eau et des extraits recirculées sur l'extraction des glycosides de stéviol pour son optimisation. De plus, l'étude de l'influence de la longueur du bouchon ainsi que de la masse de contrepoids sur le clapet de compression pourrait permettre d'augmenter la teneur en matière sèche du raffinat solide.

Il serait également avantageux d'envisager l'installation de vérins pneumatiques ou hydrauliques sur le clapet de compression rétrorégulés en fonction de l'effort fourni par la vis sans âme en temps réel afin d'appliquer une pression maximale à chaque instant sans risquer de rupture de la vis et ainsi améliorer l'efficacité de la séparation solide-liquide. En vue de réduire la quantité de pied produit au filtrat brut, outre le fait d'ajouter un clarificateur centrifuge au procédé de fractionnement au niveau de la sortie des extraits, l'installation de grilles de filtration avec une porosité plus faible serait à considérer. L'accumulation de fines particules sur ces zones filtrantes, gênant l'écoulement des extraits, pourrait être contournée par l'ajout de brosses sur les sections de la vis sans âme situées au-dessus de ces zones filtrantes et conférerait un caractère autonettoyant à l'installation.

A l'échelle laboratoire, la poursuite de la modélisation de l'extraction, avec la seconde loi de Fick, pourrait permettre d'établir un modèle mathématique prédictif incluant les différents paramètres opératoires (comme la température ou le *ratio* liquide-solide) afin de pouvoir anticiper les temps d'équilibre et les rendements d'extraction.

Il faudrait continuer les travaux avec la purification des extraits produits afin d'obtenir les glycosides de stéviol à la pureté souhaitée.

La valorisation des co-produits n'est pas à négliger non plus. En effet les glycosides de stéviol représentent au maximum 20% de la matière sèche des feuilles, il reste donc 80% de molécules à valoriser. Nous avons identifié que les extraits de Stévia ont une remarquable capacité antioxydante ou encore, que les raffinats possèdent une teneur résiduelle en glycosides de stéviol qui pourrait être utilisés dans l'alimentation du bétail comme produit appétant.

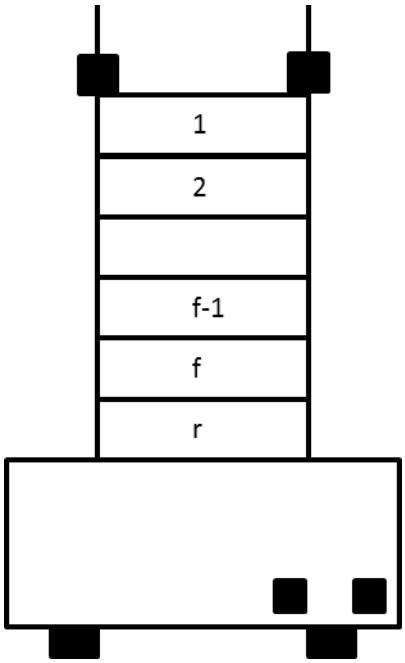
Enfin il sera nécessaire d'évaluer la transposition du procédé d'extraction-séparation solide-liquide et de purification à l'échelle industrielle.

Partie expérimentale



IV.1 Détermination de la répartition des tailles de particules

Pour déterminer la répartition des tailles des particules de la matière première, 65 g sont introduits dans une tamiseuse AS 200 Basic (Retsch, France). A l'intérieur sont disposés des tamis avec différentes tailles d'ouverture qui sont préalablement tarés. Le tamisage dure jusqu'à ce que la masse des feuilles sur les tamis soit constante, puis celle-ci est relevée. La tamiseuse peut être schématisée comme suit :



La taille des ouvertures du tamis 1 est supérieure à celle du tamis 2 qui est supérieure à celle du tamis 3, *etc*. La matière première est déposée sur le tamis 1. Au niveau du dernier étage (r sur le schéma) il n'y a pas de tamis mais un récipient. Une fois le tamisage fini, sur chaque tamis ou sur le récipient il y a une certaine masse de matière première. Cette masse représente les particules qui ont une taille supérieure au maillage du tamis sur lequel elles sont et inférieure à celle du tamis qui est situé juste au-dessus. Les résultats sont exprimés en pourcentage massique pour un intervalle de tailles de particules :

$$[O_{n-1} - O_n] = \frac{m_n - t_n}{m_t}$$

où :

- n = 2, 3 … f-1, f,
- O_{n-1} et O_n sont les tailles des ouvertures des tamis *n-1* et *n,*
- m_n est la masse du tamis *n* et de la matière première qui est dessus,

- t_n est la tare du tamis *n,*
- m_t est la masse totale de matière première introduite à l'instant initial.

Pour le premier tamis le résultat est exprimé sous cette forme :

$$> O_1 = \frac{m_1 - t_1}{m_t}$$

où :

- O_1 est la taille des ouvertures du tamis 1,
- m_1 est la masse du tamis 1 et de la matière première qui est dessus,
- t_1 est la tare du tamis 1.

Pour le récipient le résultat est exprimé sous cette forme :

$$< O_f = \frac{m_r - t_r}{m_t}$$

où :

- O_f est la taille des ouvertures du tamis f,
- m_r est la masse du récipient et de la matière qui est dedans,
- t_r est la tare du récipient.

IV.2 Détermination de la teneur matière sèche d'un liquide et d'un solide

La teneur en matière sèche est déterminée selon la norme française NF V 03-903. Entre 1 g et 5 g de matière sont introduits dans un creuset vide et sec, taré préalablement, qui est placé dans une étuve Air Concept AC 120 system (Firlabo, France) jusqu'à masse constante. Quand le creuset est sorti de l'étuve, il est directement placé dans un dessiccateur contenant des cristaux de silicate afin d'éviter toute reprise d'humidité. Pour déterminer la teneur en matière sèche d'un liquide, le même protocole est suivi avec une masse de 10 g à 20 g.

Les résultats sont présentés en pourcentage massique d'après le calcul suivant :

$$MS = \frac{m_{après} - t_{creuset}}{m_{matière}} \times 100$$

où :

- $m_{après}$ est la masse (g) du creuset et de la matière séchée après sortie de l'étuve,
- $t_{creuset}$ est la tare (g) du creuset vide et sec,
- $m_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite dans le creuset.

IV.3 Détermination de la teneur en cendres minérales

La teneur en cendres minérales (CM) est déterminée selon la norme française NF V03-322. Deux grammes de matière sont introduits dans un creuset vide et sec, taré préalablement, qui est placé dans un four de calcination Thermolyne 48000 Furnace (Thermo Scientific, France) à 550°C jusqu'à masse constante. Quand le creuset est sorti du four, il est directement placé dans un dessiccateur contenant des cristaux de silicate afin d'éviter toute reprise d'humidité.

Les résultats sont présentés en pourcentage massique (g/100g) par rapport à la matière sèche d'après le calcul suivant :

$$CM = \frac{m_{après} - t_{creuset}}{m_{matière} \times MS} \times 100$$

où :

- $m_{après}$ est la masse (g) du creuset et de la matière calcinée après sortie du four,
- $t_{creuset}$ est la tare (g) du creuset vide et sec,
- $m_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite dans le creuset,
- MS est la matière sèche (g/100g) de la matière.

IV.4 Détermination de la teneur en constituants pariétaux

IV.4.1 Principe

La teneur en cellulose (C), hémicelluloses (Hc) et lignines (L) est déterminée par les méthodes établies par Van Soest et Wine (Van Soest and Wine 1967, 1968) qui consiste à faire subir à la matière végétale deux attaques avec des détergents différents.

La première attaque NDF (Neutral Detergent Fiber) solubilise tous les constituants non pariétaux (protéines, sucres…) pour laisser un résidu composé uniquement de matière minérale, de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines.

La deuxième attaque ADF (Acid Detergent Fiber) est réalisée en deux étapes. Le premier détergent permet de solubiliser en plus des constituants non pariétaux, les hémicelluloses laissant un résidu constitué de matière minérale, de cellulose et de lignines. La deuxième étape est une attaque acide au permanganate de potassium qui solubilise les lignines laissant donc un résidu composé uniquement de matière minérale et de cellulose.

Ainsi en déterminant la teneur en cendres minérales des résidus, par différence les teneurs en cellulose, hémicelluloses et lignines peuvent être trouvées.

Il est possible de résumer les différentes étapes comme suit :

$$\text{Matière végétale} \xrightarrow{\text{Attaque NDF (1)}} \text{Résidu} = \text{CM} + \text{C} + \text{Hc} + \text{L}$$

$$\text{Matière végétale} \xrightarrow{\text{Attaque ADF (2)}} \text{Résidu} = \text{CM} + \text{C} + \text{L} \xrightarrow{\text{Attaque } KMnO_4 \text{ (3)}} \text{Résidu} = \text{CM} + \text{C}$$

Les résultats sont présentés en pourcentage massique par rapport à la matière sèche d'après le calcul suivant :

$$C = \frac{(m_{après3} - t_{fritté}) \times (1 - CM_3)}{m_{matière} \times MS} \times 100$$

où :

- $m_{après3}$ est la masse (g) du fritté et du résidu après l'attaque $KMnO_4$ et après la sortie du four,
- $t_{fritté}$ est la tare (g) du fritté vide et sec,
- CM_3 est la teneur en cendres minérales du résidu après l'attaque $KMnO_4$,
- $m_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite dans le fritté avant l'attaque ADF,
- MS est la teneur en matière sèche (g/100g) de la matière introduite dans le fritté avant l'attaque ADF,

$$L = \frac{(m_{après2} - m_{après3})}{m_{matière} \times MS} \times 100$$

où :

- $m_{après2}$ est la masse (g) du fritté et du résidu après l'attaque ADF et après la sortie du four,

$$Hc = \frac{\left(m_{après1} - t'_{fritté}\right) \times (1 - MM_1) - \left(m'_{matière} \times MS\right) \times (C + L)}{m'_{matière} \times MS}$$

où :

- $m_{après1}$ est la masse (g) du fritté et du résidu après l'attaque NDF et après la sortie du four,
- $t'_{fritté}$ est la tare (g) du fritté vide et sec,
- MM_1 est la teneur en matière minérale du résidu après l'attaque NDF,
- $m'_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite dans le fritté avant l'attaque NDF,
- MS est la teneur en matière sèche (g/100g) de la matière introduite dans le fritté avant l'attaque NDF.

IV.4.2 Réactifs

Solution pour attaque NDF :

- 30 g de laurylsulfate de sodium
- 18,61 g d'éthylène diamine tétra-acétate de sodium
- 4,56 g de phosphate dissodique
- 6,81 g de borate de sodium décahydraté
- Eau déminéralisée qsp 1 L

Solution pour attaque ADF :

- 20 g de hexadécyltriméthyl ammonium bromide
- 26,8 mL d'acide sulfurique concentré
- Eau déminéralisée qsp 1 L

Solution pour attaque $KMnO_4$:

C'est le mélange de deux volumes d'une solution de $KMnO_4$ saturé et d'un volume d'une solution tampon :

- Solution KMnO4 :
  - 50 g de permanganate de potassium
  - Eau déminéralisée qsp 1 L

- Solution tampon :

Elle est réalisée en deux étapes :

  - 6 g de nitrate de fer nonahydraté
  - 0,15 g de nitrate d'argent
  - Eau déminéralisée qsp 100 mL

Puis :

  - 5 g d'acétate de potassium
  - 500 mL acide acétique glacial
  - 400 mL d'alcool butylique tertiaire
  - 100 mL de la solution de nitrate de fer et argent préparée au préalable

Solution déminéralisante :

- 50 g d'acide oxalique dihydraté
- 700 mL d'éthanol 95 %
- 50 mL d'acide chlorhydrique 35 %
- 250 mL d'eau distillée

IV.4.3 Matériel

Les attaques NDF et ADF sont réalisées dans un appareil d'extraction à chaud Fibertec™ M1020 (Foss, France).

L'attaque $KMnO_4$ est réalisée dans un appareil d'extraction à froid Cold Extraction Unit 1021 (Foss, France)

IV.4.4 Protocole

- Attaque NDF ou ADF :

Les frittés vides et secs sont tarés et environ 1 g de matière broyée et séchée est introduit dans chaque fritté avec 100 mL de réactif NDF ou ADF. Les frittés sont chauffés à ébullition pendant 1 heure. Les réactifs sont ensuite filtrés sous vide et le résidu est rincé plusieurs fois avec de l'eau déminéralisée chaude. Pour les frittés NDF, la teneur en matière sèche et en matière minérale des frittés est déterminée. Les frittés ADF sont utilisés pour la seconde attaque au permanganate de potassium.

- Attaque $KMnO_4$:

Les frittés ADF sont remplis de 25mL de la solution pour attaque $KMnO_4$ et sont laissés en contact pendant 1h30 avec une agitation régulière. Les réactifs sont ensuite filtrés sous vide et les résidus sont rincés avec la solution déminéralisante puis à l'éthanol 80%. Les teneurs en matière sèche et en matière minérale des frittés sont déterminées.

IV.5 Détermination de la teneur en protéines

La teneur en protéines (P) est déterminée à partir du dosage de l'azote total par la méthode Kjeldahl selon la norme française NF V 18-100 (Kjeldahl 1883). Ce dosage est réalisé en deux étapes. Tout d'abord l'azote organique contenu dans la matière a été converti en azote minéral (sulfate d'ammonium) lors d'une minéralisation catalysée. Ensuite les ions ammoniums sont convertis en ammoniaque par une réaction acido-basique avec de la soude et la solution est distillée à la vapeur. L'ammoniaque est piégée dans une solution d'acide borique avec des indicateurs colorés et est titrée par un dosage acido-basique par de l'acide chlorhydrique. La teneur en protéine est obtenue grâce à un facteur de conversion appliqué à la quantité d'azote total. Ce facteur représente le rapport entre la masse molaire moyenne des protéines et celle de l'azote.

La première étape est réalisée dans un bloc de minéralisation Tecator 2020 Digestor (Foss, France). Un gramme de matière broyée et séchée est introduit dans un tube de minéralisation avec 12,5 mL d'acide sulfurique concentré pendant 12h. Un catalyseur composé de 7 g de sulfate de potassium et de 0,4 g de sulfate de cuivre pentahydraté est ajouté pour favoriser la minéralisation qui a lieu à 400°C pendant 1h15.

Une fois le tube refroidi, il a été placé dans une unité de distillation Kjeltec™ 2200 (Foss, France) et 80 mL d'eau distillée sont ajoutés avec 50 mL de soude à 40%. La distillation est effectuée pendant 4 minutes et les vapeurs sont piégées par barbotage dans 30 mL d'acide borique à 4 % contenant 10 mL/L d'une solution méthanolique de vert de bromocrésol à 1 g/L et 7 mL/L d'une solution méthanolique de rouge de méthyle à 1 g/L. Cette solution finale est titrée par de l'acide chlorhydrique à 0,1 mol/L. Le volume équivalent a été obtenu quand la solution vire du bleu-vert au rose-orangé. Pour les blancs, la couleur passe du rose violacé au rose orangé.

Les résultats sont présentés en pourcentage massique par rapport à la matière sèche d'après les calculs suivant :

$$N = \frac{(V_{éq} - V_{blanc}) \times [HCl] \times M_N}{m_{matière} \times MS} \times 100$$

où :

- $V_{éq}$ est le volume (L) d'acide chlorhydrique versé à l'équivalence pour le titrage de la matière,
- V_{blanc} est le volume (L) d'acide chlorhydrique versé à l'équivalence pour le titrage du blanc,
- [HCl] est la concentration (mol/L) de la solution d'acide chlorhydrique utilisée,
- $m_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite au début,
- MS est la matière sèche (g/100g) de la matière.

$$P = N \times k$$

où k est le facteur de conversion de l'azote en protéines soit 6,25 d'après la norme NF V 18-100.

IV.6 Détermination de la teneur en lipides

La teneur en lipides (L) est déterminée selon la norme française NF V 03-908. Vingt grammes de matière sont introduits dans une cartouche de papier filtre puis l'extraction a lieu dans un appareil de Soxhlet de 125 mL avec 200 mL de cyclohexane. Un ballon de 250 mL est utilisé pour récupérer l'extrait lipidique. Après 6 h d'extraction avec une fréquence de siphonage de 6 par heure, le solvant est évaporé avec un système d'évaporateur rotatif IKA® RV 10 digital (VWR, France). Les dernières traces de solvant sont éliminées en mettant le ballon dans une étuve à 103°C jusqu'à masse constante.

Les résultats sont présentés en pourcentage massique par rapport à la matière sèche d'après le calcul suivant :

$$L = \frac{m_{après} - t_{ballon}}{m_{matière} \times MS} \times 100$$

Où :

- $m_{après}$ est la masse (g) du ballon et des lipides après sortie de l'étuve
- t_{ballon} est la tare (g) du ballon vide et sec
- $m_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite dans la cartouche de papier filtre
- MS est la matière sèche (g / 100 g) de la matière

IV.7 Détermination de la teneur en huile essentielle

La teneur en huile essentielle (HE) est déterminée selon la méthode préconisée par la pharmacopée française. Un hydrodistillateur avec un système de cohobage est utilisé pour réaliser l'hydrodistillation des composés volatils. Le *ratio* eau/feuilles est fixé à 12 d'après de précédents travaux réalisés dans le laboratoire (Lagunez Rivera, 2006). Deux cent cinquante grammes de feuilles sont placés dans un ballon de 6 L avec 3 L d'eau du réseau. La distillation dure jusqu'à ce que la quantité d'huile essentielle récupérée soit constante, soit environ 6 h. L'huile essentielle est ensuite extraite avec du pentane. Du sulfate de magnésium est ajouté au mélange pour éliminer les traces d'eau. Après filtration, le mélange est placé dans un flacon vide et sec, pour enfin être exposé à un flux d'azote afin d'évaporer le solvant organique.

Les résultats sont présentés en pourcentage massique par rapport à la matière sèche d'après le calcul suivant :

$$HE = \frac{m_{après} - t_{flacon}}{m_{matière} \times MS} \times 100$$

Où :

- $m_{après}$ est la masse (g) du flacon et de l'huile essentielle après l'application du flux d'azote
- t_{flacon} est la tare (g) du flacon vide et sec
- $m_{matière}$ est la masse (g) de matière introduite dans le ballon
- MS est la matière sèche (g / 100 g) de la matière

IV.8 Détermination de la teneur en composés phénoliques totaux

La teneur en composés phénoliques totaux (PP) est déterminée selon le dosage de Folin-Ciocalteu adapté de la méthode de Singleton et Rossi (Singleton and Rossi 1965). Le dosage est réalisé sur une solution. Ainsi pour connaitre le potentiel de composés phénoliques totaux d'une matière il est nécessaire de réaliser une extraction solide-liquide au préalable. Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phospotungstique et d'acide phosphomolybdique. Les phénols sont oxydés et réduisent ce réactif en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques oxydés. Les résultats sont exprimés en fonction d'un composé phénolique simple, l'acide gallique.

La gamme étalon est réalisée avec de l'acide gallique dans de l'eau distillée entre 0 et 100 mg/L.

Le dosage est réalisé avec 1 mL d'extrait (pur ou dilué) ou de solution étalon mis dans un tube à essai avec 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (VWR, France) et 7,5 mL d'eau distillée. Cette solution est mélangée pendant 3 minutes et 1 mL de carbonate de sodium à 20% est ajouté. La solution est encore mélangée et le tube à essai est placé dans un bain-marie à 70°C pendant 10 minutes. Le mélange est ensuite refroidi à l'air ambiant puis l'absorbance de la solution a été déterminée dans des cuves en quartz dans un spectrophotomètre UV-1800 (Shimadzu, France) à 700 nm.

Les résultats sont présentés en mg équivalent acide gallique par g d'extrait sec d'après le calcul suivant :

$$PP_{extrait} = \frac{[EAG]_{extrait} \times V_{solution}}{V_{extrait} \times d \times MS_{extrait}}$$

où :

- [EAG] est la concentration (mg/mL) équivalent acide gallique de la solution analysée,
- $V_{solution}$ est le volume (mL) de la solution dans le tube à essai (soit 10 mL),
- $V_{extrait}$ est le volume (mL) d'extrait dilué introduit dans le tube à essai (soit 1 mL),
- d est le facteur de dilution de l'extrait introduit dans le tube à essai,
- $MS_{extrait}$ est la matière sèche (g/mL) de d'extrait,

ou en mg équivalent acide gallique par 100 g de matière sèche d'après le calcul suivant :

$$PP_{matière} = \frac{PP_{extrait} \times V_{extrait\ total} \times MS_{extrait}}{m_{matière} \times MS_{matière}}$$

où :

- $V_{solution}$ est le volume (mL) total de l'extrait,
- $m_{matière}$ est la masse de matière utilisée pour l'extraction,
- $MS_{extrait}$ est la matière sèche (g/100g) de la matière.

Le facteur de dilution d est définit par le calcul suivant :

$$d = \frac{V_{dilution}}{V_{dilution} + V_{solvant}}$$

où :

- $V_{dilution}$ est le volume (mL) d'extrait prélevé pour réaliser la dilution,
- $V_{solvant}$ est le volume (mL) de solvant ajouté pour réaliser la dilution.

IV.9 Détermination de la capacité antioxydante

La capacité antioxydante (CI_{50}) est déterminée par le test à la 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) d'après la méthode de Brand-Williams, Cuvelier et Berset (Brand-Williams et al. 1995). Le test est réalisé sur une solution. Ainsi pour connaitre la capacité antioxydante d'une matière il est nécessaire de réaliser une extraction solide-liquide au préalable. Dans ce test, la DPPH est utilisée sous forme radicalaire $DPPH^{\cdot}$ et elle absorbe dans le violet à 517nm. En présence d'une espèce antioxydante (AH) ou d'un radical ($R^{\cdot}$) la $DPPH^{\cdot}$ est réduite et n'absorbe plus dans le violet. Les réactions suivantes peuvent être mises en jeu :

$$DPPH^{\circ} + AH \rightarrow DPPH - H + A^{\circ}$$

$$DPPH^{\circ} + R^{\circ} \rightarrow DPPH - R$$

La réduction de la $DPPH^{\cdot}$ implique une décoloration de la solution, elle passe du violet au jaune.

La solution de DPPH est préparée dans le méthanol à 60 mg/L. Le test est réalisé sur une gamme de dilution de l'extrait. Pour chaque mesure, 300 µL d'extrait dilué est mélangé dans 700 µL de méthanol et 2,5 mL de la solution de DPPH dans un tube à essai. La solution est ensuite agitée au vortex. Après 40 minutes de réaction, l'absorbance de la solution est déterminée dans des cuves en quartz dans un spectrophotomètre UV 1800 (Shimadzu, France) à 517 nm.

L'absorbance déterminée est ensuite transformée en pourcentage d'activité antiradicalaire :

$$Activité\ (\%) = \left(1 - \frac{Absorbance\ échantillon}{Absorbance\ blanc}\right) \times 100$$

La courbe de l'activité antiradicalaire en fonction de la concentration en matière sèche de chaque dilution d'extrait est tracée. La capacité antioxydante d'un extrait est évaluée par rapport à la valeur de la concentration inhibitrice à 50% des radicaux $DPPH^{\cdot}$ (CI_{50}) à 40 minutes (Figure 0-1). C'est-à-dire la concentration minimale (mg/L) en matière sèche de l'extrait nécessaire pour réduire la moitié des molécules de $DPPH^{\cdot}$ présentes dans le milieu réactionnel. Ainsi plus la CI_{50} est petite, plus l'activité antiradicalaire de l'extrait est forte.

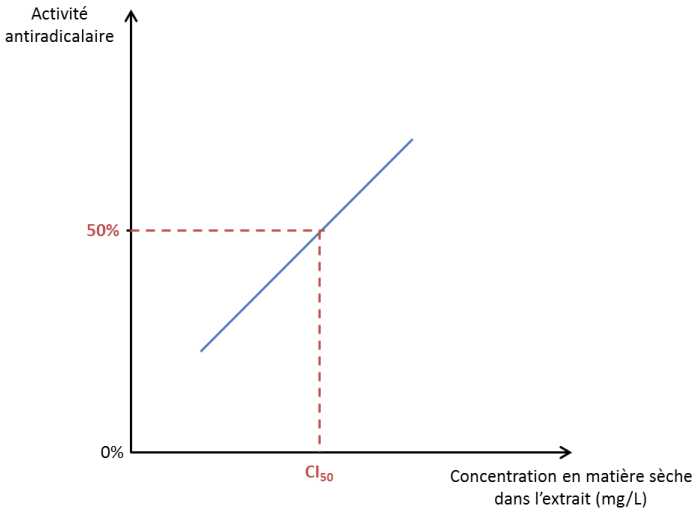


Figure 0-1 Exemple de l'évolution d'une activité antiradicalaire en fonction de la concentration en matière sèche d'un extrait

IV.10 Protocole d'extraction en ASE

L'ASE (Accelerated Solvent Extraction) est une méthode automatisée rapide d'extraction utilisant des températures et des pressions élevées. Les hautes températures permettent une meilleure solubilisation des solutés, des vitesses de diffusion plus rapides, une viscosité de solvant plus faible et diminue les interactions soluté-matrice. Les hautes pressions permettent de travailler avec des solvants dans leur état liquide au-delà de leur température d'ébullition et accélèrent le procédé d'extraction global (Mustafa and Turner 2011).

Ce protocole d'extraction a fait l'objet d'une publication que nous avons soumis dans le journal Food Chemistry (Jentzer *et al.*, 2015). Les extractions sont réalisées dans une ASE 350 (Figure 0-2, Thermo Scientific™ Dionex™, France). Nous avons utilisé des cellules d'extraction en acier inoxydable et de volume interne de 10 mL. Elles sont équipées d'un fritté en acier inoxydable et d'un filtre en cellulose dans leur partie basse, pour éviter la collecte de fines particules solides dans les vials de collection. Environ 0,5 g de feuilles broyées avec une grille de 0,5 mm sont mélangés avec du sable de Fontainebleau puis disposés dans une cellule. La cellule est ensuite disposée sur le carrousel de cellules de l'ASE 350. Une fois la cellule chargée dans la machine, elle est remplie avec environ 10 mL d'eau Milli-Q, puis mise sous pression à 10,3 MPa, chauffée à 100°C et extraite statiquement pendant 4 min. Les cellules sont ensuite purgées, rincées à l'eau milli-Q (avec un volume de rinçage de 100%, *i.e.* 10 mL) et enfin séchées avec un courant d'azote pendant 100 s. Les extraits aqueux, récoltés dans les vials, sont complétés à 50 mL dans une fiole jaugée avec de l'eau milli-Q, dilués si nécessaire puis analysés en CLHP (Partie IV.11).



Figure 0-2 ASE 350 (source : www.dionex.com)

IV.11 Détermination de la teneur en glycosides de stéviol

Pour déterminer la teneur en glycosides de stéviol ([GS]) d'un extrait une méthode de chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) est utilisée. Elle est adaptée de la méthode de dosage des glycosides de steviol de la JECFA publiée dans (JECFA, 2010).

Le système CLHP utilisé est constitué d'une pompe P680, d'un injecteur automatique d'échantillons ASI-100, d'un compartiment à colonne thermorégulé Ultimate 300 et d'un détecteur à UV-Vis à barrette de diodes (Thermo Scientific™ Dionex™, France). Ces appareils sont pilotés par le logiciel de chromatographie Chroméléon (Thermo Scientific™ Dionex™, France)

Les échantillons sont injectés dans une colonne apolaire en phase inverse C18 Luna, de longueur de 250 mm, de diamètre interne de 4,6 mm et de taille de particules de 5 µ (Phenomenex, France). Le volume injecté est de 20 µL et la température de la colonne est de 40°C. La phase mobile est constituée d'eau Milli-Q avec de l'acide formique à 0,1% (v/v) (solvant A) et d'acétonitrile HPLC (solvant B). Le mode d'élution est isocratique à 1 mL/min pendant 30 min avec 69 % (v/v) de solvant A et 31 % (v/v) de solvant B. Les chromatogrammes sont enregistrés à 200 nm.

La calibration est effectuée avec un étalonnage externe. Une première solution mère est réalisée avec une solution mère de stévioside et une de rébaudioside A d'après le schéma suivant (Figure 0-3) :

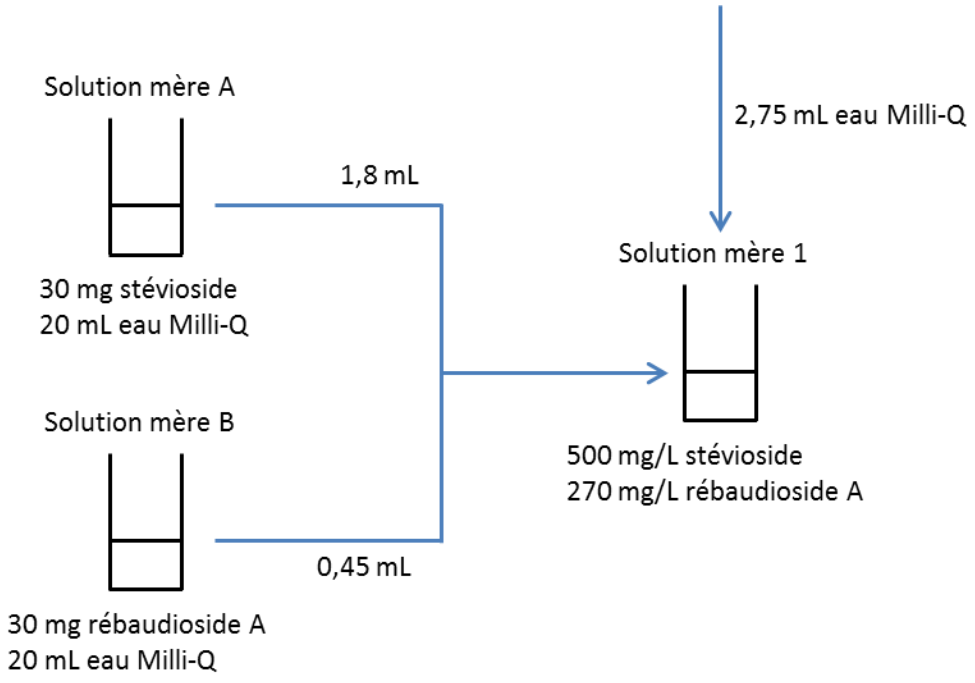


Figure 0-3 Représentation schématique de la réalisation de la solution mère en stévioside et rébaudioside A

La gamme étalon est faite par dilutions successives de la solution mère 1 avec de l'eau Milli-Q selon les conditions suivantes (Tableau 0-1) :

Tableau 0-1 Préparation de la gamme étalon

Nom	Solution prélevée	Volume solution prélevé	Volume eau	[RebA] (mg/L)	[Stev] (mg/L)
SM1	-	-	-	270	500
SF1	SM1	4	1	215	400
SF2	SF1	3	1	161	300
SF3	SF2	2	1	108	200
SF4	SF3	1	1	54	100
SF5	SF4	1	1	27	50

L'aire obtenue pour chaque molécule dans chaque solution est reliée à leur concentration et une courbe de calibration peut être tracée pour chaque molécule. Ces courbes étant linéaires, il est donc aisé de relier l'aire d'un pic d'une molécule à sa concentration dans l'extrait par une simple régression linéaire. Un exemple des étalonnages réalisés est présenté respectivement pour le rébaudioside A et le stévioside sur la Figure 0-4 et la Figure 0-5, et un exemple de chromatogramme obtenu est donné sur la Figure 0-6.

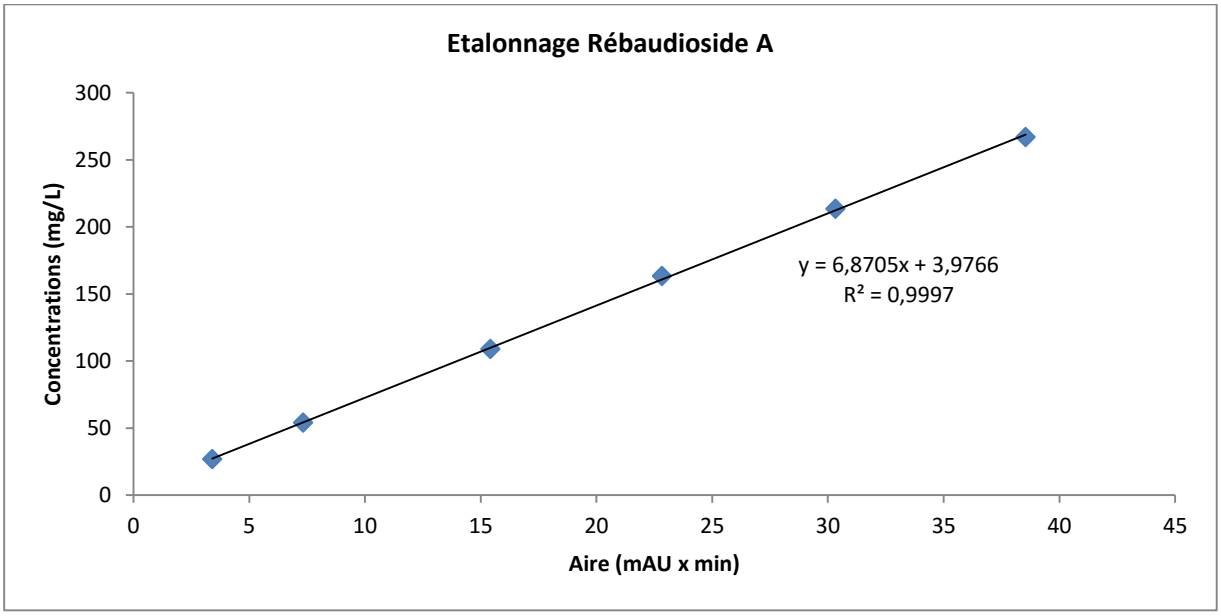


Figure 0-4 Exemple d'une courbe étalon du rébaudioside A

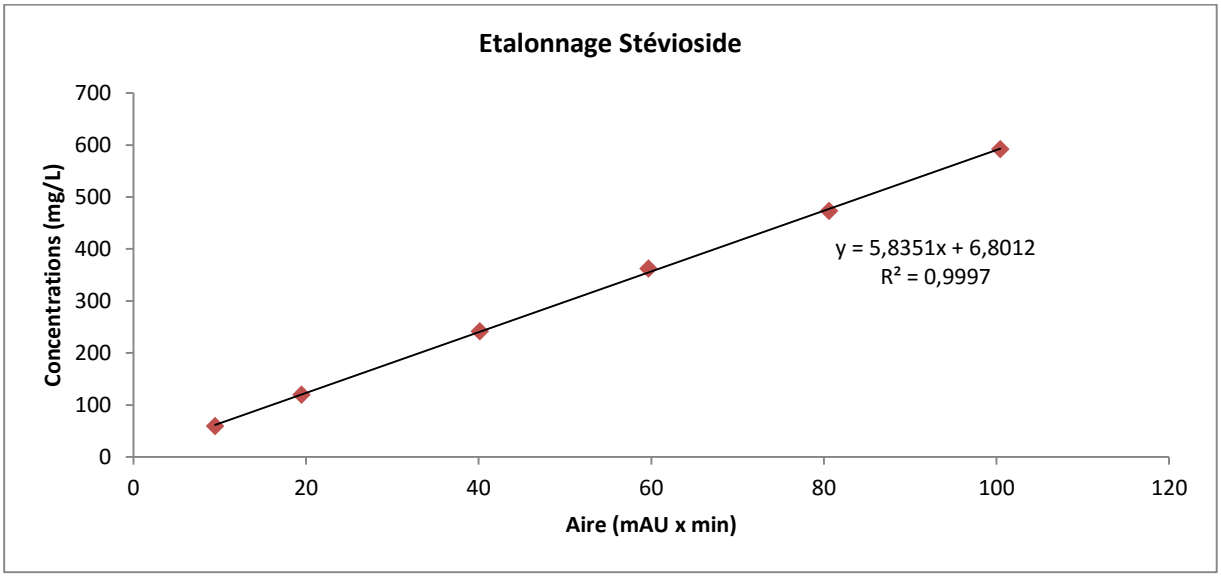


Figure 0-5 Exemple d'une courbe étalon du stévioside

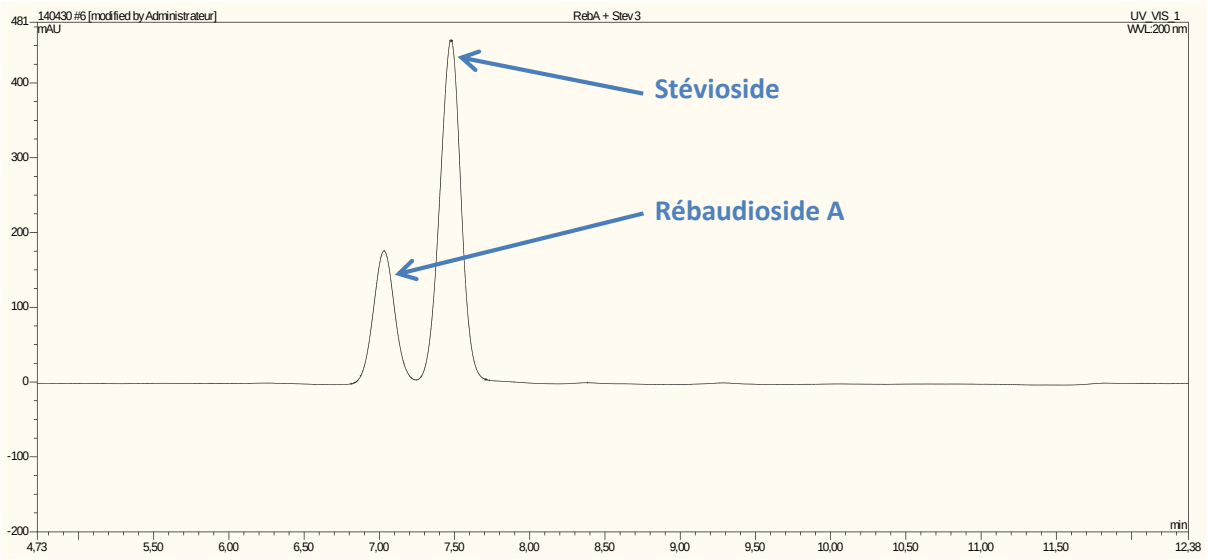


Figure 0-6 Exemple d'un chromatogramme obtenu à partir d'une solution étalon

Les extraits sont dilués avec de l'eau Milli-Q si besoin et filtrés à travers une membrane en cellulose de 0,45 µm avant d'être injectés dans le système CLHP. Un exemple de chromatogramme obtenu est présenté sur la Figure 0-7.

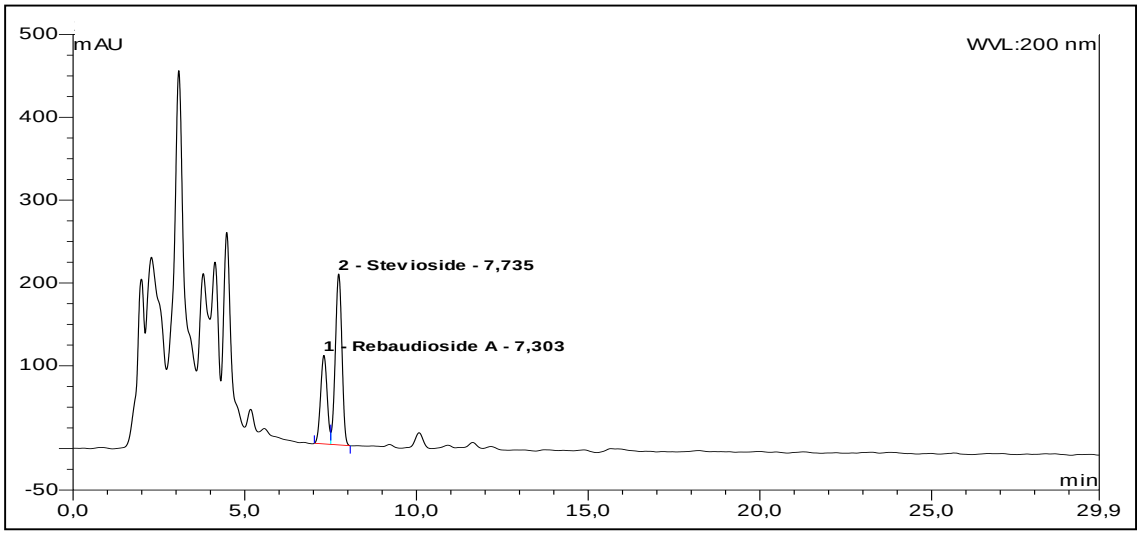


Figure 0-7 Exemple d'un chromatogramme d'un extrait brut

IV.12 Protocole d'extraction aqueuse des feuilles de Stévia à l'échelle laboratoire

Six cent grammes d'eau déminéralisée sont pesés précisément dans un flacon en verre de 1L. Cette eau est agitée, à l'aide d'un barreau aimanté, et chauffée jusqu'à la température d'extraction avec une plaque chauffante thermo régulée.

Les feuilles de Stévia sont ensuite pesées précisément, de sorte à atteindre le *ratio* liquide-solide souhaité, et sont ajoutées dans le flacon en verre, ce qui définit le temps initial de l'extraction.

Le mélange est agité si nécessaire, à température d'extraction, pendant la durée d'extraction fixée.

Enfin, le mélange est séparé par filtration sur toile en nylon de porosité de 100 µm.

IV.13 Réextraction du raffinat produit par l'extraction de feuilles de *Stevia rebaudiana* Bertoni

Le raffinat est réextrait dans un flacon de 1L.Pour chaque expérience trois répétitions sont effectuées. Environ 15 g de marc sont introduits dans 600 mL d'eau déminéralisée à 60°C. La durée d'extraction est fixée à 60 minutes sous agitation magnétique à 600 tr/min. Le nouveau raffinat produit est séparé de l'extrait par filtration sur toile en nylon de porosité de 100 µm. L'extrait est analysé par CLHP (Partie IV.11) et la teneur en glycosides de stéviol résiduelle du raffinat initial est calculée selon la formule suivante :

$$T_{Stev} = \frac{\left(V + \frac{(1 - MS) \times m}{d}\right) \times [Stev]}{m \times MS}$$

où :

- T_{Stev} est la teneur résiduelle en stévioside (g/kg) du marc de feuilles,
- V est le volume (L) d'eau utilisé pour réaliser la réextraction,
- MS est la teneur en matière sèche (kg/kg) du marc de feuilles,
- m est la masse (kg) de marc de feuille utilisé pour la réextraction,
- d est la densité (kg/L) de l'eau,
- [Stev] est la concentration en stévioside (g/L) de l'extrait de la réextraction.

De la même façon la teneur résiduelle en rébaudioside A est calculée en remplaçant la concentration en stévioside de l'extrait de la réextraction par la concentration en rébaudioside A.

IV.14 Analyse colorimétrique

IV.14.1 Conditions de la mesure de la coloration

La détermination de la concentration (C) en traceur dans les différents échantillons prélevés a été réalisée par méthode colorimétrique. L'appareil d'analyse était un spectrocolorimètre de type Chromameter CR-410 de KONICA MINOLTA. L'illuminant utilisé était de type D 65. Normalisée par la Commission Internationale à l'Eclairage (CIE), cette source lumineuse correspond à la lumière du jour avec UV. L'observateur mis en œuvre était l'observateur 10°, défini lui aussi par la CIE. Les cônes et les bâtonnets y reçoivent tous les deux l'information : vision colorée et intensité lumineuse.

La couleur peut être caractérisée par trois grandeurs visualisables en trois dimensions et qui sont à la base de la colorimétrie. Plusieurs types de référentiels existent. Pour cette étude, le référentiel choisi était le référentiel CIE L*a*b* 1986, recommandé par la CIE pour l'étude des surfaces.

La géométrie de mesure était un système 45/0 (illumination à 45°, lecture à 0°). La surface de l'échantillon a été éclairée sous un angle de 45° et seule la lumière réfléchie perpendiculairement à la surface de l'échantillon a été prise en compte pour la mesure.

IV.14.2 Principe de mesure de la coloration

Les échantillons liquides ont été dilués avec de l'eau milli-Q car ils étaient trop sombres pour être analysés.

Les matières à analyser ont été placées dans un récipient en verre. L'appareil a fait un balayage du spectre de 400 à 700 nm, pour un pas fixé à 10 nm. Chaque valeur donnée par l'appareil est en fait la moyenne de 6 mesures. Pour chaque échantillon nous avons répété deux fois l'analyse consécutivement. Les données mesurées ont ensuite été traitées sur ordinateur. Les valeurs des composantes trichromatiques ont été converties en coordonnées L, a et b. Dans l'espace couleur L*a*b*, L* indique la clarté tandis que a* et b* sont les coordonnées de chromaticité : +a* va vers le rouge alors que –a* va vers le vert et +b* va vers le jaune alors que –b* va vers le bleu.

Le rapport a* a été utilisé pour évaluer la proportion de rouge provenant de l'érythrosine. Il a été ainsi possible de tracer des courbes montrant l'évolution de la valeur de a* et donc de la coloration en fonction du temps. Normées par la surface, ces courbes correspondent aux DTS des solides et des liquides.

La détermination des moments d'ordre 1 et 2 a été réalisée à partir des mesures issues du spectrocolorimètre selon le protocole suivant :

- Calcul de la ligne de base (moyenne du signal sur les points précédant le pic)
- Correction des valeurs C(t) (concentration en traceur) par soustraction de la valeur de la ligne de base
- Intégration numérique de la fonction C(t) par la méthode des trapèzes et détermination de la fonction de distribution du temps de séjour E (t)

$$E(t) = \frac{C(t)}{\sum C(t) \times \Delta t}$$

Avec $\sum C(t) \times \Delta t = C(t_0) \times \frac{t_1 - t_0}{2} + \sum_{i=1}^{n-1} C(t_i) \times \frac{t_{i+1} - t_{i-1}}{2} + C(t_n) \times \frac{t_n - t_{n-1}}{2}$

Où :

- C(t) est la concentration en traceur dans l'échantillon prélevé à l'instant t
- Δt est la période d'échantillonnage

Annexes



Annexe 1

INSTITUT DES SCIENCES ANALYTIQUES

SERVICE CENTRAL D'ANALYSE

Villeurbanne le : 03/02/2014

Renseignements :
Bureau des Analyses
de 8h - 12h et 13h - 16h30
Tél : 04.37.42.36.36
Fax : 04.37.42.36.37
Mèl : bda@sca.cnrs.fr

INP
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES
INGENIEURS EN ARTS CHIMIQUES ET
TECHNOLOGIQUES DE TOULOUSE
M. JENTZER
LABORATOIRE DE CHIMIE AGRO
INDUSTRIELLE
4 ALLEE MONSO
BP 44362
31030 TOULOUSE Cedex 4

Bulletin d'analyses BUL14/0175-1

Veuillez trouver ci-après, les résultats des analyses effectuées sur les échantillons que vous nous avez envoyés.

Bon de commande :	4500050295	Du	29/10/2013
Référence	Extrait végétal 1	Date de réception	12/11/13
N° SCA	13/09462		

N	**0.17 %**						
S	**<0.20 %**						
Densité	**1.0112 g/cm³**						
P	**146 mg/l**						
Acides organiques (panoramique) :							
acide gluconique	<10 mg/l						
acide glycerique	<10 mg/l						
acide formique	<10 mg/l						
acide oxalique	<10 mg/l						
acide citrique	<10 mg/l						
acide acetique	<10 mg/l						
acide glutarique	<10 mg/l						
acide glucuronique	<10 mg/l						
acide quinique	1300 mg/l						
acide tartrique	126 mg/l						
Sucres (panoramique) :							
turanose	< 10 mg/l						
xylose	< 10 mg/l						
arabinose	< 10 mg/l						

Responsable scientifique

1 / 3

5 rue de la Doua - 69100 VILLEURBANNE (France)
Téléphone : (33) 04 37 42 36 36 - Télécopie : (33) 04 37 42 36 37 - http://www.sca.cnrs.fr

INSTITUT DES SCIENCES ANALYTIQUES

SERVICE CENTRAL D'ANALYSE

Villeurbanne le : 03/02/2014

Renseignements :
Bureau des Analyses
de 8h - 12h et 13h - 16h30
Tél : 04.37.42.36.36
Fax : 04.37.42.36.37
Mèl : bda@sca.cnrs.fr

INP
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES
INGENIEURS EN ARTS CHIMIQUES ET
TECHNOLOGIQUES DE TOULOUSE
M. JENTZER
LABORATOIRE DE CHIMIE AGRO
INDUSTRIELLE
4 ALLEE MONSO
BP 44362
31030 TOULOUSE Cedex 4

Bulletin d'analyses BUL14/0175-1

glycérol	< 10 mg/l						
érythritol	< 10 mg/l						
lactose	< 10 mg/l						
éthanol	< 10 mg/l						
méthanol	< 10 mg/l						
inositol	20.9 mg/l						
mannitol	17.4 mg/l						
galactose	471 mg/l						
fructose	297 mg/l						
ribose	261 mg/l						
cellobiose	36.2 mg/l						
glucose	< 10 mg/l						
sucrose	< 10 mg/l						
tréhalose	< 10 mg/l						
erlose	< 10 mg/l						
maltose	< 10 mg/l						
mélézitose	< 10 mg/l						
sorbitol	< 10 mg/l						
Anions (panoramique) : 13/09462							
QUINATE	1324 mg/l						
ACETATE	51.6 mg/l						
FORMIATE	25.7 mg/l						

Responsable scientifique

5 rue de la Doua - 69100 VILLEURBANNE (France)
Téléphone : (33) 04 37 42 36 36 - Télécopie : (33) 04 37 42 36 37 - http://www.sca.cnrs.fr

INSTITUT DES SCIENCES ANALYTIQUES

SERVICE CENTRAL D'ANALYSE

Villeurbanne le : 03/02/2014

Renseignements :
Bureau des Analyses
de 8h - 12h et 13h - 16h30
Tél : 04.37.42.36.36
Fax : 04.37.42.36.37
Mèl : bda@sca.cnrs.fr

INP
ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES
INGENIEURS EN ARTS CHIMIQUES ET
TECHNOLOGIQUES DE TOULOUSE
M. JENTZER
LABORATOIRE DE CHIMIE AGRO
INDUSTRIELLE
4 ALLEE MONSO
BP 44362
31030 TOULOUSE Cedex 4

Bulletin d'analyses BUL14/0175-1

PYRUVATE	3.98 mg/l						
CHLOROACETATE	3.4 mg/l						
CHLORURE	499 mg/l						
NITRATE	251 mg/l						
MALATE	82.2 mg/l						
MALONATE	78.8 mg/l						
SULFATE	99 mg/l						
OXALATE	25.2 mg/l						
PHOSPHATE	401 mg/l						
CITRATE	672 mg/l						
Cations (panoramique) : 13/09462							
SODIUM	6.4 mg/l						
AMMONIUM	36.8 mg/l						
POTASSIUM	1810 mg/l						
MAGNESIUM	236 mg/l						
CALCIUM	423 mg/l						

Remarques : Le panoramique des acides a été réalisé sur la base de nos conaissances établies en acides (sur un gamme d'acides usuels)

Responsable scientifique

5 rue de la Doua - 69100 VILLEURBANNE (France)
Téléphone : (33) 04 37 42 36 36 - Télécopie : (33) 04 37 42 36 37 - http://www.sca.cnrs.fr

Annexe 2

Un modèle polynomial du second ordre a été utilisé pour évaluer les réponses (*Y*) comme une fonction de deux variables indépendantes, le *ratio* liquide solide (x_1) et la vitesse de vis (x_2), et de leurs interactions.

Le comportement du système peut être décrit par l'équation polynomiale du second ordre suivante :

$$Y = a_0 + a_R x_R + a_V x_V + a_{RV} x_R x_V + a_{RR} x_R^2 + a_{VV} x_{2V}^2$$

Où :

- Y est la valeur de la réponse,
- a_0 est la valeur de la réponse au centre du domaine expérimental,
- a_R et a_V sont les coefficients linéaires,
- a_{RV} est le coefficient d'interaction,
- a_{RR} et a_{VV} sont les coefficients quadratiques,
- x_R et x_V sont les valeurs codées des deux variables indépendantes.

Le calcul des coefficients du modèle du deuxième degré reliant les coordonnées codées correspondant au *ratio* liquide-solide R et à la vitesse de rotation des vis V aux réponses est effectué de la façon suivante :

La matrice de Doehlert modifiée est définie comme suit :

$$Matrice\ de\ Doehlert\ modifiée = \begin{bmatrix} -0{,}240 & 0{,}000 \\ 0{,}774 & 0{,}000 \\ 0{,}921 & 0{,}866 \\ -0{,}701 & 0{,}866 \\ -1{,}131 & 0{,}000 \\ -0{,}841 & -0{,}866 \\ 0{,}742 & -0{,}866 \\ -0{,}314 & 0{,}000 \\ 0{,}014 & 0{,}000 \end{bmatrix}$$

Le calcul des coefficients quadratiques est effectué par l'opération matricielle suivante :

$$a = \begin{bmatrix} a_0 \\ a_R \\ a_V \\ a_{RV} \\ a_{RR} \\ a_{VV} \end{bmatrix} = (X^T X)^{-1} X^T Y$$

Où Y est la matrice des réponses et X la matrice résultant de la multiplication entre les colonnes de la matrice de Doehlert modifiée dans l'ordre suivant : 1, colonne 1, colonne 2, colonne 1 * colonne 2, (colonne 1)², (colonne 2)² :

$$X = \begin{bmatrix} 1 & -0{,}240 & 0{,}000 & 0{,}000 & 0{,}058 & 0{,}000 \\ 1 & 0{,}774 & 0{,}000 & 0{,}000 & 0{,}599 & 0{,}000 \\ 1 & 0{,}921 & 0{,}866 & 0{,}798 & 0{,}848 & 0{,}750 \\ 1 & -0{,}701 & 0{,}866 & -0{,}607 & 0{,}491 & 0{,}750 \\ 1 & -1{,}131 & 0{,}000 & 0{,}000 & 1{,}278 & 0{,}000 \\ 1 & -0{,}814 & -0{,}866 & 0{,}705 & 0{,}663 & 0{,}750 \\ 1 & 0{,}742 & -0{,}866 & -0{,}642 & 0{,}550 & 0{,}750 \\ 1 & -0{,}314 & 0{,}000 & 0{,}000 & 0{,}099 & 0{,}000 \\ 1 & 0{,}014 & 0{,}000 & 0{,}000 & 0{,}000 & 0{,}000 \end{bmatrix}$$

Enfin, les incertitudes sur les coefficients quadratiques sont calculées par l'opération matricielle suivante :

$$\sigma = \sqrt{\sigma_r^2 diag\left({}^t XX \right)^{-1}}$$

Les modélisations des réponses en utilisant l'équation quadratique comme une fonction des variables codées donnent :

$$Y_{Stev} = 0{,}359(\pm 0{,}007) + 0{,}107(\pm 0{,}006)x_R - 0{,}019(\pm 0{,}007)x_V - 0{,}002(\pm 0{,}009)x_R x_V - 0{,}082(\pm 0{,}011){x_R}^2 + 0{,}032(\pm 0{,}011){x_V}^2$$

$$Y_{RebA} = 0{,}350(\pm 0{,}013) + 0{,}128(\pm 0{,}011)x_R - 0{,}026(\pm 0{,}013)x_V + 0{,}001(\pm 0{,}016)x_R x_V - 0{,}069(\pm 0{,}021){x_R}^2 + 0{,}017(\pm 0{,}021){x_V}^2$$

Annexe 3

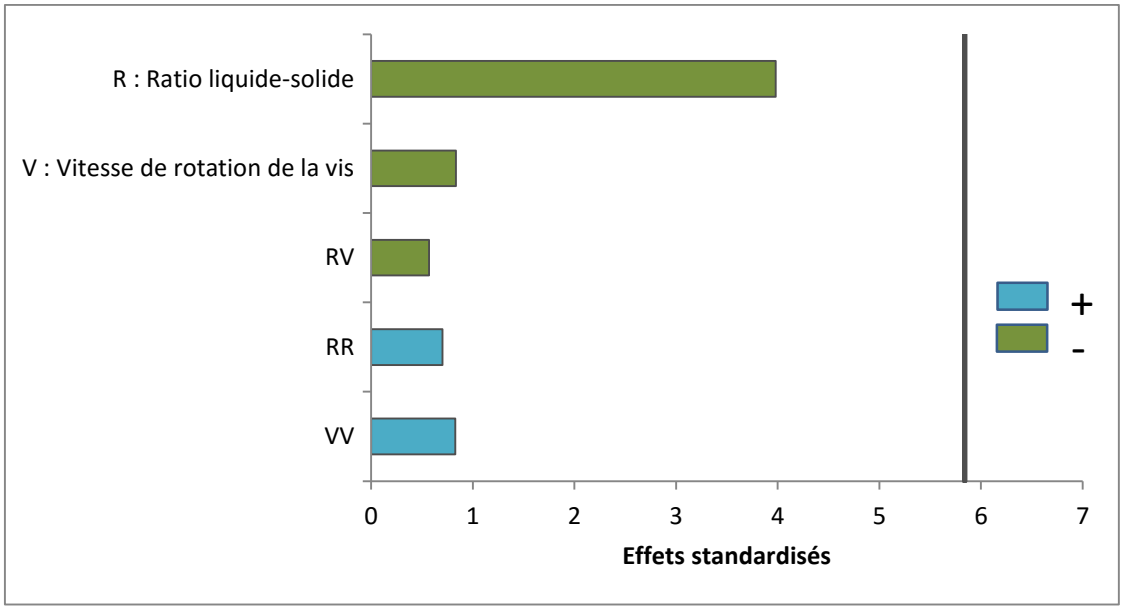
Les valeurs des teneurs en matières sèches des raffinats sont présentées dans le tableau suivant :

Exp	R (kg/kg)	V (tr/min)	Y_{MS}
1	5,7	7,5	34%
2	9,2	7,5	27%
3	9,7	13,5	29%
4	4,0	13,5	34%
5	2,5	7,5	37%
6	3,6	1,5	35%
7	9,1	1,5	32%
8	5,4	7,5	33%
9	6,6	7,5	26%

La modélisation des réponses en utilisant l'équation quadratique comme une fonction des variables codées donne :

$$Y_{MS} = 0{,}306(\pm 0{,}012) - 0{,}040(\pm 0{,}010)x_R - 0{,}010(\pm 0{,}012)x_V - 0{,}009(\pm 0{,}015)x_R x_V + 0{,}014(\pm 0{,}019){x_R}^2 + 0{,}016(\pm 0{,}020){x_V}^2$$

Et le diagramme de Pareto standardisé montrant l'effet des différents coefficients des facteurs sur les valeurs de teneur en matière sèche du raffinat (les barres dépassant la ligne verticale sur le graphe indiquent que les coefficients des facteurs correspondants sont significatifs (p < 0,05)) est le suivant :



Bibliographie

Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A. and Abu-Salem, M. F. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertoni plant. *African Journal of Food Science* 4 (5): 269–281.

AFNOR. 1986. Huiles essentielles : recueil de normes françaises. *Receuil de normes françaises*: 474.

AFSSA. 2008. *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) relatif à une autorisation provisoire, pour une durée de deux ans, d'emploi de stéviol, extraits de* Stevia rebaudiana*, en tant qu'édulcorant en alimentation humaine dans le cadre de l'article 5 de la directive 89/107/CEE, à la suite de l'avis Afssa du 12 octobre 2007. Saisine 2008-SA-0108*. Maisons-Alfort, .

AFSSA. 2009. *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (AFSSA) sur un projet d'arrêté relatif à l'emploi de rébaudioside A extrait de* Stevia rebaudiana *en tant qu'additif alimentaire. Saisine 2009-SA-0119*. Maisons-Alfort, .

Alupului, A., Calinescu, I. and Lavric, V. 2009. Ultrasonic vs. Microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. *AIDIC Conference Series* 9: 1–8.

ANSES. 2011. *Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) relatif au projet d'arrêté relatif modifiant l'arrêté du 26 août 2009 relatif à l'emploi de rébaudioside A extrait de* Stevia rebaudiana *en tant qu'additif alimentaire*. Maisons-Alfort, .

Aschenbrenner, A.-K., Horakh, S. and Spring, O. 2013. Linear glandular trichomes of Helianthus (Asteraceae) - Morphology, localization, metabolite activity and occurrence. *AoB Plants*: plt028.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. and Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117 (4): 426–436.

Baker, D. 1977. Determining fiber in cereals. *Cereal Chemistry* 54 (2): 360–365.

Barba, F. J., Grimi, N. and Vorobiev, E. 2015. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Journal of Food Engineering* 149: 222–228.

Bernards, M. A. and Lewis, N. G. 1992. Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. *Phytochemistry* 31 (10): 3409–3412.

Bondarev, N. I., Sukhanova, M. A., Reshetnyak, O. V. and Nosov, A. M. 2003. Steviol Glycoside Content in Different Organs of *Stevia rebaudiana* and Its Dynamics during Ontogeny. *Biologia Plantarum* 47 (2): 261–264.

Bondarev, N. I., Sukhanova, M. A., Semenova, G. A., Goryaeva, O. V., Andreeva, S. E. and Nosov, A. M. 2010. Morphology and ultrastructure of trichomes of intact and in vitro plants of stevia rebaudiana Bertoni with reference to biosynthesis and accumulation of steviol glycosides. *Moscow University biological sciences bulletin* 65 (1): 12–16.

Bowes, B. G. and Mauseth, J. D. 2012. *Structure des plantes*. Editions Quae.

Braidwood, L., Breuer, C. and Sugimoto, K. 2014. My body is a cage: mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytologist* 201 (2): 388–402.

Brandle, J. E. and Telmer, P. G. 2007. *Stevia rebaudiana* biosynthesis. *Phytochemistry* 68 (14): 1855–1863.

Brandle, J. E., Starratt, A. N. and Gijzen, M. 1998. *Stevia rebaudiana* : Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science* 78 (4): 527–536.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 28 (1): 25–30.

Bridel, M. and Lavieille, R. 1931. Sur le principe sucré des feuilles de Kaa-he-e (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences*: 1123–1125.

Buchholz, A. 2006. Characterization of the diffusion of non-electrolytes across plant cuticles: properties of the lipophilic pathway. *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2501–2513.

Campos, R. 2012. Stevia in the field - Challenges. *In*: *Stevia: 6 Months beyond Authorisation*, 61–70. J. M. C. Geuns.

Can Baser, K. H. and Buchbauer, G. 2009. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. .

Carakotas, M., Prakash, I., Kinghorn, A. D., Wu, C. D. and Soejarto, D. D. 2011. Steviol glycosides. *In*: *Alternative Sweeteners, Fourth Edition*, 159–180. Lyn O'Brien-Nabors, New York.

De Carvalho, V. M., Marochio, C. A., Mangolin, C. A. and da Silva Machado, M. de F. P. 2011. The use of esterase polymorphism for analysis of the genetic diversity and structure of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert. Bertoni) populations. *Biochemical Systematics and Ecology* 39 (4–6): 594–599.

Cassab, G. I. 1998. PLANT CELL WALL PROTEINS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 281–309.

Celhay, C. 2013. Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi- vis et étude des conditions subcritiques.Thèse : Science des Agroressources, Toulouse INPT, 317pp.

Cerda-Garcia-Rojas, C. m. and Pereda-Miranda, R. 2002. The phytochemistry of *Stevia*: a general survey. *In*: Stevia*, the Genus* Stevia, 86–118. A. D. Kinghorn.

Ceunen, S. and Geuns, J. M. C. 2013. Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism, and Function. *Journal of Natural Products* 76 (6): 1201–1228.

Chabot, S. 2013. Improved *Stevia rebaudiana* extract and formulation, and uses thereof. .

Chase, M. W. and Reveal, J. L. 2009. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 (2): 122–127.

Chemat, F. 2011. *Eco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs*. Paris, .

Choi, Y. H., Kim, I., Yoon, K. D., Lee, S. J., Kim, C. Y., Yoo, K.-P., Choi, Y.-H. and Kim, J. 2002. Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana* leaves. *Chromatographia* 55 (9-10): 617–620.

Cioni, P. L., Morelli, I., Andolfi, L., Macchia, M. and Ceccarini, L. 2006. Qualitative and Quantitative Analysis of Essential Oils of Five Lines *Stevia rebaudiana* Bert. Genotypes Cultivated in Pisa (Italy). *Journal of Essential Oil Research* 18 (1): 76–79.

Collin, S. and Crouzet, J. 2011. *Polyphénols et procédés: Transformation des polyphénols au travers des procédés appliqués à l'agro-alimentaire*. Lavoisier, .

Commission of the European Communities. 2000. Commission decision of 22 February 2000 refusing the placing on the market of *Stevia rebaudiana*: plants and dried leaves as a novel food or novel food ingrdient under regulation (EC) No 285/97 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Communities* L 61: 14.

Cosgrove, D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (11): 850–861.

Cosgrove, D. J. and Jarvis, M. C. 2012. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Frontiers in Plant Science* 3: 204.

Crammer, B. and Ikan, R. 1987. Progress in the chemistry and properties of rebaudiosides. *In*: *Developments in Sweeteners 3*, 45. Grenby T. H., New York.

Criado, M. N., Civera, M., Martínez, A. and Rodrigo, D. 2015. Use of Weibull distribution to quantify the antioxidant effect of *Stevia rebaudiana* on oxidative enzymes. *LWT - Food Science and Technology* 60 (2, Part 1): 985–989.

Dacome, A. S., da Silva, C. C., da Costa, C. E. M., Fontana, J. D., Adelmann, J. and da Costa, S. C. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. *Process Biochemistry* 40 (11): 3587–3594.

Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology* 23 (2): 174–181.

Das, A., Golder, A. K. and Das, C. 2014. Enhanced extraction of rebaudioside-A: Experimental, response surface optimization and prediction using artificial neural network. *Industrial Crops and Products* In press.

Ding, B., Turgeon, R. and Parthasarathy, M. V. 1992. Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* 169 (1-2): 28–41.

Dixon, R. A. and Harrison, M. J. 1990. Activation, structure, and organization of genes involved in microbial defense in plants. *Advances in Genetics* 28: 165–234.

Doehlert, D. H. 1970. Uniform Shell Designs. *Journal of the Royal Statistic Society* 19 (3): 231–239.

Dreywood, R. 1946. Qualitative Test for Carbohydrate Material. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 18 (8): 499–499.

DuBois, G. E. and Stephenson, R. A. 1985. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of stevioside analogs with improved organoleptic properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 28 (1): 93–98.

Eichert, T. and Burkhardt, J. 2001. Quantification of stomatal uptake of ionic solutes using a new model system. *Journal of Experimental Botany* 52 (357): 771–781.

Eichert, T. and Goldbach, H. E. 2008. Equivalent pore radii of hydrophilic foliar uptake routes in stomatous and astomatous leaf surfaces--further evidence for a stomatal pathway. *Physiologia Plantarum* 132 (4): 491–502.

Erel, S. B., Karaalp, C., Bedir, E., Kaehlig, H., Glasl, S., Khan, S. and Krenn, L. 2011. Secondary metabolites of Centaurea calolepis and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharmaceutical Biology* 49 (8): 840–849.

Erkucuk, A., Akgun, I. H. and Yesil-Celiktas, O. 2009. Supercritical CO2 extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids* 51 (1): 29–35.

Espinoza, M. I., Vincken, J.-P., Sanders, M., Castro, C., Stieger, M. and Agosin, E. 2014. Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed Stevia rebaudiana commercial extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (49): 11797–11804.

European Commission. 2011. Commission Regulation (EU) No 1131/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council with regard to steviol glycosides. *Official Journal of the European Union* L295: 205–211.

Evon, P. 2008. Nouveau procédé de bioraffinage du tournesol plante entière par fractionnement thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis : étude de l'extraction aqueuse des lipides et

de la mise en forme du raffinat en agromatériaux par thermomoulage.Thèse : Science des Agroressources, Toulouse INPpp.

Faso, C., Boulaflous, A. and Brandizzi, F. 2009. The plant Golgi apparatus: last 10 years of answered and open questions. *FEBS letters* 583 (23): 3752–3757.

Faye, M. 2010. *Nouveau procédé de fractionnement de la graine de Neem (Azadirachta Indica A. Jussi) sénégalais : production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau*. Downloaded from http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00001527/ on 12 June 2015.

FDA. 2008a. Whole Earth Sweetener Company GRAS Notification for Rebaudioside A. *GRAS notification* (252).

FDA. 2008b. Cargill GRAS Notification for Rebaudioside A. *GRAS Notification* (253).

Fernandez, V., Sotiropoulos, T. and Brown, P. 2013. *Foliar Fertilization: Scientific Principles and Field Practices*. Paris (France), .

Frémeaux, P. and Leybros, J. 1990a. Extraction solide-liquide. Aspects théoriques. *Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires - Génie de la réaction chimique* (réf. article j2780).

Frémeaux, P. and Leybros, J. 1990b. Extraction solide-liquide. Techniques et appareillage. *Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires - Génie de la réaction chimique* (réf. article j2782).

Geuns, J. M. . 2010. *Stevia and steviol glycosides*. Geuns J. M. C., Heverlee, Belgium, .

Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A. and Chattopadhyay, S. 2007. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana*(Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (26): 10962–10967.

Giovanetto, R. H. 1990. Method for the recovery of steviosides from plant raw material. .

Goyal, S. K., Samsher and Goyal, R. K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 61 (1): 1–10.

GRASS Expert Panel. 2012. DAEPYUNG Co. GRAS assessment of glucosylated steviol glycosides STEVITEN RICH. .

Gunning, B. E. S. and Overall, R. L. 1983. Plasmodesmata and Cell-to-Cell Transport in Plants. *BioScience* 33 (4): 260–265.

Hachez, C., Besserer, A., Chevalier, A. S. and Chaumont, F. 2013. Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends in Plant Science* 18 (6): 344–352.

Hajihashemi, S. and Geuns, J. M. C. 2013. Free radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana*. *Free Radicals and Antioxidants* 3, Supplement: S34–S41.

Hawes, C., Kiviniemi, P. and Kriechbaumer, V. 2015. The endoplasmic reticulum: a dynamic and well-connected organelle. *Journal of Integrative Plant Biology* 57 (1): 50–62.

Heller, R., Esnault, R. and Lance, C. 2004. *Physiologie végétale - Tome 1 Nutrition*. .

Hellfritsch, C., Brockhoff, A., Stähler, F., Meyerhof, W. and Hofmann, T. 2012. Human Psychometric and Taste Receptor Responses to Steviol Glycosides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (27): 6782–6793.

Herrero, M., Cifuentes, A. and Ibañez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* 98 (1): 136–148.

Herzi, N. 2013. Extraction et purification de substances naturelles : comparaison de l'extraction au CO2-supercritique et des techniques conventionnelles.Thèse de doctorat, INP Toulouse, 185pp.

H. Everett, T. 1980. *The New York Botanical Garden Illustrated Encylopedia of Horticulture*. Vol. 10. Taylor & Francis, .

Hijazi, M., Velasquez, S. M., Jamet, E., Estevez, J. M. and Albenne, C. 2014. An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Frontiers in Plant Science* 5.

Hohmann, B. 1978. Botanisch warenkundliche Diagnostik von Stevia rebaudiana (Bertoni) Hemsl., einer sussstofffliefernden Pflanze. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*.

Hopkins, W. G. 2003. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur, .

Hossain, M. S., Alam, M., Asadujjaman, M., Islam, M. M., Rahman, M. A., Islam, M. and Islam, A. 2011. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of different fractions of *Stevia rebaudiana* leaves in alloxan induced diabetic rats. *International Jounarl of Pharmaceutical Sciences and Research* 2 (7): 1722–1729.

Ibrahim, N. A., El-Gengaihi, S., Motawe, H. and Riad, S. A. 2006. Phytochemical and biological investigation of *Stevia rebaudiana* Bertoni; 1-labdane-type diterpene. *European Food Research and Technology* 224 (4): 483–488.

Jahan, I. A., Mostafa, M., Hossain, H., Nimmi, I., Sattar, A., Alim, A. and Moelz, S. M. I. 2010. Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. leaves from Bangladesh. *Bangladesh Pharm. J.* 13 (2): 67–75.

Jaitak, V., Bandna, B. S. and Kaul, V. K. 2009. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochemical Analysis* 20 (3): 240–245.

Jakinovich, W., Moon, C., Choi, Y.-H. and Kinghorn, A. D. 1990. Evaluation of Plant Extracts for Sweetness Using the Mongolian Gerbil. *Journal of Natural Products* 53 (1): 190–195.

JECFA. 2000. Fifty-first Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *Evaluation of Certain Food Additives*.

Jeffree, C. E. 1986. The cuticle, epicuticular waxes and trichomes of plants, with reference to their structure, functions and evolution. *In*: *Insects and the Plant Surface*, Adward Arnold, London.

Jeffree, C. E. 2006. The Fine Structure of the Plant Cuticle. *In*: Riederer, rkus and Müller, C. (eds.), *Annual Plant Reviews Volume 23: Biology of the Plant Cuticle*, 11–125. Blackwell Publishing Ltd.

Jentzer, J.-B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L. and Vilarem, G. 2015. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry* 166: 561–567.

Joglekar, A. M. and May, A. T. 1987. Product excellence trhough design of experiments. *Cereal Foods World* 32: 857–868.

Joint FAO/ WHO Expert Comittee on Food Additives (JECFA). 2008. FAO JECFA Monographs 5, 69th Meeting. *Compedium of Food Additive Specifications*: 75–78.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 2010. FAO JECFA Monographs 10, 73rd Meeting. *Compedium of Food Additive Specifications*: 17–22.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2004. Addendum 12, 63rd Meeting. *Compedium of Food Additive Specifications*: 47–48.

Karunasena, H. C. P., Gu, Y. T., Brown, R. J. and Senadeera, W. 2015. Numerical investigation of plant tissue porosity and its influence on cellular level shrinkage during drying. *Biosystems Engineering* 132: 71–87.

Kassing, M., Jenelten, U., Schenk, J. and Strube, J. 2010. A New Approach for Process Development of Plant-Based Extraction Processes. *Chemical Engineering & Technology* 33 (3): 377–387.

Kaushik, R., Narayanan, P., Vasudevan, V., Muthukumaran, G. and Usha, A. 2010. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food Science and Technology* 47 (1): 27–33.

Kennelly, E. J. 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. *In*: Stevia*, the Genus* Stevia, 68–85. Kinghorn A. D.

Kessler, D. and Baldwin, I. T. 2007. Making sense of nectar scents: the effects of nectar secondary metabolites on floral visitors of Nicotiana attenuata. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 49 (5): 840–854.

Khattab, S. N., Massoud, M. I., Jad, Y. E.-S., Bekhit, A. A. and El-Faham, A. 2015. Production and physicochemical assessment of new stevia amino acid sweeteners from the natural stevioside. *Food Chemistry* 173: 979–985.

Kienle, U. 1992. Method of making a natural sweetener based on *Stevia rebaudiana*, and use thereof. Brevet CA2025040 A1. .

Kim, I.-S., Yang, M., Lee, O.-H. and Kang, S.-N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology* 44 (5): 1328–1332.

Kinghorn, A. D. 2002. Overview. *In*: *Stevia, the Genus Stevia*, 1–17. Kinghorn A. D., London.

Kinghorn, A. D. and Soejarto, D. D. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. *In*: *Economics and Medicinal Plant Research*, Vol. 1, 1–52. H. Wagner, H. Hikino, N.R. Farnsworth, London.

Kinghorn, A. D., Soejarto, D. D., Nanayakkara, N. P. D., Compadre, C. M., Makapugay, H. C., Hovanec-Brown, J. M., Medon, P. J. and Kamath, S. K. 1984. A Phytochemical Screening Procedure for Sweet Ent-Kaurene Glycosides in the Genus *Stevia*. *Journal of Natural Products* 47 (3): 439–444.

Kitagawa, M., Paultre, D. and Rademaker, H. 2015. Intercellular communication via plasmodesmata. *New Phytologist* 205 (3): 970–972.

Kjeldahl, J. 1883. A new method for the estimation of nitrogen in organic compounds. *Journal of Analytical Chemistry* 22: 366.

Kobayashi, M., Horikawa, S., H. Degrandi, I., Ueno, J. and Mitsuhashi, H. 1977. Dulcosides A and B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 16 (9): 1405–1408.

Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. and Tanaka, O. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 15 (6): 981–983.

Korobko, N. V., Turko, Y. A., Shokun, V. V., Chernyak, E. N., Pokrovskii, L. M., Smetankina, O. N., Kerimzhanova, B. F. and Baltaev, U. A. 2008. GC-MS investigations. II. Lipid composition of *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 44 (3): 359–360.

Kovylyaeva, G. I., Bakaleinik, G. A., Strobykina, I. Y., Gubskaya, V. I., Sharipova, R. R., Al'fonsov, V. A., Kataev, V. E. and Tolstikov, A. G. 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 43 (1): 81–85.

Kroyer, D. G. 2010. Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 5 (2): 225–229.

Laberche, J.-C. 2010. *Biologie végétale*. Dunod, .

Lata, H., Chandra, S., Wang, Y. H., Raman, V. and Khan, I. A. 2013. TDZ-Induced High Frequency Plant Regeneration through Direct Shoot Organogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni: An Important Medicinal Plant and a Natural Sweetener. *American Journal of Plant Sciences* 04 (01): 117–128.

Lee, J.-Y. and Lu, H. 2011. Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in Plant Science* 16 (4): 201–210.

Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. and Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry* 132 (3): 1121–1132.

Lewis. 1992. Notes on Economic Plants. *Economic Botany* 46: 336–337.
Lewis, W. K. 1916. LABORATORY AND PLANT: THE PRINCIPLES OF COUNTER-CURRENT EXTRACTION. *Journal of Industrial & Engineering Chemistry* 8 (9): 825–833.
Li, S., Li, W., Xiao, Q. and Xia, Y. 2013a. Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase. *Food Chemistry* 138 (2–3): 2064–2069.
Liu, J., Ong, C. P. and Li, S. F. Y. 1997. Subcritical Fluid Extraction of Stevia Sweeteners from *Stevia rebaudiana*. *Journal of Chromatographic Science* 35 (9): 446–450.
Liu, J., Li, J. and Tang, J. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioproducts Processing* 88 (2–3): 215–221.
Li, X., Luu, D.-T., Maurel, C. and Lin, J. 2013b. Probing plasma membrane dynamics at the single-molecule level. *Trends in Plant Science* 18 (11): 617–624.
Lorenzo, C., Serrano-Díaz, J., Plaza, M., Quintanilla, C. and Alonso, G. L. 2014. Fast methodology of analysing major steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* 157: 518–523.
Lucas, W. J., Ding, B. and Schoot, C. van der. 1993. Tansley Review No. 58. Plasmodesmata and the Supracellular Nature of Plants. *New Phytologist* 125 (3): 435–476.
Maeshima, M. 2001. TONOPLAST TRANSPORTERS: Organization and Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 469–497.
Marcotte, M., Toupin, C. J. and Le Maguer, M. 1991. Mass transfer in cellular tissues. Part I: The mathematical model. *Journal of Food Engineering* 13 (3): 199–220.
Markovic, I., Djarmati, Z. and Abramovic, B. 2008. Chemical composition of leaf extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown experimentally in Vojvodina. *Journal of the Serbian Chemical Society* 73 (3): 283–297.
Martelli, A., Frattini, C. and Chialva, F. 1985. Unusual essential oils with aromatic properties—I. Volatile components of Stevia rebaudiana bertoni. *Flavour and Fragrance Journal* 1 (1): 3–7.
Martini, A., Tavarini, S., Macchia, M., Benelli, G., Romano, D., Canale, A. and Angelini, L. G. 2015. Floral phenology, insect pollinators and seed quality of 36 genotypes of *Stevia rebaudiana* Bert. cultivated in Italy. *In*: *Stevia: Growth in Knowledge and Taste*, 13–26. S. Ceunen & J. M. C. Geuns.
Marty, F. 1999. Plant Vacuoles. *The Plant Cell* 11 (4): 587–599.
Maurel, C. and Chrispeels, M. J. 2001. Aquaporins. A Molecular Entry into Plant Water Relations. *Plant Physiology* 125 (1): 135–138.
Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.-T. and Santoni, V. 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59: 595–624.
McGarvey, B. D., Attygalle, A. B., Starratt, A. N., Xiang, B., Schroeder, F. C., Brandle, J. E. and Meinwald, J. 2003. New Non-Glycosidic Diterpenes from the Leaves of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products* 66 (10): 1395–1398.
Mizutani, K. and Tanaka, O. 2002. Use of *Stevia rebaudiana* in Japan. *In*: Stevia*, the Genus* Stevia, 178–195. Kinghorn A. D.
Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E. M. F., Lherminier, J. and Simon-Plas, F. 2010. Membrane rafts in plant cells. *Trends in Plant Science* 15 (12): 656–663.
Monteiro, W. R., Castro, M. D. M., Mazzoni-Viveiros, S. C. and Mahlberg, P. G. 2001. Development and some histochemical aspects of foliar glandular trichomes of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bert. - Asteraceae. *Brazilian Journal of Botany* 24 (3): 349–357.

Monteiro, W. R., Caldeira, W., Castro, M. de M., Mahlberg, P. G. and Cruz, M. V. 2003. Ultrastructural observations on foliar glandular trichomes of Stevia rebaudiana. *South African Journal of Botany* 69 (4): 489–499.

Morita, T., Fujita, I. and Iwamura, J. 1978. Plant extract from *Stevia rebaudiana*. Brevet US4082858 A.

Mosettig, E., Beglinger, U., Dolder, F., Lichti, H., Quitt, P. and Waters, J. A. 1963. The Absolute Configuration of Steviol and Isosteviol. *Journal of the American Chemical Society* 85 (15): 2305–2309.

Muanda, F. N. 2010. Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques.Thèse : Chimie Organique, Paul Verlaine, Metz, 160pp.

Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B. and Dicko, A. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Science and Technology* 44 (9): 1865–1872.

Musa, A., Miao, M., Zhang, T. and Jiang, B. 2014. Biotransformation of stevioside by Leuconostoc citreum SK24.002 alternansucrase acceptor reaction. *Food Chemistry* 146: 23–29.

Mustafa, A. and Turner, C. 2011. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Analytica Chimica Acta* 703 (1): 8–18.

N'Diaye, S. and Rigal, L. 2000. Factors influencing the alkaline extraction of poplar hemicelluloses in a twin-screw reactor: correlation with specific mechanical energy and residence time distribution of the liquid phase. *Bioresource Technology* 75 (1): 13–18.

Nieto, A., Borrull, F., Pocurull, E. and Marcé, R. M. 2010. Pressurized liquid extraction: A useful technique to extract pharmaceuticals and personal-care products from sewage sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29 (7): 752–764.

Nourredine, B. 1995. Extraction des huiles essentielles en continu à l'aide d'un réacteur thermo-mécano-chimique BC45.INP Toulouse.

Nultsch, W. 1998. *Botanique générale*. De Boeck Supérieur.

De Oliveira, A. J. B., Cordeiro, L. M. C., Gonçalves, R. A. C., Ceole, L. F., Ueda-Nakamura, T. and Iacomini, M. 2013. Structure and antiviral activity of arabinogalactan with (1→6)-β-D-galactan core from Stevia rebaudiana leaves. *Carbohydrate Polymers* 94 (1): 179–184.

De Oliveira, A. J. B., Gonçalves, R. A. C., Chierrito, T. P. C., dos Santos, M. M., de Souza, L. M., Gorin, P. A. J., Sassaki, G. L. and Iacomini, M. 2011. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry* 129 (2): 305–311.

De Oliveira, B. H., Packer, J. F., Chimelli, M. and de Jesus, D. A. 2007. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of Gibberella fujikuroi. *Journal of Biotechnology* 131 (1): 92–96.

Oliveira, V. M. de, Forni-Martins, E. R., Magalhães, P. M. and Alves, M. N. 2004. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 27 (2): 215–222.

Oparka, K. J. and Roberts, A. G. 2001. Plasmodesmata. A Not So Open-and-Shut Case. *Plant Physiology* 125 (1): 123–126.

Oparka, K. J., Roberts, A. G., Boevink, P., Cruz, S. S., Roberts, I., Pradel, K. S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. and Epel, B. 1999. Simple, but Not Branched, Plasmodesmata Allow the Nonspecific Trafficking of Proteins in Developing Tobacco Leaves. *Cell* 97 (6): 743–754.

Orosco, I. 1998. Extraction et caractérisation des pigments naturels présents dans diverses plantes mexicaines.INP Toulouse.

Oshima, Y., Saito, J. and Hikino, H. 1986. Sterebins A, B, C and D, bisnorditerpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. *Tetrahedron* 42 (23): 6443–6446.

Oshima, Y., Saito, J.-I. and Hikino, H. 1988. Sterebins E, F, G and H, diterpenoids of *Stevia rebaudiana* leaves. *Phytochemistry* 27 (2): 624–626.

Özkan, G. and Ersus Bilek, S. 2015. Enzyme-assisted extraction of stabilized chlorophyll from spinach. *Food Chemistry* 176: 152–157.

Pasquel, A., Meireles, M. A. A., Marques, M. O. M. and Petenate, A. J. 2000. Extraction of stevia glycosides with CO2 + water, CO2 + ethanol, and CO2 + water + ethanol. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 17 (3): 271–282.

Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A. and Escriche, I. 2015. Influence of Extraction Methods on the Yield of Steviol Glycosides and Antioxidants in *Stevia rebaudiana* Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*.

Persinos, G. 1973. Method of producing stevioside. Brevet US3723410 A. .

Poirot, R. 2007. Méthodologie pour le passage en continu d'extraction de soluté à partir de matière végétale.Thèse : Génie des Procédés et Environnement, INP, Toulouse.

Pól, J., Ostrá, E. V., Karásek, P., Roth, M., Benešová, K., Kotlaříková, P. and Čáslavský, J. 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (8): 1847–1857.

Prat, L., Guiraud, P., Rigal, L. and Gourdon, C. 1999. Two phase residence time distribution in a modified twin screw extruder. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 38 (1): 73–83.

Puri, M., Sharma, D. and Tiwari, A. K. 2011. Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnology Advances* 29 (6): 781–791.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. and Tiwary, A. K. 2012. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry* 132 (3): 1113–1120.

Rai, C., Majumbar, G. C. and De, S. 2012. Optimization of Process Parameters for Water Extraction of Stevioside using Response Surface Methodology. *Separation Science and Technology* 47 (7): 1014–1022.

Rao, A. B., Prasad, E., Sridhar, G. R. S. and Ravikumar, Y. V. L. 2012. Simple extraction and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 03 (04): 327–335.

Richman, A. S., Gijzen, M., Starratt, A. N., Yang, Z. and Brandle, J. E. 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 19 (4): 411–421.

Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N. and Pohl, C. 1996. Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. *Analytical Chemistry* 68 (6): 1033–1039.

Robert, D. and Catesson, A.-M. 2000. *Organisation végétative*. Wolters Kluwer France.

Roberts, A. G. and Oparka, K. J. 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell & Environment* 26 (1): 103–124.

Robinson-Beers, K. and Evert, R. F. 1991. Fine structure of plasmodesmata in mature leaves of sugarcane. *Planta* 184 (3): 307–318.

Rodriguez, E., Towers, G. H. N. and Mitchell, J. C. 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry* 15 (11): 1573–1580.

Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D. and Cocero, M. J. 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering* 109 (1): 98–103.

Roustel, S., Chapet and Bouvier. 2000. Cuisson-extrusion des aliments. *Téchniques de l'Ingénieur. Opérations unitaires du génie industriel alimentaire* réf. article f3120.

Rubico, S. M. and McDaniel, M. R. 1992. Sensory evaluation of acids by free-choice profiling. *Chemical Senses* 17 (3): 273–289.

Ruiz Ruiz, J. C., Moguel Ordoñez, Y. B., Matus Basto, Á. and Segura Campos, M. R. 2014. Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana* Bertoni varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutricion Hospitalaria* 31 (3): 1163–1170.

Savita, S. M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A. G. and Kamakrishna, P. 2004. *Stevia rebaudiana* - A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology* 15 (4): 261–264.

Schönherr, J. 2006. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2471–2491.

Schreiber, L. 2006. Review of sorption and diffusion of lipophilic molecules in cuticular waxes and the effects of accelerators on solute mobilities. *Journal of Experimental Botany* 57 (11): 2515–2523.

Serio, L. 2010. La *Stevia rebaudiana*, une alternative au sucre. *Phytothérapie* 8 (1): 26–32.

Sheeja, R. and Lawrence, B. 2015. Phytochemical Screening of the Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 4 (3): 344–347.

Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F. and Kaul, V. K. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications* In press.

Sholichin, M., Yamasaki, K., Miyama, R., Yahara, S. and Tanaka, O. 1980. Labdane-type diterpenes from *Stevia rebaudiana* [leaves]. *Phytochemistry* 19 (2): 326–327.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V. K. and Shukla, S. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology* 47 (9): 2338–2343.

Siddique, A. B., Mizanur Rahman, S. M. and Hossain, M. A. 2012. Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Arabian Journal of Chemistry* In press.

Simeonov, E., Tsibranska, I. and Minchev, A. 1999. Solid–liquid extraction from plants — experimental kinetics and modelling. *Chemical Engineering Journal* 73 (3): 255–259.

Singer, S. J. 1972. A Fluid Lipid-Globular Protein Mosaic Model of Membrane Structure*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 195 (1): 16–23.

Singleton, V. L. and Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16 (3): 144–158.

Soejarto, D. D. 2002. Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. *In*: Stevia*, the Genus* Stevia, 18–39. Kinghorn A. D.

Van Soest, P. J. and Wine, R. H. 1967. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. 50: 50–55.

Van Soest, P. J. and Wine, R. H. 1968. Determination of lignin and cellulose in acid-detergent fiber with permanganate. *Journal of the A.O.A.C.* 51 (4): 780–785.

Sousa, R. M. F., de Morais, S. A. L., Vieira, R. B. K., Napolitano, D. R., Guzman, V. B., Moraes, T. S., Cunha, L. C. S., Martins, C. H. G., Chang, R., de Aquino, F. J. T., do Nascimento, E. A. and de Oliveira, A. 2015. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products* 65: 71–78.

Sovová, H., Komers, R., Kučera, J. and Jež, J. 1994. Supercritical carbon dioxide extraction of caraway essential oil. *Chemical Engineering Science* 49 (15): 2499–2505.

Speranza, A. and Calzonigi, G. L. 2005. *Atlas de la structure des plantes : Guide de l'anatomie microscopique des plantes vasculaires en 285 photos*. Paris (France), .

Stafford, H. A. 1959. Distribution of Tartaric Acid in the Leaves of Certain Angiosperms. *American Journal of Botany* 46 (5): 347–352.

Stahl, Y. and Simon, R. 2013. Gated communities: apoplastic and symplastic signals converge at plasmodesmata to control cell fates. *Journal of Experimental Botany*: ert245.

Steudle, E. and Frensch, J. 1996. Water transport in plants: Role of the apoplast. *Plant and Soil* 187 (1): 67–79.

Sun, J., Gu, R. and Yang, X. 2011. Method for ultrasonic extraction of stevioside. Brevet WO2011113373 A1. .

Tadhani, M. and Subhash, R. 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Sciences* 6 (3): 321–326.

Tadhani, M. B., Patel, V. H. and Subhash, R. 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis* 20 (3–4): 323–329.

Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. *Trends in analytical chemistry* 1 (11): 246–248.

Tanaka, O. 1997. Improvement of taste of natural sweeteners. *Pure and Applied Chemistry* 69 (4): 675–684.

Tateo, F., Bononi, M., Mariotti, M. G., Cornara, L. and Serrato-Valenti, G. 2001. Trichomes on vegetative and reproductive organs of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae). Structure and secretory products. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* 135 (1): 25–37.

Tatke, P. and Jaiswal, Y. 2011. An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research. *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (1): 21–31.

Tegelaar, E. W., Wattendorff, J. and de Leeuw, J. W. 1993. Possible effects of chemical heterogeneity in higher land plant cuticles on the preservation of its ultrastructure upon fossilization. *Review of Palaeobotany and Palynology* 77 (3–4): 149–170.

Tegelaar, E. W., de Leeuw, J. W., Largeau, C., Derenne, S., Schulten, H.-R., Müller, R., Boon, J. J., Nip, M. and Sprenkels, J. C. M. 1989. Scope and limitations of several pyrolysis methods in the structural elucidation of a macromolecular plant constituent in the leaf cuticle of Agave americana L. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 15: 29–54.

Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S. and Ong, E. S. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of Stevia rebaudiana Bertoni. *Journal of Separation Science* 32 (4): 613–622.

Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S. and Ong, E. S. 2010. Pressurized hot water extraction (PHWE). *Journal of Chromatography A* 1217 (16): 2484–2494.

Terry, B. R. and Robards, A. W. 1987. Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. *Planta* 171 (2): 145–157.

Tilney, L. G., Cooke, T. J., Connelly, P. S. and Tilney, M. S. 1991. The structure of plasmodesmata as revealed by plasmolysis, detergent extraction, and protease digestion. *The Journal of Cell Biology* 112 (4): 739–747.

Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X. and Adrian, M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Crop Science and Horticulture* 5: 592.

Turko, Y. A., Korobko, N. V., Shokun, V. V., Chernyak, E. N., Vyalkov, A. I., Stepankina, O. N., Kerimzhanova, B. F. and Baltaev, U. A. 2007. GC—MS research. I. Essential oil from Stevia rebaudiana*Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds* 43 (6): 744–745.

Vandenbossche, V., Brault, J., Vilarem, G. and Rigal, L. 2015. Bio-catalytic action of twin-screw extruder enzymatic hydrolysis on the deconstruction of annual plant material: Case of sweet corn co-products. *Industrial Crops and Products* 67: 239–248.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9: 161–169.

Wagner, H. 1979. Phenolic Compounds in Plants of Pharmaceutical Interest. *In*: Swain, T., Harbone, J. B. and Sumere, C. F. V. (eds.), *Biochemistry of Plant Phenolics*, Vol. 12, 589–616. Springer US.

Wang, G., Guo, Z. and Liu, W. 2014. Interfacial Effects of Superhydrophobic Plant Surfaces: A Review. *Journal of Bionic Engineering* 11 (3): 325–345.

Wang, L. and Weller, C. L. 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology* 17 (6): 300–312.

Wolinsky, J., Novak, R. and Vasileff, R. 1964. A Stereospecific Synthesis of (±)-Quinic Acid. *The Journal of Organic Chemistry* 29 (12): 3596–3598.

Wölwer-Rieck, U. 2012. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (4): 886–895.

Wölwer-Rieck, U., May, B., Lankes, C. and Wüst, M. 2014. Methylerythritol and Mevalonate Pathway Contributions to Biosynthesis of Mono-, Sesqui-, and Diterpenes in Glandular Trichomes and Leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (11): 2428–2435.

Wongkittipong, R., Prat, L., Damronglerd, S. and Gourdon, C. 2004. Solid–liquid extraction of andrographolide from plants—experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology* 40 (2): 147–154.

Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. and Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science* 91 (1): 1–27.

Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R. and Tanaka, O. 1976. Structures of stevia diterpene-glucosides : Application of 13C NMR. *Tetrahedron Letters* 17 (13): 1005–1008.

Yang, M., Hua, J. and Qin, L. 2011. High-purity rebaudioside A and method of extracting same. Brevet US7923541 B2. .

Ye, F., Yang, R., Hua, X., Shen, Q., Zhao, W. and Zhang, W. 2013. Modification of stevioside using transglucosylation activity of Bacillus amyloliquefaciens α-amylase to reduce its bitter aftertaste. *LWT - Food Science and Technology* 51 (2): 524–530.

Yildiz-Ozturk, E., Tag, O. and Yesil-Celiktas, O. 2014. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *The Journal of Supercritical Fluids* 95: 422–430.

Yoda, S. K., Marques, M. O. ., Petenate, A. J. and Meireles, M. A. A. 2003. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO2 and CO2+water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering* 57 (2): 125–134.

Zaffran, J. 1998. *Initiation à la biologie végétale*. *In Sciences de La Vie et de La Terre*. .

Zhang, S. Q., Kumar, A. and Kutowy, O. 2000. Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. *Food Research International* 33 (7): 617–620.

2012. *Stevia: 6 months beyond authorisation*. *In* Geuns, J. M. C. (ed.) *Proceedings of the Stevia Symposium*. J. M. C. Geuns.

2013. *Knowledge on tour in Europe*. *In* Geuns, J. M. C. (ed.) *Proceedings of the Stevia Symposium*. J. M. C. Geuns.

2015. *Stevia: Growth in knowlegde and taste*. *In* Geuns, J. M. C. and Ceunen, S. (eds.) *Proceedings of the Stevia Symposium*. S. Ceunen & J. M. C. Geuns.