HAL open science

Purification de jus extraits de feuilles de Stevia rebaudiana par précipitation de sels

Marie Cabanne, Maria Thereza Alves de Lima, Montaine Khezzane, Fabien Baillon, Cécile Hastoy, Philippe Boutie, Fabienne Espitalier

To cite this version:

Marie Cabanne, Maria Thereza Alves de Lima, Montaine Khezzane, Fabien Baillon, Cécile Hastoy, et al.. Purification de jus extraits de feuilles de Stevia rebaudiana par précipitation de sels. SFGP2022 - 18e Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Nov 2022, Toulouse, France. pp.05005, ⟨10.1051/matecconf/202337905005⟩. ⟨hal-04103384⟩

HAL Id: hal-04103384

https://imt-mines-albi.hal.science/hal-04103384v1

Submitted on 23 May 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Distributed under a Creative Commons CC BY 4.0 - Attribution - International License

Purification of juices extracted from Stevia rebaudiana leaves by salt precipitation

Marie CABANNE[1,2], Maria Thereza ALVES DE LIMA[1], Montaine KHEZZANE[1], Fabien BAILLON[1], Cécile HASTOY[2], Philippe BOUTIE[2], Fabienne ESPITALIER[1]

1 : Université de Toulouse, Centre RAPSODEE, CNRS UMR 5302, IMT Mines Albi, Albi, France.

2 : OVIATIS, Village Entreprises, Agen, France.

Abstract : Stevia rebaudiana is a perennial herbaceous plant, part of the Asteraceae family and native of Paraguay [1]. It has been cultivated in China and Southeast Asia for several decades [2] and more recently in France, in the Occitanie region. More commonly known as "Stevia", it is a new source of natural sweetener, since it contains steviol glycosides with a sweet taste. The objective of the work carried out is to develop a method of purification of juice extracted from Stevia rebaudiana leaves, pre-purified by various membrane filtration operations, supplied by the company OVIATIS. The objective is to increase the purity of steviol glycosides in these juices, by precipitating impurities such as quinic acid. These juices initially have a purity of 23 ± 2.5 g of glycosides/100 g of dry matter (ie 23%). The tests presented in this study make it possible to assess the impact of the addition of ethanol, whether or not combined with the addition of potassium or calcium hydroxide. The addition of ethanol to the juices leads to an increase in purity and makes it possible to reach a value of 32 ± 3%. By combining the addition of ethanol with the addition of calcium hydroxide, a purity greater than 50% is obtained. Indeed, for a calcium hydroxide ratio of 0.06, the purity reached a level of 56 ± 5% during the test.

© The Authors, published by EDP Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Purification de jus extraits de feuilles de *Stevia rebaudiana* par précipitation de sels

Marie CABANNE[1,2], Maria Thereza ALVES DE LIMA[1], Montaine KHEZZANE[1], Fabien BAILLON[1], Cécile HASTOY[2], Philippe BOUTIE[2], Fabienne ESPITALIER[1]

[1]Université de Toulouse, Centre RAPSODEE, CNRS UMR 5302, IMT Mines Albi, Albi, France.
[2]OVIATIS, Village Entreprises, Agen, France.

Résumé

Stevia rebaudiana est une plante herbacée vivace, faisant partie de la famille des Asteraceae et originaire du Paraguay [1]. Elle est cultivée en Chine et en Asie du sud-est depuis plusieurs décennies [2] et plus récemment en France, en région Occitanie. Plus communément appelée « Stévia », c'est une nouvelle source d'édulcorant naturel, puisqu'elle contient des glycosides de stéviol ayant un goût sucré. Le travail mené a pour objectif de développer une méthode de purification de jus extraits de feuilles de *Stevia rebaudiana*, pré-purifiés par différentes opérations de filtration membranaire, fournis par la société OVIATIS. L'objectif est d'augmenter la pureté des glycosides de stéviol dans ces jus, en faisant précipiter les impuretés tel que l'acide quinique. Ces jus possèdent initialement une pureté de 23 ± 2,5 g de glycosides/100 g de matières sèches (soit 23 %). Les essais présentés dans cette étude permettent d'évaluer l'impact de l'ajout d'éthanol, combiné ou non à un ajout d'hydroxyde de potassium ou calcium. L'ajout d'éthanol dans les jus entraine une augmentation de la pureté et permet d'atteindre une valeur de 32 ± 3 %. En combinant, l'ajout d'éthanol avec l'ajout d'hydroxyde de calcium, une pureté supérieure à 50 % est obtenue. En effet, pour un ratio d'hydroxyde de calcium de 0,06 la pureté a atteint, au cours de l'essai, un palier à 56 ± 5 %.

Introduction

Stevia rebaudiana est une plante herbacée vivace, faisant partie de la famille des Asteraceae et originaire du Paraguay [1]. Elle est cultivée en Chine et en Asie du sud-est depuis plusieurs décennies [2] et plus récemment en France, en région Occitanie. Plus communément appelée « Stévia », c'est une nouvelle source d'édulcorant naturel, puisqu'elle contient des glycosides de stéviol ayant un goût sucré. Ces molécules possèdent un pouvoir sucrant 300 fois supérieur au saccharose et ne sont pas caloriques. Les glycosides de stéviol majoritaires dans la plante sont le Stévioside (St) et le Rébaudioside A (RebA) [2]. Cependant, la présence d'un goût amer dans certains extraits réduit son acceptation et par conséquent freine son expansion sur le marché des édulcorants. Selon Pasquel Ruiz, 2000 [3] et Jentzer, 2015 [4], le goût amer est dû notamment à la présence de l'acide quinique et des huiles essentielles. Le travail mené a pour objectif de développer une méthode de purification basée sur l'élimination d'impuretés par précipitation, tout en préservant la teneur initiale en glycosides [5].

Abréviations

C_{St} : Concentration en stévioside
$C_{Reb\ A}$: Concentration en rébaudioside A
MS : Matière sèche

1. Matériels et méthodes

1.1 Infusions de feuilles de Stévia purifiées

Cette étude est réalisée sur des jus extraits de feuilles de *Stevia rebaudiana*, pré-purifiés par différentes étapes de filtration membranaire, fournis par la société OVIATIS. Les jus utilisés présentent une concentration en glycosides de stéviol (St et RebA) de 11 ± 0,8 g/100 g de solution, une matière sèche de 48 ± 3 %, donnant une pureté de 23 ± 2,5 g de glycosides/100 g de matières sèches. Une analyse par GCMS (Chromatographie Gazeuse couplée Spectromètre de Masse) de ces jus a montré que l'acide quinique ($C_7H_{12}O_6$) est l'un des principaux composants. Il représente plus de 50 % de la composition des composés organiques identifiés (Figure 1). Cet acide peut être éliminé en ajoutant de l'hydroxyde de potassium (KOH) ou de l'hydroxyde de calcium ($Ca(OH)_2$) afin de former des quinates, par exemple des quinates de potassium ($K(C_7H_{11}O_6)$) et de calcium ($Ca(C_7H_{11}O_6)_2$). Les quinates formés étant solubles dans l'eau, l'ajout d'anti-solvant (éthanol) est réalisé [5].

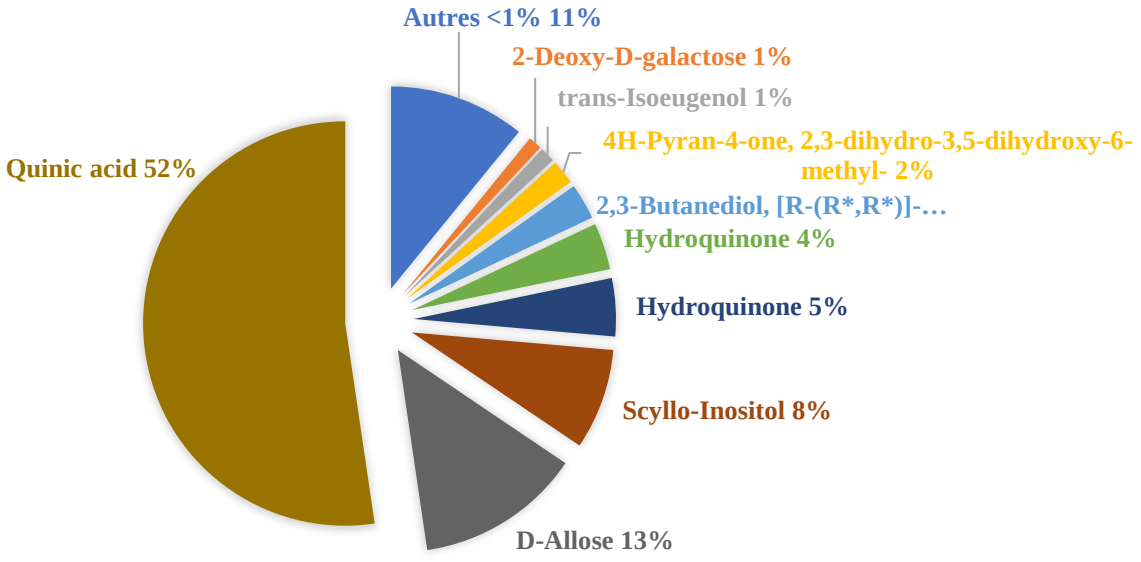

Figure 1 : Proportions des principaux composants identifiés par analyse GCMS

1.2 Réalisation des essais

Les expériences présentées dans cette étude sont réalisées à partir de 75 g de jus. À température ambiante, une masse connue de KOH ou de $Ca(OH)_2$ est ajoutée dans le jus. Initialement, les quantités d'hydroxyde à ajouter ont été déterminées en respectant les conditions stœchiométriques des équations de réaction suivantes :

(1) $Ca(OH)_{2\,solide} + 2(C_7H_{12}O_6) \rightarrow Ca(C_7H_{11}O_6)_{2\,solide} + 2\,H_2O$

(2) $KOH_{\,solide} + C_7H_{12}O_6 \rightarrow K(C_7H_{11}O_6)_{\,solide} + H_2O$

Puis, différentes concentrations en hydroxyde ont été testées. En effet, les plages de rapport molaire acide quinique/hydroxyde varient de 1,3 à 5 pour le KOH et de 1 à 34 pour $Ca(OH)_2$. Cette solution est agitée pendant 1 heure et un prélèvement est réalisé toutes les 20 minutes.

Les quinates formés étant encore solubles dans le milieu et insolubles dans l'éthanol, une cristallisation par effet anti-solvant a été menée. Afin de déterminer la quantité optimale d'éthanol à ajouter des ajouts progressifs (15 g) d'éthanol sont réalisés au cours de l'essai. Un temps d'attente de 1 heure est réalisé entre deux ajouts afin que l'équilibre solide-liquide soit atteint et un prélèvement est effectué pour analyse. En fin d'essai, la suspension obtenue est filtrée sur Büchner.

Des concentrations en hydroxyde allant de 0,2 à 6 % massiques ont été testées. La concentration en Stévioside et Rébaudioside A, ainsi que la teneur en matière sèche, sont déterminées pour tous les échantillons prélevés.

1.3 Analyses

1.3.1 Concentration en glycosides de stéviol

La concentration en glycosides de stéviol (Stévioside et Rébaudioside A) est mesurée par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). La colonne utilisée est une colonne Zorbax Carbohydrate 5 µm (150 × 4,6 mm) et la phase mobile est composée de 70 % d'acétonitrile et de 30 % d'eau (v/v). Un détecteur UV à une longueur d'onde de 205,4 nm est utilisé. Avant l'analyse, l'échantillon est dilué avec une solution à 70 % d'acétonitrile et 30 % d'eau (m/m) avec un ratio échantillon/solution de 1/20 (m/m). Après dilution, l'échantillon est filtré avec un filtre seringue en polypropylène 0,22 µm.

1.3.2 Matières sèches

La teneur en matières sèches dissoutes dans les échantillons prélevés est mesurée par dessiccateur infrarouge à 110 °C. Les échantillons sont préalablement filtrés à l'aide d'un filtre seringue, en polypropylène 0,22 µm.

La teneur en matières sèches est donnée par l'équation (1).

$$\mathrm{MS}(\%) = 100 - \left(\frac{\text{masse échantillon humide} - \text{masse échantillon sec}}{\text{masse échantillon humide}} \times 100\right) \quad \text{(Eq. 1)}$$

La pureté des glycosides de stéviol en solution est calculée selon l'équation (2) :

$$\text{Pureté}(\%) = \frac{C_{St} + C_{RebA}\ (\text{g/géchantillon})}{\text{MS (g/géchantillon)}} \times 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

2. Résultats et discussions

Dans les résultats présentés par la suite, les quantités d'hydroxyde et d'éthanol au cours des essais sont définies par les ratios suivants :

$$\text{RatioEtOH} = \frac{\text{masse EtOH}_{\text{total}}(\text{g})}{\text{masse de jus de stévia purifié}_{\text{t}}(\text{g})}$$

$$\text{Ratio hydroxyde} = \frac{\text{masse KOH ou Ca(OH)}_{2_{\text{t}}}(\text{g})}{\text{masse de jus de stévia purifié}_{\text{t}}(\text{g})}$$

2.1 Influence de l'ajout d'éthanol

Afin de vérifier l'impact de l'ajout d'éthanol sur le jus de stévia purifié, un essai est réalisé dans les mêmes conditions sans la première étape d'ajout d'hydroxyde.

La Figure 2, présentant l'évolution de la pureté en fonction des ajouts d'éthanol, permet d'observer que l'ajout d'éthanol dans le jus de stévia entraine une augmentation de la pureté de cette solution. En fin d'essai, pour un ratio d'éthanol de 1,2 une pureté de 32 ± 3 % est obtenue. Au cours de l'essai, de fines particules en suspension sont observées dans la solution lors des premiers ajouts d'éthanol. En fin d'essai, 5,7 g ± 0,2 g de sels précipités secs sont obtenus (soit 7,6 g /100 g de jus). Cependant, le solide est non exploitable. En effet, il est très collant et ne se dissout pas dans les solvants, ce qui rend sa caractérisation difficile.

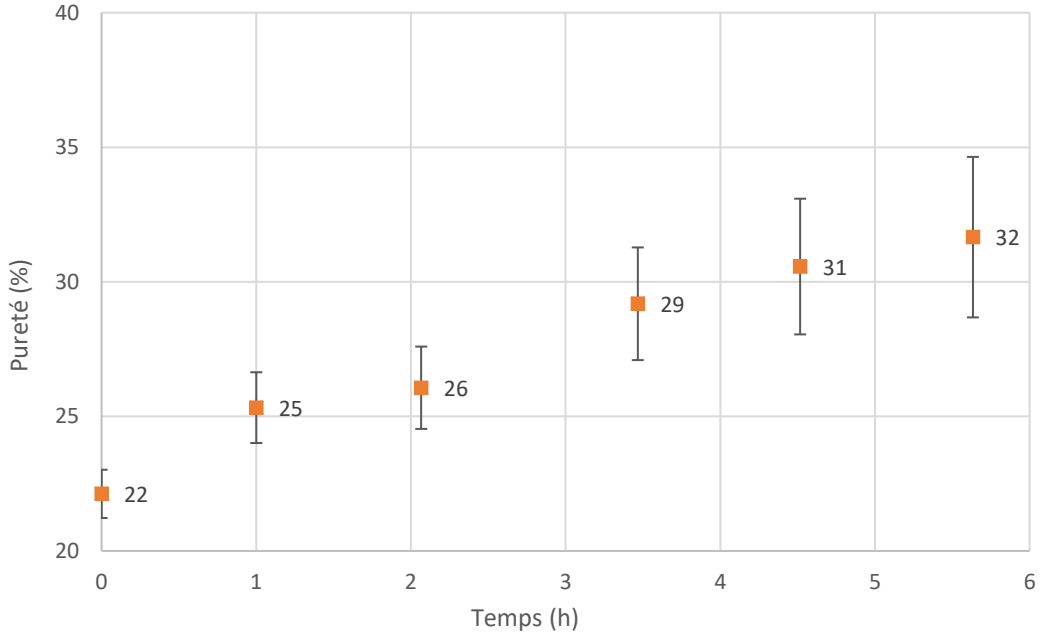

Figure 2 : Représentation graphique de l'évolution de la pureté en fonction des ajouts d'éthanol dans le jus de stévia
1er ajout d'éthanol : t 0 - Ratio d'éthanol : 1 heure = 0,2 ; 2h04 = 0,5 ; 3h28 = 0,7 ; 4h31 = 1 ; 5h38 = 1,2

2.2 Influence de l'ajout d'hydroxyde de calcium et d'éthanol

La Figure 3, présente l'évolution de la pureté au cours des essais réalisés avec des ratios d'hydroxyde de calcium allant de 0,002 à 0,06. Lors des 4 essais, la pureté de la solution reste constante avec l'ajout d'hydroxyde de calcium et augmente avec l'ajout d'éthanol. Pour les ratios d'hydroxyde de calcium de 0,002 et 0,01, l'augmentation de la pureté est proche de l'augmentation de pureté engendrée par l'ajout d'éthanol uniquement. Cependant, l'augmentation du ratio d'hydroxyde de calcium entraine l'augmentation de la pureté de la solution. Des ratios d'hydroxyde de calcium de 0,06 et d'éthanol de 1,2 permettent d'atteindre des puretés supérieures à 50 %. Les ajouts d'éthanol ont été poursuivis pour les essais avec les ratios d'hydroxyde de 0,03 et 0,06 et ont permis de constater que les valeurs des puretés se stabilisent après respectivement 6,9 h (pureté 39 ± 4 %) et 6,5 h (pureté 56 ± 5 %) (Tableau 1). De plus, une reproduction d'un point de l'essai avec un ratio d'hydroxyde de calcium de 0,06 a permis de confirmer une valeur de pureté supérieure à 50 %. Le filtrat obtenu a été séché par atomisation et la poudre obtenue suite à cette étape possède une pureté 52 ± 11 %. Les rendements théoriques en glycosides de stéviol pour tous les essais se situent entre 87 et 100 %.

Tableau 1 : Evolution de la pureté lors des ajouts supplémentaires d'éthanol

0,03 $Ca(OH)_2$	**Temps (h)**	**6,9**	**7,9**	**8,9**	**9,9**	**10,9**	**11,9**	**12,9**	**Moyenne**
	Ratio éthanol	1,22	1,67	2,1	2,57	3,04	3,54	4,06	
	Pureté (%)	44	38	47	38	36	36	36	39 ± 4
0,06 $Ca(OH)_2$	**Temps (h)**	**5,4**	**6,5**	**7,5**	**8,5**	**10,5**	**11,5**		
	Ratio éthanol	0,96	1,22	1,69	2,21	3,26	3,82		
	Pureté (%)	51	54	55	54	52	52		53 ± 5

Le graphique présenté en Figure 4, permet de visualiser plus clairement l'évolution de la pureté obtenue en fin d'essai en fonction du ratio d'hydroxyde de calcium utilisé. Les valeurs de pureté présentées correspondent à la moyenne du palier obtenu à la fin de chaque essai. Les masses de sels précipités secs obtenus à la fin des essais sont bien supérieures à la masse d'hydroxyde de calcium introduite en début d'essai, elles sont comprises entre 4,5 et 14,4 g (soit entre 6 et 19,2 g / 100g). Cependant, le séchage des solides doit être amélioré afin d'affiner les résultats.

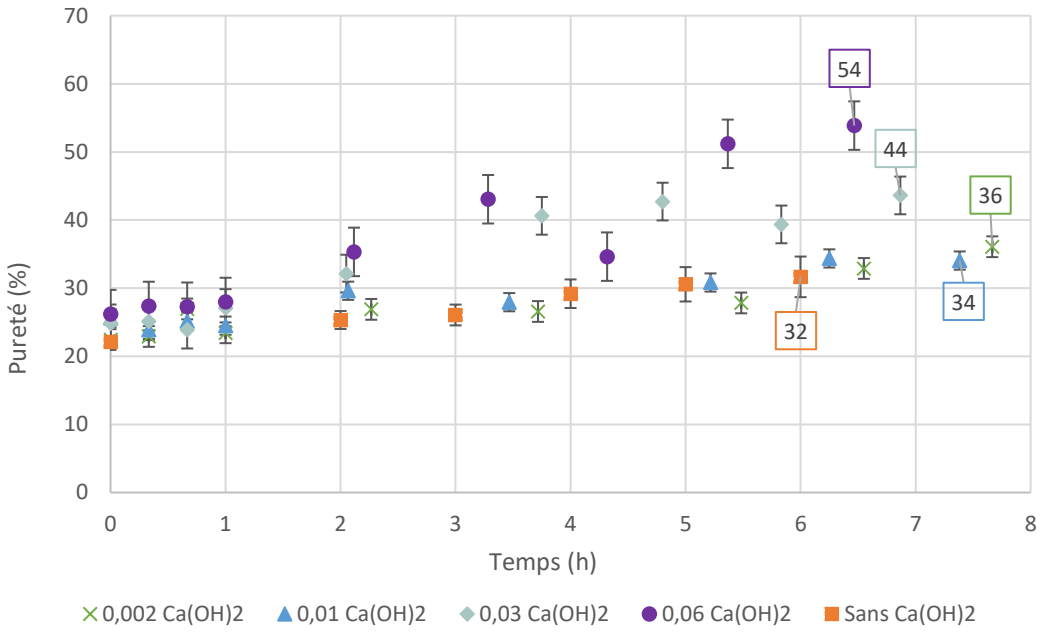

Figure 3 : Représentation graphique de l'évolution de la pureté au cours des essais réalisés à différents ratios d'hydroxyde de calcium et avec ajout d'éthanol uniquement (sans $Ca(OH)_2$)
Ajout de $Ca(OH)_2$ à t = 0 – 1er ajout d'éthanol à t = 1 heure – 1er ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,2 ; 2ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,5 ; 3ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,7 ; 4ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 1 ; 5ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 1,2

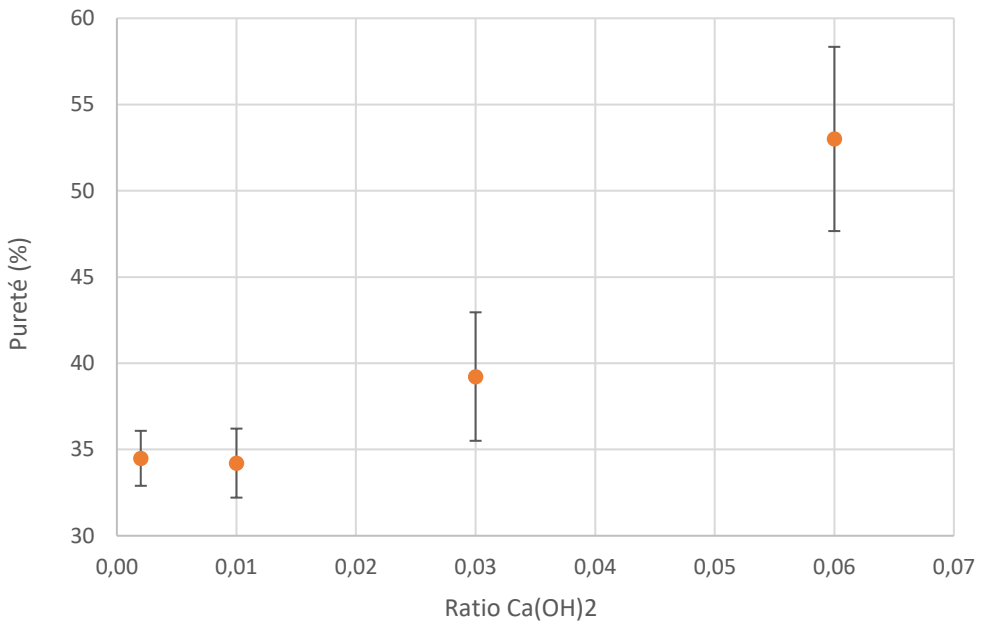

Figure 4 : Représentation graphique de la pureté obtenue en fin d'essai en fonction du ratio d'hydroxyde de calcium – Les valeurs de pureté correspondent à la moyenne du palier obtenu à la fin de chaque essai

2.3 Influence de l'ajout d'hydroxyde de potassium et d'éthanol

La Figure 5, présente l'évolution de la pureté de la solution au cours du temps d'essai, pour les essais réalisés avec des ratios d'hydroxyde de potassium de 0,01 et de 0,04. Lors des 2 essais, la pureté de la solution reste constante après l'ajout d'hydroxyde de potassium et augmente après les ajouts d'éthanol. L'ajout d'hydroxyde de potassium seul n'a pas d'impact visible sur la solution, tandis que l'ajout d'éthanol après l'hydroxyde de potassium entraine la formation de précipités visibles et une augmentation de la pureté de la solution. L'ajout d'éthanol a donc un impact positif sur la formation de précipités du fait de la diminution de la solubilité de ce sel en présence d'éthanol. Les quantités de précipités récupérés à la fin des essais sont de 6 g ± 0,2 g (soit 8 g /100 g de jus) pour le ratio d'hydroxyde de potassium de 0,01 et 14 g ± 0,4 g (soit 18,7 g /100 g de jus) pour le ratio de 0,04. Les masses de sels précipités secs obtenus en fin d'essai sont bien supérieures à la masse d'hydroxyde de potassium introduite en début d'essai. De plus, les évolutions de pureté au cours des essais avec ou sans KOH sont très proches et l'augmentation du ratio d'hydroxyde n'a pas d'impact sur la pureté finale. En effet, pour les essais avec un ratio d'hydroxyde de 0,01 et de 0,04, les puretés finales sont respectivement de 34 ± 3 % et 36 ± 4 %. Le KOH ne semble pas avoir d'impact positif sur l'augmentation de la pureté. Les rendements théoriques en glycosides de stéviol au cours des essais se situent également entre 87 % et 100 %.

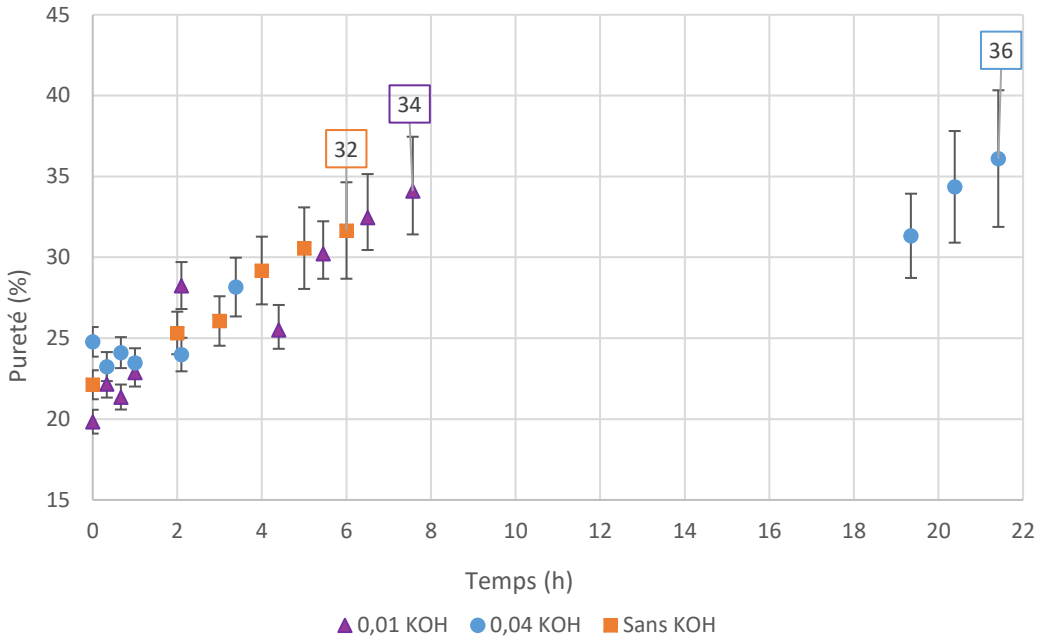

Figure 5 : Représentation graphique de l'évolution de la pureté au cours des essais réalisés à différents ratio d'hydroxyde de potassium et avec ajout d'éthanol uniquement (sans KOH)
Ajout de KOH à t = 0 - 1er ajout d'éthanol à t = 1 heure – 1er ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,2 ; 2ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,5 ; 3ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,7 ; 4ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 1 ; 5ème ajout d'éthanol ratio EtOH = 1,2

Conclusion

Les résultats présentés montrent l'impact positif de l'ajout d'éthanol, avec ou sans ajout d'hydroxyde, sur l'augmentation de la pureté de la solution. La combinaison de l'ajout d'hydroxyde de potassium et de l'éthanol ne permet pas d'atteindre des valeurs de puretés supérieures à celles obtenues avec l'éthanol uniquement. La combinaison de l'ajout d'hydroxyde de calcium et d'éthanol, pour les ratios d'hydroxyde les plus élevés, permet d'obtenir une augmentation importante de la pureté de la solution et présente les meilleurs résultats obtenus au cours de ces essais. Un ratio d'hydroxyde de calcium de 0,06 permet d'obtenir des solutions ayant des puretés supérieures à 50 % (56 ± 5 %) à partir de jus de stévia. L'hydroxyde de calcium est donc plus adapté pour la précipitation des impuretés présentes dans ces jus de stévia.

Afin de compléter ces travaux, il est envisagé de réaliser une caractérisation des précipités formés, afin d'identifier leur nature, et de suivre par une méthode analytique l'évolution de la quantité d'acide quinique dans la solution au cours d'un essai. Ce suivi permettrait de vérifier l'impact de ces étapes sur cette molécule.
Ensuite, une étape de carbonatation à la fin de l'essai peut être envisagée, afin d'éliminer l'hydroxyde de calcium par précipitation.
De plus, un essai de cristallisation de la solution ayant une pureté supérieure à 50 % peut maintenant être envisagé.

Références bibliographiques

[1] J. Lui, J. Li, and J. Tang, "Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from Stevia rebaudiana Bertoni and identification of extracts," Food and Bioproducts Processing, vol. 88, pp. 215–221, 2010.

[2] C. Hastoy, "Caractérisation de la variabilité phénotypique de ressources génétiques de Stevia rebaudiana (Bertoni) : analyse des composantes du rendement et critères de sélection en condition de production," 2021.

[3] A. Pasquel, M. A. A. Meireles, M. O. M. Marques, and A. J. Petenate, "Extraction of stevia glycosides with CO2+water, Co2+éthanol, and CO2+water+ethanol," *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 17, pp. 1–16, 2000.

[4] J. B. Jentzer, "Etude d'un procédé d'extraction en continu des glycosides de stéviol à partir des feuilles de Stévia (Stevia Rebaudiana Bertoni)," 2015.

[5] J. Liebig, *Traité de chimie organique, tome deuxième*. Paris: Librairie de Fortin, Masson et C, 1842.