



Université
de Toulouse

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 :
Dorothee COLAS

le : jeudi 29 mars 2012

Titre :
Etude de la bioraffinerie des plantes vertes :
Application au fractionnement des protéines de luzerne par extrusion bi-vis et
chromatographie hydrophobe

JURY

Mme Maria Aurora FERNANDEZ (Professeur, INSA, Toulouse)
Mme Marie de LAMBALLERIE-ANTON (Professeur, ONIRIS, Nantes)
M. Carlos VACA-GARCIA (Professeur, ENSIACET, Toulouse)

Ecole doctorale :
Sciences de la Matière (SDM)

Unité de recherche :
Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA) - UMR 1010 INRA/INP-ENSIACET

Directeur(s) de Thèse :
M. Luc RIGAL (Ingénieur de Recherche HDR, INP-ENSIACET, Toulouse)
M. Pierre-Yves PONTALIER (Maître de Conférences HDR, INP-ENSIACET, Toulouse)

Rapporteurs :
Mme Isabelle CHEVALOT (Professeur, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy)
M. Jean-Louis LANOISELLE (Professeur, Université de Bretagne Sud, IUT Lorient)

« Le commencement de toutes les sciences, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont. »

-Aristote-

« On fait la science avec des faits, comme on fait une maison avec des pierres : mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison »

-Henri Poincaré-

REMERCIEMENTS

Ces années passées à Toulouse en thèse n'auront certes pas été de tout repos, avec le stress des résultats pas toujours probants voire décevants, la découverte d'une nouvelle ville, le déménagement du laboratoire vers de nouveaux locaux, les congrès scientifiques... Mais ce que je retiendrai de ces années, ce seront avant tout les rencontres humaines, facteur primordial pour toujours aller de l'avant, le sourire aux lèvres. C'est pour cela que je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant accompagnée, de près ou de loin, dans le cadre et en dehors du laboratoire.

En premier lieu, je voudrais remercier l'ensemble des membres du jury de thèse. Merci à M. Jean-Louis Lanoisellé et à Mme Isabelle Chevalot d'avoir accepté de rapporter la thèse, et de m'avoir fait part de vos remarques. J'ai grandement apprécié l'intérêt que vous avez apporté à mon sujet. Merci ensuite à Mme de Lamballerie-Anton d'avoir accepté de faire partie du jury, d'être venue de Nantes spécialement pour l'occasion, pour montrer que la recherche est compatible avec le cursus ONIRIS (ex-Enitiaa). Merci à Mme Fernandez, pour toutes les discussions tout au long du projet Produluz, en espérant que le fonctionnement d'un extrudeur vous semble maintenant plus clair. Merci enfin à M. Vaca-Garcia, non seulement pour avoir accepté de présider le jury de thèse, mais aussi pour son accueil chaleureux, en tant que directeur du Laboratoire de Chimie-Agro-Industrielle.

Ensuite, un grand merci à mes directeurs de thèse. Je tiens à remercier Luc Rigal, grâce à sa vision d'ensemble du projet, a permis de toujours proposer de nouvelles pistes à explorer. Merci à Pierre-Yves Pontalier d'avoir toujours été là pour faire ressortir du positif dans mes résultats, de m'avoir fait confiance, de m'avoir conseillée et aidée tout au long de la thèse, depuis l'accueil au laboratoire jusqu'à la correction à un rythme soutenu du manuscrit.

Je voudrais à présent remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Chimie Agro-Industrielle, toujours prêt à rendre service. Didier, Emmanuelle, Isabelle, Anne, Marie-Christine, grâce à leur gentillesse et à leur promptitude à aider les gens, m'auront permis de ne pas me sentir complètement perdue par moments, que ce soit dans l'organisation pratique au laboratoire, ou dans les aspects administratifs. Je tiens en outre à remercier ceux qui m'auront aidé sur le projet : merci Géraldine de m'avoir prêté sa colonne et appris à me servir de Chromeleon, merci à Joël Albet pour son aide sur la modélisation, et bien entendu, un immense merci à Cathy pour ses précieux conseils et pour avoir effectué tous les essais d'extrusion à mes côtés, malgré nos doigts verts et congelés. Je n'oublierai jamais ces moments partagés. Enfin, merci aux stagiaires qui ont partagé pour un temps mes journées de manipulation : Xavier, Emilie, Delphine et Guillaume.

La thèse, c'est aussi le partage de ses expériences, le soutien en toutes circonstances, et les rires libérateurs avec les autres thésards. J'en arrive donc maintenant à remercier la joyeuse bande des doctorants du laboratoire.

Louise, je ne trouverai pas les mots pour te remercier suffisamment pour avoir toujours été là pour moi. Au bureau, pour relâcher la pression (merci pour la décoration du bureau en période de Noël), après le boulot pour tous les moments vécus : excursions inoubliables au ski, dans les Landes, en Espagne,... Je sais qu'il y aura encore bien d'autres souvenirs à rajouter à la liste.

Romain, le chouchou, merci pour toutes tes catchphrases faisant désormais partie de mon vocabulaire (« on voit les galets »...), pour la découverte de Bayonne by night. J'espère que tu me tiendras au courant des développements futurs de la série à suspense du labo : les pieds de R².

Sylvain, merci pour tout ce que j'ai appris grâce à toi et QPUC ou TLMVPSP ! Comme quoi l'humour et la culture peuvent faire un mélange détonnant. J'espère qu'on continuera longtemps à partager des discussions sur Robin Hobb, le cinéma et autres anecdotes croustillantes.

Alla, notre pâtissière officielle, bonne fée du bureau 2-a2-23. Merci pour ta gentillesse et tes sourires. J'espère qu'on aura l'occasion de se faire d'autres soirées Koh Lanta !

Anaïs, merci pour tes blagounettes et pour les moments gossip. Merci de m'avoir fait découvrir Juanito. Ma vie ne sera plus jamais la même depuis que j'ai vu ses photos.

Bassam, on ne peut pas dire que notre amitié aura suivi un long fleuve tranquille... Je te remercie pour tous les moments de fous rires ou de débats passionnés autour d'un café, mon petit Bassoum

Manon, zumbettes power. Merci maman Manon, pour ton humour et ta gaieté pétillante. Tu portes le orange comme aucune autre !

Elodie, même si tu étais à Tarbes, ça ne nous a pas empêchées de tisser des liens au cours de la thèse, et je te remercie pour les moments qu'on a passés ensemble, notamment cette randonnée mémorable dans les Pyrénées. Merci à toi et Guillaume de m'avoir supportée !

Clément, merci de m'avoir fait rire et d'avoir initié la recherche de sosies. Tu es la preuve que les Cléments n'ont pas besoin d'avoir un sèche-cheveux pour être chouettes.

Nicoleta, notre autre bonne fée de l'ex « bureau des filles ». Merci pour tes conseils et toutes tes petites attentions du quotidien.

William, merci pour ton rire communicatif et ta gentillesse. Je ne peux pas voir des gens manger des ribs sans penser à toi !

Jean-François, merci pour les cours de piano, nous serons bientôt prêts pour le concert, il ne reste qu'à réserver le Zénith.

Merci aux garçons du bureau 2-a2-23, autrefois en forte minorité : Christian et Alex, et aux derniers arrivés, Bastien et Assad, qui ont montré qu'ils savaient maintenir une ambiance joyeuse (bien que studieuse).

Il est important également de remercier les « anciens » thésards, qui nous ont tout de suite accueillis et mis dans l'ambiance du laboratoire : Lupita, Emilie, Matthieu S., Julien.

Enfin, je voudrais remercier certaines personnes que je connais moins bien, mais avec qui j'ai néanmoins passé d'excellents moments : Zaher (merci pour les grandes discussions philosophiques), Candice, Pauline, Matthieu, Julien, Cédric, Hussein.

Il est impossible de ne pas penser aux personnes côtoyées à l'extérieur du laboratoire, qui sont pourtant indissociables de cette période particulière qu'aura été ma thèse.

Mes pensées vont tout d'abord vers Laurie et Tessa, dont j'ai fait la connaissance au LCA, et qui sont devenues des amies très chères à l'extérieur. Merci les filles d'avoir supporté mes états d'âmes et ma parano. Je ne doute pas que de nombreuses soirées filles mémorables auront encore lieu, emplies de rire, de larmes, et d'Ace of Base.

Je voudrais ensuite remercier l'équipe de choc des anciens éniens, qui sont la preuve que lorsque des liens forts se sont créés, ils perdurent.

Clément, il ne fait aucun doute que c'est toi qui a le plus subi ma mauvaise humeur, mes réflexions sur les matrices et les portraits chinois. Pourtant, tu m'as toujours répondu avec humour, philosophie et métaphores. Merci, vraiment.

Sitraka, âme sœur certifiée par le Dalaï Lama. Merci pour tes nombreux conseils et sache que malgré l'existence du trophée de la Pouffe d'or et tous mes efforts, je ne t'arriverai jamais à la cheville.

Sophie, princesse de Lumière et du nihon tai jitsu. Merci pour ton accueil, dans ton palace où on doit se déplacer en trottinette. Et n'oublie pas : qui aime bien châtie bien.

Ludivine, super instit bretonne. Merci de ton amitié et de tes pensées positives. Les soirées à papoter me manquent, vivement notre petit week-end !

Fanny, binômette forever et co-témoin. Grâce à toi, j'ai appris une expression chinoise, et surtout, le langage du 9-3 !

Bruno, le pro de la Lap Dance. On n'oubliera pas ce moment, tu peux en être certain.

Chacha, merci pour tes textos rares mais précieux qui me feront toujours rire.

Elodie, même si on ne se voit que bien trop rarement, je sais que tu restes la même, une tornade d'énergie et d'amitié.

Finalement, mes remerciements les plus émus vont à ma famille. Vous m'avez vue partir pour Toulouse, en vous demandant pourquoi je décidais de partir si loin. Vous m'avez vue revenir pour des week-ends et des vacances, toujours trop courts, plus ou moins fatiguée. Mais vous avez toujours été là, vous m'avez toujours supportée et soutenue. Merci infiniment.

Merci à ceux qui ont fait le déplacement jusque Toulouse pour la soutenance : Evelyne, Patrick, Martine (un immense merci pour toute l'aide apportée, tout au long de ces années), Nicole. Merci à ma grand-mère, qui a fait ce long voyage fatigant pour venir m'écouter parler des heures.

Papa, pour l'amour et la confiance que tu m'apportes, ta grenouillette te remercie.

Merci maman, pour l'amour et le soutien indéfectibles à mon égard. Merci pour les plats congelés glissés dans ma valise le dimanche soir, et pour accepter de suivre nos idées et envies d'aller visiter les pays nordiques.

Mon dernier merci va à ma petite sœur Floriane. Merci Florichou, pour ta jolie photo des nodules racinaires de la luzerne. Merci d'avoir été la seule à t'intéresser à mon sujet de thèse, d'être venue de Stockholm pour une simple soutenance, la valise pleine de roulés à la cannelle et d'avoir enduré un week-end entier avec mes amis. Tu es une petite sœur géniale !

« Il faut rire de tout. C'est extrêmement important. C'est la seule humaine façon de friser la lucidité sans tomber dedans. »

-Pierre Desproges-



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	- 1 -
INTRODUCTION GENERALE.....	- 3 -
CHAPITRE I : LA LUZERNE : UN EXEMPLE DE PLANTE POUVANT S'INTEGRER DANS UN CONCEPT DE BIORAFFINERIE	
SOMMAIRE	- 8 -
I. LA LUZERNE : UNE PLANTE FOURRAGERE.....	- 10 -
I.1. Biologie de la luzerne.....	- 10 -
I.2. Culture de la luzerne	- 13 -
I.2.1 Données géographiques et économiques	- 13 -
I.2.2 Evolution de la qualité de la luzerne au cours de sa croissance	- 14 -
I.2.3 Débouchés classiques de la culture de luzerne	- 17 -
I.2.4 Nouveaux axes de recherche et débouchés pour la luzerne	- 19 -
I.3. Composition chimique de la luzerne	- 20 -
I.3.1 Les protéines foliaires de la luzerne	- 20 -
I.3.2 Les autres constituants de la luzerne	- 28 -
I.4. Traitement de la luzerne	- 35 -
I.4.1 Déshydratation thermique de la luzerne	- 35 -
I.4.2 Traitement des jus verts de luzerne	- 36 -
I.4.3 Procédés de fractionnement de la plante	- 39 -
I.4.4 Utilisation des autres parties de la luzerne	- 40 -
I.4.5 Concept de bioraffinerie verte	- 42 -
II. OPERATIONS UNITAIRES UTILES AU FRACTIONNEMENT DE MATIERE VEGETALE.....	- 45 -
II.1. L'extrusion bi-vis	- 45 -
II.1.1 Présentation générale du procédé d'extrusion	- 45 -
II.1.2 Les éléments constitutifs de l'extrudeur bi-vis pour le traitement de la matière	- 47 -
II.1.3 Modularité et avantages de la technologie bi-vis	- 51 -
II.1.4 Intérêt de l'utilisation de la technologie bi-vis pour le traitement de matière végétale : exemple des travaux menés au LCA.....	- 52 -
II.2. Séparation membranaire	- 53 -
II.2.1 Les procédés de séparation membranaire	- 53 -
II.2.2 L'ultrafiltration	- 54 -

II.2.3	L'utilisation de la séparation membranaire pour le traitement d'extraits liquides de luzerne	- 63 -
II.3.	Chromatographie - fixation sur résine d'adsorption.....	- 64 -
II.3.1	Définition et principe	- 64 -
II.3.2	Chromatographie en phase liquide.....	- 64 -
II.3.3	Support solide : résines synthétiques	- 65 -
II.3.4	Mécanismes d'échanges	- 71 -
 CHAPITRE II : ETUDE DU FRACTIONNEMENT D'UN EXTRAIT VERT DE LUZERNE ET CARACTERISATION DES FRACTION		
 SOMMAIRE		
I. PRODUCTION DE L'EXTRAIT VERT RICHE EN PROTEINES		- 86 -
I.1.	Extraction des protéines de la luzerne par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement	- 86 -
I.1.1	Evaluation de la déshydratation de la luzerne.....	- 87 -
I.1.2	Evaluation de la composition de l'extrait vert	- 87 -
I.2.	Extraction des protéines de luzerne en réacteur agité.....	- 88 -
I.3.	Production d'extrait de luzerne par extrusion bi-vis	- 91 -
I.3.1	Caractérisation des lots de luzerne	- 91 -
I.3.2	Bilan de l'étape d'extraction des protéines lors de l'extrusion	- 92 -
I.4.	Caractérisation des extraits de luzerne.....	- 94 -
 II. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT VERT : SEPARATION LIQUIDE/SOLIDE .		- 96 -
II.1.	Influence de la vitesse de centrifugation	- 96 -
II.2.	Etude du traitement du jus à l'aide de détergents.....	- 97 -
II.3.	Bilan de l'étape de centrifugation	- 101 -
II.4.	Caractérisation des fractions protéiques	- 103 -
II.4.1	Composition des extraits	- 103 -
II.4.2	Composition en acides aminés.....	- 105 -
II.5.	Extraction de la chlorophylle	- 107 -
 III. DESCRIPTION DU PROCEDE DE FRACTIONNEMENT MIS EN ŒUVRE : TRAITEMENT DU JUS CLARIFIE PAR ULTRAFILTRATION		- 109 -
III.1.	Membrane de 30 kDa	- 110 -
III.2.	Membrane de 10 kDa	- 113 -

IV. CONCLUSIONS - 118 -

**CHAPITRE III : APPLICATION D'UN PROCEDE D'EXTRUSION BI-VIS POUR
L'EXTRACTION DES PROTEINES DE LUZERNE ET LA PRODUCTION D'UN EXTRAIT
VERT**

SOMMAIRE - 122 -

**I. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES DE L'EXTRUSION
SUR LE PRESSAGE ET L'EXTRACTION DES PROTEINES DE LUZERNE..... - 123 -**

I.1. Description des profils de vis testés..... - 123 -

I.2. Définition des plans d'expériences - 125 -

I.2.1 Essais préliminaires..... - 125 -

I.2.2 Définition des limites du plan d'expériences..... - 125 -

I.2.3 Préparation de la matière..... - 126 -

I.3. Extrusion en conditions de pressage dominant - 127 -

I.3.1 Déshydratation de la plante - 129 -

I.3.2 Extraction des protéines de luzerne..... - 132 -

I.4. Extrusion en conditions de cisaillement dominant - 136 -

I.4.1 Evaluation de la déshydratation de la luzerne..... - 138 -

I.4.2 Efficacité de l'extraction des protéines - 141 -

I.5. Comparaison des deux profils de vis..... - 144 -

**II. INFLUENCE DE LA CONFIGURATION DE L'EXTRUDEUR BI-VIS SUR LA QUALITE
DES FRACTIONS - 147 -**

**II.1. Comparaison des deux lots de luzerne : influence de la qualité de la matière végétale- 147
-**

II.2. Modification du profil de vis - 148 -

II.3. Influence du rapport liquide/solide sur la qualité des fractions..... - 149 -

II.3.1 Répétition du Profil 2 : influence de la matière végétale..... - 149 -

II.3.2 Contre-filets rapprochés du filtre : Profil 4..... - 154 -

II.3.3 Profil 5 : double zone de filtration - 160 -

II.4. Influence de la configuration de profil de vis - 167 -

III. CONCLUSIONS - 172 -

CHAPITRE IV : FRACTIONNEMENT DES PROTEINES PAR INTERACTIONS HYDROPHOBES

SOMMAIRE	- 176 -
I. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE DANS UN SOLVANT HYDROPHOBE.....	- 177 -
I.1. Etude des extractions sur solution synthétique	- 178 -
I.1.1 Sérum albumine bovine.....	- 178 -
I.1.2 Lysozyme	- 180 -
I.2. Etude de l'extraction liquide-liquide sur le jus centrifugé	- 182 -
I.3. Conclusions.....	- 183 -
II. SEPARATION DES PROTEINES PAR FIXATION SUR RESINE.....	- 184 -
II.1. Etude de la fixation des protéines du jus centrifugés sur les résines.....	- 184 -
II.2. Etudes cinétiques expérimentales	- 186 -
II.2.1 Sérum albumine bovine (BSA).....	- 186 -
II.2.2 Lysozyme	- 188 -
II.2.3 Conclusions	- 191 -
II.3. Isotherme de sorption.....	- 191 -
II.4. Conclusions.....	- 196 -
III. SEPARATION DES PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE.....	- 197 -
III.1. Cinétique de transfert	- 197 -
III.1.1 Description	- 197 -
III.1.2 Calcul des coefficients de diffusion	- 199 -
III.2. Cinétiques de sorption.....	- 202 -
III.2.1 Modèles cinétiques de sorption.....	- 202 -
III.2.1 Détermination expérimentale.....	- 203 -
III.3. Cinétique d'écoulement.....	- 205 -
III.3.1 Théorie de l'équilibre.....	- 205 -
III.3.2 Réacteur colonne : extraction des protéines de l'extrait centrifugé de luzerne.....	- 208 -
IV. CONCLUSIONS	- 212 -

CHAPITRE V : PARTIE EXPERIMENTALE

SOMMAIRE	- 214 -
I. DETERMINATIONS ANALYTIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES :	
CARACTERISATION DE LA MATIERE PREMIERE.....	- 216 -
I.1. Teneur en eau	- 216 -
I.2. Teneur en matières minérales et en matières organiques	- 216 -
I.3. Teneur en composés hydrosolubles.....	- 217 -
I.4. Dosage et caractérisation des protéines	- 217 -
I.4.1 Teneur globale en protéines	- 217 -
I.4.2 Séparation entre protéines « hydrophiles et protéines « hydrophobes ».....	- 218 -
I.4.3 Analyse de la composition en acides aminés des extraits.....	- 219 -
I.4.4 Quantification de la teneur en protéines d'extraits liquides par HPLC-UV	- 220 -
I.5. Détermination de la teneur en lipides	- 221 -
I.5.1 Détermination de la teneur en lipides totaux des échantillons solides	- 221 -
I.5.2 Détermination de la teneur en lipides totaux des échantillons liquides.....	- 222 -
I.6. Teneur en constituants pariétaux des solides	- 223 -
I.6.1 Attaque NDF.....	- 224 -
I.6.2 Attaques ADF	- 224 -
I.7. Teneur en sucres.....	- 225 -
I.8. Teneur en chlorophylle	- 226 -
I.8.1 Protocole d'extraction de la chlorophylle.....	- 226 -
I.8.2 Mesure de la longueur d'onde au spectrophotomètre d'absorption	- 226 -
I.9. Observations structurales	- 227 -
I.10. Mesure du taux de gonflement	- 227 -
I.11. Mesure du taux d'absorption	- 227 -
II. MISE EN ŒUVRE DE L'EXTRUDEUR BI-VIS.....	
II.1. Description de l'extrudeur bi-vis utilisé.....	- 229 -
II.2. Mise en œuvre de l'extrudeur	- 230 -
II.2.1 Introduction de luzerne.....	- 230 -
II.2.2 Déroulement d'un essai	- 230 -
II.2.3 Détermination de la répartition massique de solide dans la machine.....	- 231 -
II.2.4 Conditions opératoires des essais effectués	- 232 -
II.3. Analyses statistiques.....	- 233 -

III. TRAITEMENT DE LA LUZERNE EN REACTEUR AGITE.....	- 234 -
III.1. Types de mobiles d'agitation.....	- 234 -
III.1.1 Ultra-Turrax.....	- 234 -
III.1.2 Emulsificateur Silverson	- 234 -
III.1.3 Mixeur-hachoir	- 235 -
III.1.4 Essais effectués	- 235 -
III.2. Echantillonnage et détermination de la teneur en protéines	- 235 -
IV. MISE EN ŒUVRE DE L'ULTRAFILTRATION.....	- 236 -
IV.1. Traitement de la solution en mode recirculation.....	- 236 -
IV.2. Traitement de la solution en mode concentration	- 237 -
IV.3. Calcul de la vitesse tangentielle.....	- 238 -
V. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS SUR RESINES.....	- 239 -
V.1. Propriétés des résines	- 239 -
V.2. Conditionnement des résines.....	- 239 -
V.3. Fixation des protéines sur résine en réacteur agité	- 241 -
V.4. Extraction des protéines sur colonne d'échange d'ions.....	- 241 -
VI. DESCRIPTION DES LOTS DE LUZERNE UTILISES	- 242 -
CONCLUSION GENERALE.....	- 243 -
ANNEXES.....	- 249 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 253 -



LISTE DES ABREVIATIONS

δ : épaisseur du film stagnant autour de la bille de résine (cm)
 θ_C : température de consigne du fourreau de l'extrudeur bi-vis (°C)
ADF : Acid Detergent Fiber (détermination de la teneur en fibres)
BB : disque bilobe, élément de vis pour extrusion bi-vis
C : concentration en soluté dans la solution (g.L^{-1})
C1F : vis de convoyage monofillet, élément de vis pour extrusion bi-vis
C2F : vis de convoyage à double fillet, élément de vis pour extrusion bi-vis
CF1C : vis à pas inverse monofillet, élément de vis pour extrusion bi-vis
CF1TC : vis à pas inverse rainurée, élément de vis pour extrusion bi-vis
Chla : chlorophylle a
Chlb : chlorophylle b
CMC : concentration micellaire critique (g.L^{-1})
D : Diffusivité dans le film autour de la résine ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
DM : disque malaxeur monolobe, élément de vis pour extrusion bi-vis
DMAT : Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement
 D_p : Diffusion dans les pores de la résine ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)
EMS : Energie Mécanique Spécifique (W.h.kg^{-1})
FCM : Facteur de Concentration Massique
HEPT : Hauteur Equivalente à un Plateau Théorique (cm)
I : Intensité (A)
K : coefficient de partage d'un soluté dans deux phases
 K_F : paramètre du modèle de Freundlich
 K_L : paramètre du modèle de Langmuir
L/S : Liquide/Solide
MWCO : Molecular Weight Cut-Off (kDa)
MM : matière minérale
MS : matière sèche
n.d. : non déterminé
NDF : Neutral Detergent Fiber (détermination de la teneur en fibres)
PTM : Pression Transmembranaire (bar)
 Q_E : débit d'entrée dans l'extrudeur (kg.h^{-1})
q : capacité de fixation de la résine ($\text{mg de protéines.g}^{-1}$ de résine)
 Q_S : débit de sortie de l'extrudeur (kg.h^{-1})
 r_0 : rayon d'une bille de résine (cm)
RMM : rendement d'extraction de la matière minérale (%)
RMS : rendement d'extraction de la matière sèche (%)
RP : rendement d'extraction des protéines (%)
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
 S_S : vitesse de rotation des vis de l'extrudeur (rpm)
T°C : Température (°C)
 $t_{0,99}$: temps réaction correspondant à l'occupation de 99 % des sites de la résine (s)
 $t_{1/2}$: temps de demi-réaction (s)
T2F : vis de convoyage trapézoïdale à double-fillet, élément de vis pour extrusion



INTRODUCTION GENERALE

La luzerne est une plante fourragère, de la famille des Fabacées, très largement cultivée en France et dans le monde, pour sa richesse en fibres et en protéines. Elle rejoint ainsi les plantes telles que le trèfle (Fabacée) ou le rye-grass (Graminée) au sein des cultures fourragères les plus répandues, dont elle occupe le premier rang. En effet, la luzerne est capable de produire 2600 kg de protéines par hectares. Dans le monde, 32 millions d'hectares sont occupés par la luzerne, dont 13 millions en Amérique du Nord, et 0.65 millions en France. Elle est notamment répandue en Champagne-Ardenne (plus de 80 000 ha) et en Midi-Pyrénées (entre 20 et 40 000 ha). Elle est utilisée à l'état frais ou après traitement (séchage principalement) pour la nutrition animale. La France est le second producteur mondial de luzerne déshydratée. La grande majorité (80 %) de la luzerne destinée à ce traitement est cultivée en Champagne-Ardenne.

Un procédé industriel classique de déshydratation et de transformation consiste à presser puis sécher la luzerne dans un tambour rotatif (air chaud à 600-800 °C), jusqu'à une teneur en matière sèche de 90 %. Le résidu est broyé puis conditionné sous forme de granulés, alors que le jus vert obtenu lors de l'étape de pressage, souvent considéré comme un déchet, car difficilement valorisable, peut être épandu sur les cultures comme fertilisant.

Pourtant, cet extrait liquide a été reconnu comme une source importante de protéines végétales pour l'utilisation dans l'industrie alimentaire, du fait de leur qualité nutritive (aminogramme équilibré, richesse en acides aminés essentiels), et de l'abondance de leurs sources de production.

Les protéines de luzerne, dont certaines études ont montré qu'elles possédaient d'intéressantes propriétés fonctionnelles, sont constituées d'environ 50 % de protéines dites « blanches », hydrophiles, et de 50 % de protéines dites « vertes », hydrophobes. La fraction protéique blanche consiste principalement en RuBisCO (ribulose 1,5-bisphosphate, carboxylase oxygénase, protéine la plus abondante sur Terre), dont des procédés industriels de production existent. Toutefois, ces méthodes industrielles se focalisent uniquement sur la valorisation d'une seule et unique protéine, à partir d'un extrait liquide complexe, riche en composés d'intérêt.

Une nouvelle approche du traitement de la luzerne peut par conséquent être envisagée, afin de fractionner la plante entière, et de valoriser ses nombreux constituants, dans le cadre d'un concept de bioraffinerie d'une plante verte.

La raffinerie du végétal, de plus en plus étudiée et répandue, se doit de répondre à plusieurs critères lors de la conception du procédé de fractionnement. Le procédé développé doit ainsi être respectueux de l'environnement, en limitant l'usage de substances dangereuses et les rejets d'effluents. Il doit en outre au maximum permettre la mise en place d'unités de transformation de taille modérée, polyvalentes et flexibles, afin de pouvoir s'adapter à l'approvisionnement et à la variabilité de la matière première. Dans le cas de la luzerne, sa croissance rapide en fait une source intéressante de sucres (cellulose et hémicelluloses) pour la production de carburants de seconde et troisième génération, mais aussi de protéines à usage alimentaire ou non alimentaire.

C'est dans cet objectif que nous avons étudié l'élaboration d'un procédé de fractionnement complet de la luzerne, poursuivant ainsi la démarche de fractionnement des agro-ressources, menée au sein du Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle depuis des années.

Notre étude a ainsi porté sur une technologie alternative au procédé classique de déshydratation de la luzerne : le traitement de la plante grâce à la technologie d'extrusion bi-vis. Le filtrat d'extraction aqueuse a ensuite fait l'objet de l'élaboration d'un procédé de fractionnement et de valorisation.

Notre projet s'insérait dans le cadre du projet PRODULUZ, s'articulant autour d'un procédé durable de transformation et valorisation de la luzerne. Trois laboratoires faisaient partie intégrante de ce projet : RAPSODEE (Ecole des Mines d'Albi), LISBP (INSA Toulouse) et LCA. Chaque équipe se devait d'étudier un aspect précis du traitement de la luzerne :

- Développement d'un procédé hybride de déshydratation mécanique assistée par la chaleur, afin de diminuer l'apport de chaleur nécessaire par rapport à un procédé classique, pour le laboratoire RAPSODEE
- Etude d'un procédé chromatographique en lit expansé pour la purification de la RuBisCO, pour le LISBP
- Etude d'un procédé chromatographique mettant en jeu les interactions hydrophobes pour la séparation entre protéines vertes et protéines blanches, dans le cadre de cette thèse

Nous avons par conséquent intégré ce point précis dans l'élaboration de notre procédé global de fractionnement de la luzerne, en se focalisant sur l'étude d'une séparation chromatographique des protéines en milieu hydrophobe.

Ainsi, le premier chapitre de cette thèse permettra de mettre en évidence l'intérêt du choix de la luzerne comme candidate à un procédé de raffinerie du végétale. Le second chapitre sera consacré à la présentation du procédé global de fractionnement de la plante. Le troisième chapitre sera focalisé sur la première étape du procédé : l'extrusion bi-vis de la luzerne, et en particulier sur le choix des conditions les plus favorables à l'extraction des protéines et à la déshydratation de la plante. Le quatrième chapitre étudiera le traitement de l'extrait de liquide par interactions hydrophobes, et comprendra une partie plus fondamentale de compréhension des mécanismes de fixation à travers l'étude de protéines modèles. Le cinquième chapitre résumera toutes les techniques expérimentales utilisées dans cette thèse.



CHAPITRE I

LA LUZERNE, UN EXEMPLE DE PLANTE POUVANT S'INTEGRER DANS UN CONCEPT DE BIORAFFINERIE

SOMMAIRE

I. LA LUZERNE : UNE PLANTE FOURRAGERE.....	- 10 -
I.1. Biologie de la luzerne.....	- 10 -
I.2. Culture de la luzerne	- 13 -
I.2.1 Données géographiques et économiques	- 13 -
I.2.2 Evolution de la qualité de la luzerne au cours de sa croissance	- 14 -
I.2.3 Débouchés classiques de la culture de luzerne	- 17 -
I.2.3.1 Luzerne et alimentation animale.....	- 17 -
I.2.3.2 Luzerne et nutrition.....	- 17 -
I.2.4 Nouveaux axes de recherche et débouchés pour la luzerne	- 19 -
I.3. Composition chimique de la luzerne	- 20 -
I.3.1 Les protéines foliaires de la luzerne	- 20 -
I.3.1.1 Quelques informations sur les protéines	- 20 -
I.3.1.2 Propriétés biochimiques et physicochimiques des principales protéines foliaires..	- 23 -
I.3.1.3 La RuBisCo	- 25 -
I.3.1.4 Propriétés fonctionnelles des protéines foliaires de la luzerne	- 26 -
I.3.2 Les autres constituants de la luzerne	- 28 -
I.4. Traitement de la luzerne	- 35 -
I.4.1 Déshydratation thermique de la luzerne	- 35 -
I.4.2 Traitement des jus verts de luzerne	- 36 -
I.4.3 Procédés de fractionnement de la plante	- 39 -
I.4.4 Utilisation des autres parties de la luzerne	- 40 -
I.4.5 Concept de bioraffinerie verte	- 42 -
II. OPERATIONS UNITAIRES UTILES AU FRACTIONNEMENT DE MATIERE VEGETALE.....	- 45 -
II.1. L'extrusion bi-vis	- 45 -
II.1.1 Présentation générale du procédé d'extrusion	- 45 -
II.1.2 Les éléments constitutifs de l'extrudeur bi-vis pour le traitement de la matière	- 47 -
II.1.2.1 Les vis de convoyage : des vis à pas direct	- 47 -
II.1.2.2 Les vis à pas inverse ou contre-filets	- 48 -
II.1.2.3 Les éléments restrictifs.....	- 49 -
II.1.3 Modularité et avantages de la technologie bi-vis	- 51 -
II.1.4 Intérêt de l'utilisation de la technologie bi-vis pour le traitement de matière végétale : exemple des travaux menés au LCA.....	- 52 -
II.2. Séparation membranaire	- 53 -
II.2.1 Les procédés de séparation membranaire	- 53 -
II.2.2 L'ultrafiltration	- 54 -
II.2.2.1 Caractéristiques des membranes.....	- 54 -
II.2.2.2 Mécanismes de transfert et de rétention.....	- 59 -
II.2.2.3 Phénomènes limitants des techniques de séparation membranaire.....	- 61 -
II.2.2.4 Facteurs influençant la séparation membranaire	- 62 -
II.2.3 L'utilisation de la séparation membranaire pour le traitement d'extraits liquides de luzerne	- 63 -

II.3. Chromatographie - fixation sur résine d'adsorption.....	- 64 -
II.3.1 Définition et principe	- 64 -
II.3.2 Chromatographie en phase liquide.....	- 64 -
II.3.3 Support solide : résines synthétiques	- 65 -
II.3.3.1 Matrices.....	- 66 -
II.3.3.2 Groupements fonctionnels.....	- 68 -
II.3.3.3 Contre-ions mobiles	- 70 -
II.3.3.4 Capacités d'échange	- 70 -
II.3.4 Mécanismes d'échanges	- 71 -
II.3.4.1 Absorption.....	- 71 -
II.3.4.2 Adsorption.....	- 72 -
II.3.4.3 Isothermes d'adsorption.....	- 73 -
II.3.4.4 Échange d'ions	- 77 -

Ce premier chapitre permettra de rappeler la place de la luzerne dans sa filière de culture, dans son contexte historique et économique. L'étude des différents constituants de la plante et des techniques de fractionnement pouvant être mises en œuvre sera l'occasion de déterminer comment cette plante peut s'intégrer dans un concept de bioraffinerie de la plante entière, dans l'objectif de la valoriser au maximum.

I. LA LUZERNE : UNE PLANTE FOURRAGERE

La luzerne cultivée en France (*Medicago sativa* ou *falcata*.) est une **plante herbacée fourragère**, de la famille des **Fabacées** (ou Légumineuses), de la sous-famille des Faboideae, tribu des Trifolieae. La luzerne est une dicotylédone. Sa taille varie en moyenne de 30 à 70 cm de hauteur, et elle possède de petites fleurs violettes ou jaunes selon le type de luzerne, groupées en grappes. Ses feuilles sont constituées de trois folioles oblongues et dentées au sommet, qualifiées d'une couleur « vert gris ». Les fruits, quant à eux, sont des gousses recourbées en hélice. Les tiges souterraines ramifiées de la luzerne lui permettent d'être une plante vivace, repoussant d'une année sur l'autre.

Le terme **fourrage** est employé en agriculture et en élevage pour l'alimentation animale. Une plante fourragère est cultivée pour ses parties végétatives (feuilles, tiges ou racines), et est utilisée à l'état frais ou après conservation (par séchage généralement) pour l'alimentation animale (bovins, caprins, ovins, porcins, canards, oies et lapins). (*GNIS*)

Plusieurs espèces sont nommées plantes fourragères : des Graminées (brome, dactyle, fétuque des prés, fétuque élevée, fléole, ray-grass anglais, ray-grass d'Italie), des Fabacées (luzerne, sainfoin, lotier cornicule, trèfle blanc, trèfle hybride, trèfle incarnat, trèfle violet) ou encore certaines Brassicacées comme le colza fourrager.

I.1. Biologie de la luzerne

La germination de la luzerne dépend de la disponibilité en eau du sol, ainsi que de la température et de la lumière. Aussi la germination est-elle possible à des températures

comprises entre 2 et 40 °C, avec un optimum entre 19 et 25 °C. Toutefois, la présence de sel dans le sol diminue la germination (*Gautier et Le Gall, 2003*).

Après le stade de germination, durant la phase de levée, deux cotylédons apparaissent (les cotylédons sont les feuilles primordiales, et font partie des constituants de la graine). La première feuille qui se forme ensuite est unifoliée, alors que les suivantes seront constituées de trois folioles, réunies au niveau du pétiole sur la tige. Les étapes du développement de la plante sont illustrées sur la **Figure I. 1** ci-dessous :

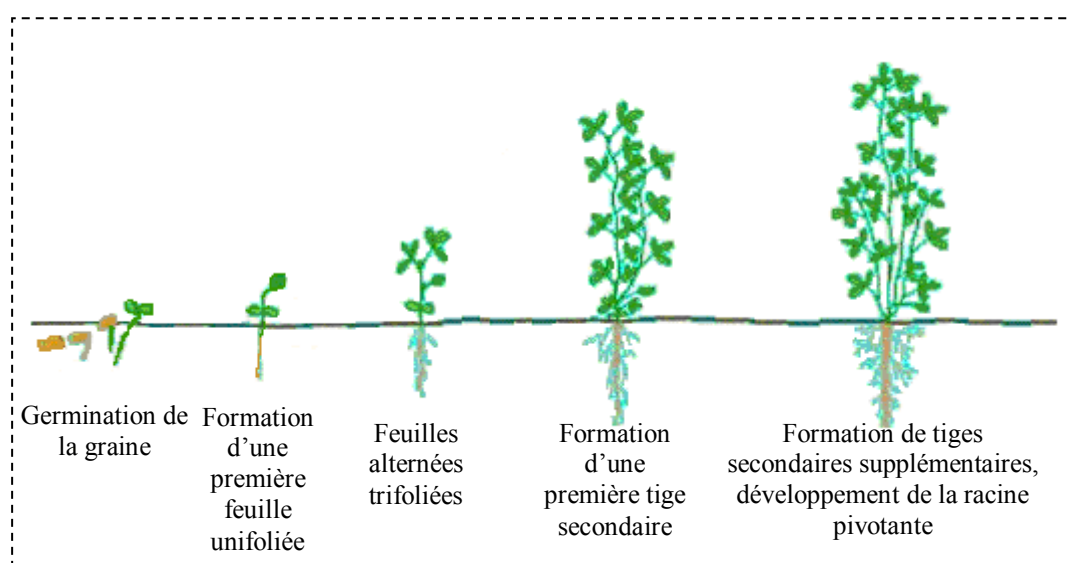


Figure I. 1 : Croissance de la luzerne (d'après GNIS, 2009)

Les feuilles qui se forment au cours du développement de la plante poussent de manière alternée de chaque côté de la tige. Des tiges secondaires apparaissent, au niveau du bourgeon axillaire situé sous la première feuille unifoliée, et au niveau des deux cotylédons. La hauteur des tiges, ainsi que le nombre et le poids des tiges et des feuilles sont affectés par la disponibilité en eau du sol. En outre, le nombre de tiges par pied augmente avec l'âge de la plante. L'année du semis, on trouve en général une demi-douzaine de tiges par pied, avec quatre cycles de récolte. Après chaque récolte, les repousses sont issues du développement de bourgeons axillaires. L'année suivante, jusqu'à huit tiges par pied peuvent être obtenues. La suppression des bourgeons axillaires a pour conséquence un retard de la croissance, ainsi qu'une diminution du nombre de tiges. Si la population diminue, il y a moins de concurrence entre les plants pour l'eau et la lumière, ce qui se traduit par une augmentation du nombre de tiges par pied, et par conséquent une diminution du rapport feuilles/tiges.

Lors de la croissance de la plante, une **racine pivotante** principale se développe, pouvant descendre à plus de deux mètres. Une racine pivotante est une racine qui s'étend en

profondeur en opposition aux racines de type fasciculé qui s'étalent sur une grande surface, à faible profondeur, permettant le captage de l'eau de pluie. Le système avec une racine profonde, tel celui que possède la luzerne, permet à celle-ci d'accéder à l'eau et aux nutriments qui ne sont pas disponibles pour des plantes à racines moins profondes (*Samac et al., 2006*). Des racines secondaires plus ou moins ramifiées selon le type de luzerne se forment par la suite. En effet, le type *falcata*, qui est plus résistant au froid, possède un appareil racinaire plus étendu que le type *sativa*. Ainsi, la luzerne présente un bon développement et donc de bons rendements de production, même lorsque les conditions de pluviométrie ne sont pas optimales. Par comparaison, d'autres plantes fourragères comme les Graminées ont un système racinaire plus ramifié et développé en surface, ce qui est favorable à la conservation et à l'amélioration de l'état structural de surface, alors que le système racinaire de la luzerne permet l'amélioration de la structure du sol en profondeur (*Gautier et Le Gall, 2003*).



Figure I. 2 : Nodules racinaires de Luzerne
(*Stacey et al., 2006, Vignes et Vignes, 2007*)

Il faut également signaler que la luzerne présente des **nodules racinaires** (Figure I. 2). La bactérie associée à ce système est *Sinorhizobium meliloti*. Ce type de bactéries présente la capacité à infecter et établir une symbiose au niveau des racines de la luzerne. L'établissement de la symbiose implique des échanges de signaux (*Subramanian et al., 2007*) entre la plante (hôte) et la bactérie (symbiote). La plante sécrète des flavonoïdes particuliers qui sont reconnus par les bactéries compatibles. Durant le procédé d'infiltration, les bactéries entrent dans la plante par l'épiderme des racines et induisent une modification du développement des cellules des racines, ce qui entraîne la formation d'un nodule. A l'intérieur des cellules de la plante, les bactéries sont enfermées dans des structures ressemblant à des vacuoles que l'on appelle des symbiosomes. C'est dans ces structures que les bactéries convertissent le diazote gazeux prélevé dans l'air en ammoniac (*Stacey et al., 2006*). La

luzerne est capable de fixer jusqu'à 152 kg de diazote par hectare et par an (*Samac et al., 2006*). Les nodosités ont besoin d'air et d'oxygène pour bien fonctionner, et d'un pH neutre pour survivre. En outre, la décomposition des racines porteuses de nodosités permet de fournir un reliquat d'azote susceptible d'être utilisé pour la culture suivante (*Gautier et Le Gall, 2003*).

Au cours de l'hiver, la luzerne peut entrer en **dormance**. La dormance se définit par rapport à la croissance observée en automne. L'apparence et la morphologie de la plante changent (il existe des différences observées entre les luzernes du Nord et du Sud). L'aptitude à la dormance est corrélée positivement avec la faculté de résistance au froid. Pour entrer dans cette phase, il est nécessaire que la plante soit en bonne santé et possède des réserves importantes. Ainsi, la dernière coupe d'automne a un impact sur le taux de survie des plantes car le niveau de réserve des plantes est différent selon la date à laquelle cette dernière coupe est effectuée.

La reprise du développement a lieu au printemps. Si la plante possède suffisamment de réserves, la pousse peut avoir lieu à partir de nouveaux bourgeons constitués en automne. Les réserves sont en effet essentielles au démarrage de la reprise de la croissance de la plante, puisqu'elle ne peut pas fabriquer les éléments nutritifs nécessaires à sa croissance par photosynthèse, étant donné qu'elle ne possède plus de feuilles. Durant l'hiver, la perte des parties souterraines peut représenter jusqu'à 700 kg.ha⁻¹. La plante utilise ses réserves durant trois semaines environ. Ensuite, lorsque le feuillage s'est développé, la photosynthèse permet à la plante de produire plus d'éléments nutritifs qu'elle n'en consomme et elle peut alors à nouveau constituer des réserves. Celles-ci sont à leur plus haut niveau lorsque la plante fleurit.

1.2. Culture de la luzerne

1.2.1 Données géographiques et économiques

La luzerne est cultivée sur 32 millions d'hectares dans le monde, dont 13 millions en Amérique du Nord. Elle est cultivée sur plus de 650 000 hectares en France, que ce soit purement de la luzerne, ou de la luzerne associée à une graminée. En termes de culture de luzerne fourragère seule, la surface cultivée en France était de 300 000 ha en 2006 (*FAO Stat, 2010*). C'est la deuxième plus cultivée des Fabacées à l'échelle mondiale, derrière le soja. Environ la moitié de la production totale de luzerne (45 à 50 %) est récoltée durant la période estivale, ce qui n'est généralement pas le cas pour les autres plantes fourragères. En effet, la

reprise de la croissance de la luzerne après l'hiver est plus tardive que pour les Graminées, ce qui décale par conséquent la production. Il existe une cinquantaine de variétés de luzerne dans le catalogue français (*Gautier et Le Gall, 2003*). Environ 87 000 ha sont dévolus à la culture de luzerne destinée uniquement à la déshydratation en 2010 (données *Ministère de l'Agriculture, 2009-2010 semi définitive*).

Afin de choisir la variété à planter, il faut tenir compte de plusieurs paramètres : le type botanique, la qualité alimentaire (grosseur des tiges, teneur en protéines) ou encore la répartition sur l'année du rendement et la résistance à certaines maladies ou certains parasites, selon l'usage que l'on veut en faire. La luzerne présente des avantages, mais aussi des inconvénients, en comparaison avec d'autres plantes fourragères. Ainsi, les intérêts de cette espèce sont sa bonne pousse estivale, l'inutilité d'une fertilisation en azote, la très bonne valeur azotée, sa bonne association avec d'autres types de plantes fourragères comme le dactyle et le brome. Ses limites sont sa sensibilité aux excès d'eau et à l'acidité du sol ainsi que son ensilage difficile car elle est pauvre en sucres fermentescibles.

Actuellement, les surfaces de culture de luzerne pure ont tendance à diminuer régulièrement. En revanche, les surfaces de culture en association avec une Graminée se stabilisent et ont même tendance à augmenter. Des modifications génétiques sont actuellement à l'étude aux Etats-Unis, dans le but d'améliorer la résistance de la plante à certaines maladies ou certains nuisibles, et afin d'élargir l'adaptabilité climatique de la luzerne (*Samac et al., 2006*). Les mêmes auteurs signalent toutefois que des améliorations de la qualité du fourrage de luzerne peuvent être effectuées sans toucher au génome de la luzerne, mais simplement en modifiant les pratiques de récolte et de production de la luzerne par les agriculteurs.

I.2.2 Evolution de la qualité de la luzerne au cours de sa croissance

Durant sa croissance, la composition de la luzerne évolue. Ainsi, le moment choisi pour effectuer chacune des coupes, tout au long de l'année, est stratégique.

La meilleure date de fauche pour chaque coupe résulte d'un compromis entre le rendement et la qualité de la luzerne (qualité nutritionnelle, teneur en protéines). Au cours du cycle de végétation, la digestibilité de la luzerne diminue avec le rapport feuilles/tiges, alors que la teneur en matière sèche augmente. Une baisse du rapport feuilles/tiges signifie que la masse des tiges augmente plus que la masse des feuilles. La composition de ces dernières restant stable, la baisse de digestibilité est due à une augmentation de la teneur en lignine et en

cellulose. En plus de la valeur alimentaire, le taux de protéines est un indicateur traditionnel de la qualité de la luzerne déshydratée (*Wattiaux et Karg, 2004*). La composition chimique de la luzerne sera détaillée dans le **Paragraphe I.3**.

La luzerne est presque entièrement fauchée au printemps et en été, de manière à limiter et essayer de maîtriser au mieux les risques de météorisation. La météorisation est une maladie assez fréquente chez les ruminants qui se produit lorsque des gaz provenant de la fermentation des aliments distendent le rumen de l'animal, en s'accumulant dans la panse. En effet, le haut des tiges et les feuilles de la luzerne contiennent des protéines qui produisent des mousses stables, dans la panse de l'animal, et qui empêchent la remontée des gaz (*Gautier et Le Gall, 2003*). Cela peut entraîner la mort par asphyxie, l'appareil digestif comprimant les poumons du ruminant.

En moyenne, la luzerne mature contient 17 % de protéines, 60 % de nutriments digestibles et 23 % de fibres (*Hamm et al., 2002*). L'évolution de la teneur en protéines selon le stade de développement de la plante et selon la période de l'année est montrée sur la **Figure I. 3**. La teneur en protéines de la luzerne diminue au printemps, pour retrouver quasiment son niveau initial à la fin de l'été (23 % de la matière sèche). Les variations pendant la saison atteignent quasiment 10 %. La coupe la plus défavorable pour la teneur en protéines est la seconde de l'année.

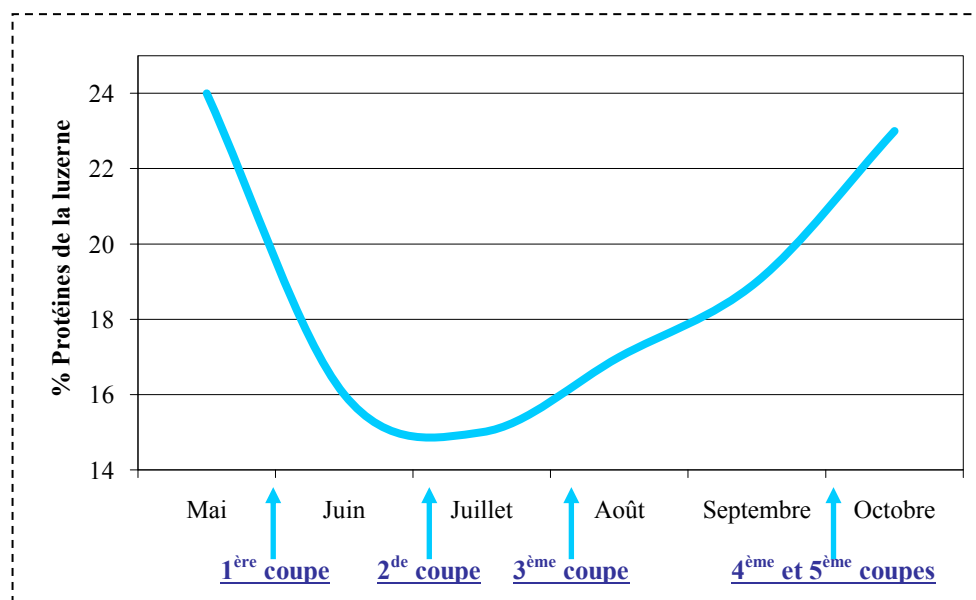


Figure I. 3 : Teneur en protéines de la luzerne en fonction des coupes au long de l'année
 (source : COOP de France, 2009) Le pourcentage est exprimé par rapport à la matière sèche de la plante

Cependant, si on s'intéresse à la **Figure I. 4**, une évolution différente de la teneur en protéines est constatée. Ici, le détail de la mesure de l'azote total à tous les stades de

développement de la plante, semaine après semaine, est montré. La variation de teneur en protéines est cyclique, après chacune de coupes. Sur l'année entière, une tendance comparable avec celle montrée sur la **Figure I. 3** est observée, avec une diminution de la teneur en protéines sur le début de l'année (de 24 % par rapport à la matière sèche, jusqu'à 16 % au moment de la deuxième coupe) puis une augmentation de la teneur sur la fin de la saison.

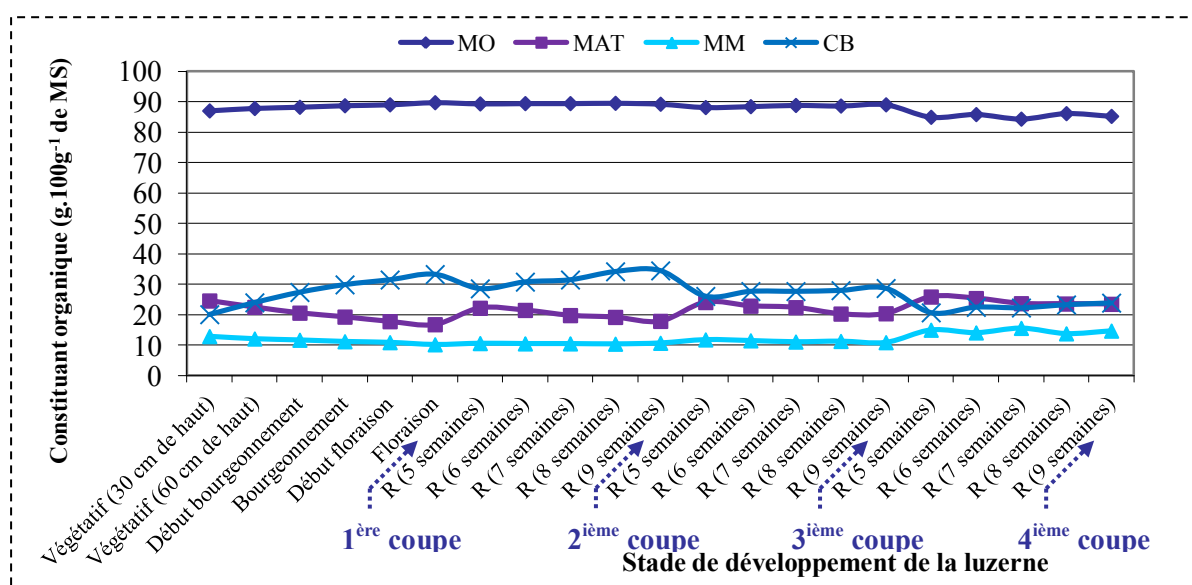


Figure I. 4 : Evolution de la composition chimique de la luzerne selon le stade de développement et le cycle de culture (Gautier et Le Gall, 2003, d'après les tables INRA 1988)

MO : matière organique ; MAT : matière azotée totale ; MM : matière minérale ; CB : cellulose brute. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la matière sèche de la plante. R représente le nombre de semaines de repousse après la coupe précédente

Couper la luzerne dans le champ permet à la plante de repousser, plus riche en protéines qu'au moment de la coupe. Le degré de maturité de la plante est un paramètre à considérer pour la qualité globale du fourrage, non seulement, comme nous venons de le voir, en ce qui concerne la teneur en protéines, mais également pour la composition en autres constituants (**Paragraphe I.3.2**).

I.2.3 Débouchés classiques de la culture de luzerne

I.2.3.1 Luzerne et alimentation animale

La culture de la luzerne pour la déshydratation en France, comme souligné précédemment, représentait 91 000 ha en 2003, et 87 000 ha en 2010 (*Gautier et Le Gall, 2003*), dont 80 % en Champagne-Ardenne, pour environ 12 à 15 t MS.ha⁻¹ par an, et 2 à 3 t de protéines par an.

Cela place la France au deuxième rang européen des pays producteurs de luzerne déshydratée, juste derrière l'Espagne et devant l'Italie. Le débouché le plus courant pour ce type de luzerne, ainsi que pour la luzerne non déshydratée, est l'utilisation en alimentation animale pour des élevages européens. Une petite partie de la production française (150 000 t par an) est toutefois exportée. Il faut signaler que le procédé de déshydratation pour la conservation concerne 90 % de la luzerne en France (*Hamm et al., 2002*). La luzerne déshydratée peut être consommée en l'état, à un taux d'incorporation allant jusqu'à 30 % dans la ration alimentaire des animaux (bovins, ovins, caprins), ou être ajoutée à la formulation d'aliments de type farines ou granulés, en mélange avec d'autres matières premières (volailles à 5 % d'incorporation maximum, porcins, lapins) (*luzernes.org, Gautier et Le Gall, 2003*). Ainsi, la gamme de conditionnement de la luzerne va des granulés de toutes tailles, à teneurs variables en protéines, fibres et carotène, à la luzerne déshydratée en brins longs, en passant par les jus foliaires appelés jus verts.

I.2.3.2 Luzerne et nutrition

Beaucoup de travaux de recherche concernent l'utilisation de la luzerne pour l'alimentation animale, et se centrent en particulier sur sa valeur nutritionnelle, sa digestibilité par les animaux par exemple (*Wattiaux et Karg, 2004, Gonzalez et al., 2001*). D'autres études s'intéressent plus particulièrement aux protéines des feuilles de luzerne, pour l'amélioration du procédé d'extraction ou l'évaluation de la teneur en acides aminés. Mais ces travaux peuvent aussi concerner la détermination des propriétés fonctionnelles de ces protéines, avec pour objectif l'utilisation en industrie alimentaire. En outre, d'autres parties de la luzerne présentent un intérêt. Par exemple, le pied de la plante fait l'objet de recherches concernant la fabrication de biocarburant.

Comme il a déjà été souligné auparavant, la luzerne est une plante fourragère très utilisée pour l'alimentation du bétail, du fait de sa haute teneur en protéines et de sa

digestibilité. Mais la dégradation trop forte dans le rumen peut entraîner une réduction de l'utilisation protéique et donc une diminution de l'intérêt alimentaire de ce fourrage. En effet, une absorption trop importante d'acides aminés au niveau du rumen signifie une perte en protéines.

La chaleur utilisée lors de la déshydratation peut réduire la valeur nutritionnelle, par la formation de liaisons protéines/glucides, non digestibles. Une solution pour pallier à l'utilisation de trop hautes températures pourrait être l'utilisation de la compression à haute pression (*Repetto et al., 2000*). Cette technique permet l'augmentation de la fraction soluble de la matière sèche et de l'azote, ainsi que de la solubilité du tampon azote, ce qui indique une accessibilité majeure au contenu cellulaire par les fluides du rumen.

La composition chimique du foin diverge selon les modes de production. Ainsi, un pressage mécanique va avoir pour conséquence la diminution de la quantité de protéines brutes et des autres composés solubles dans le produit obtenu. Le traitement alcalin sans azote (NaOH) au moment de la récolte par exemple, entraîne également une réduction de la quantité de protéines brutes (*Cozzi et al., 2002*).

En revanche, pour la luzerne traitée avec de l'urée, la quantité de protéines brutes augmente. Un autre effet a été observé par *Matthews et Mc Manus (1976)* : l'augmentation du contenu en débris de parois cellulaires pour la luzerne traitée avec l'urée. La présence d'urée favoriserait par conséquent l'apparition de la réaction de Maillard entre le groupement carbonyle des glucides réducteurs et le groupement amine des composés azotés (protéines, acides aminés).

Enfin, aucun effet du pressage thermique n'a été observé sur la distribution de taille des particules. En revanche, il y a un effet du traitement à l'urée : un plus petit diamètre moyen est observé. L'hypothèse avancée est que l'activité alcaline de l'urée, entraînant des destructions de parois cellulaires, rend les cellules plus fragiles et sensibles lors de la suite du procédé.

Il n'y a pas que le procédé d'obtention du fourrage qui joue un rôle, la date de récolte de la luzerne intervenant également (*Gonzalez et al., 2001*).

Dans cette étude, la dégradation dans le rumen et la digestibilité intestinale de la luzerne récoltée à différents moments ont été testées. La digestibilité effective de la matière sèche diminue avec l'âge du fourrage par suite d'une diminution de la fraction soluble et une augmentation de la fraction non dégradable par l'organisme. Les teneurs en matières azotées totales montrent une évolution similaire mais plus modérée. Le choix de la date de récolte de la luzerne est important, selon l'utilisation que l'on veut faire de cette plante. La composition

du foin de luzerne varie également selon la variété de luzerne, le climat durant la saison, ou encore le mode de conservation (*Garcia et al., 1995*). En outre, le fourrage peut être présenté sous diverses formes, notamment en granulés. L'avantage de la présentation du fourrage sous forme de granulés est une réduction de la taille des particules lors de l'étape de mouture (*Cozzi et al., 2002*). Ainsi, une plus grande surface sera disponible, permettant un attachement plus important des microorganismes dans le rumen de l'animal, et donc un taux de passage dans le rumen plus élevé.

I.2.4 Nouveaux axes de recherche et débouchés pour la luzerne

De nouveaux débouchés apparaissent actuellement pour la luzerne. En effet, des pôles de recherche sur cette plante existent (Luzerne-RD depuis mai 2005 notamment), ayant plusieurs objectifs tels que :

- L'amélioration et le développement de produits existants
- L'identification et le développement de nouveaux produits destinés au marché animal, et à d'autres marchés (alimentation humaine avec aliments fonctionnels, aliments diététiques, cosmétologie)
- L'évolution des procédés, la recherche de nouvelles techniques et technologies dans l'optique de gain de productivité et d'amélioration de l'impact environnemental des usines
- L'augmentation de la sécurité des produits.

Les travaux actuels de recherche concernent la modification des procédés d'extraction, de manière à extraire des produits originaux, ayant des caractéristiques différentes, et ainsi ayant l'opportunité de conquérir des marchés distincts de ceux plus traditionnels. Quelques exemples sont présentés ici (*luzernes.org, 2009*) :

- L'alimentation animale : additifs alimentaires et pet-food (produits diététiques de prévention et traitement de l'obésité des animaux de compagnie, produits de confort et de santé pour ces animaux qui vivent de plus en plus vieux)
- L'alimentation humaine : alimentation fonctionnelle (prise en compte du facteur santé de l'aliment), diététique minceur et compléments alimentaires
- La cosmétologie.

La composition chimique de la luzerne, décrite dans le paragraphe suivant, montre que les protéines ne sont pas les seuls composés d'intérêt de la plante, et qu'il est ainsi intéressant d'élargir les voies de valorisations de la luzerne.

I.3. Composition chimique de la luzerne

I.3.1 Les protéines foliaires de la luzerne

I.3.1.1 Quelques informations sur les protéines

Le terme protéines est le nom générique des substances organiques azotées. Cette catégorie regroupe tout corps qui, après hydrolyse, conduit à des acides aminés (Voet et Voet, 2005).

Il existe deux catégories d'**acides aminés** : les acides aminés standards (ou protéiques) et les acides aminés non standards (dits rares, ou « non protéiques»). Les premiers sont produits à partir du code génétique universel, et sont utilisés dans la biosynthèse des protéines. Ce sont les monomères constitutifs des protéines et peptides, qu'ils soient d'origine animale, végétale ou bactérienne. On en dénombre 20. La seconde catégorie, les acides aminés non standards n'entrent pas dans la composition classique des peptides et des protéines. On en trouve environ 150, qui peuvent être libres ou combinés à d'autres structures. Ce sont principalement des agents structuraux. Ils peuvent également être rencontrés dans des intermédiaires métaboliques ou comme médiateurs chimiques (exemples : β -alanine, taurine, ornithine, citrulline). Les acides aminés sont des composés bi-fonctionnels, portant une fonction COOH et une amine primaire NH_2 sur le carbone C_α (**Figure I. 5**).

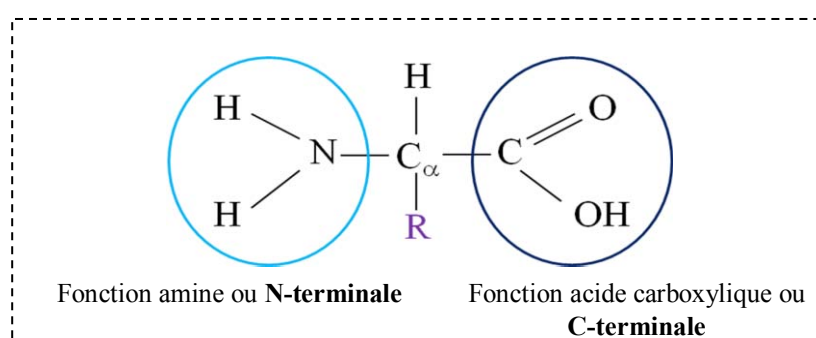


Figure I. 5 : Formule développée d'un acide aminé (Petsko et al., 2004)
(R : chaîne latérale différant d'un acide aminé à l'autre)

Chaque acide aminé possède une chaîne R latérale caractéristique de composition variable. Elle peut être aliphatique, cyclique, uniquement carbonée ou non. Ainsi, on peut trouver des radicaux polaires ou apolaires (qui peuvent alors être chargés ou non, négativement ou positivement) (**Tableau I. 1**).

Tableau I. 1 : Caractéristiques des chaînes latérales des principaux acides aminés
(Petsko et al., 2004)

Caractéristique de la chaîne latérale	Acides aminés
Apolaire	Alanine, <i>méthionine</i> , <i>leucine</i> , <i>valine</i> , <i>isoleucine</i> , <i>phénylalanine</i> , <i>tryptophane</i> , proline
Polaire non chargée à pH = 7	Glycine, sérine, <i>thréonine</i> , tyrosine, cystéine, asparagine, glutamine
Polaire chargée positivement à pH = 7	Acide aspartique, acide glutamique
Polaire chargée négativement à pH = 7	<i>Lysine</i> , arginine, histidine

Remarque : en italique sont spécifiés les acides aminés essentiels

La chaîne latérale spécifique à chaque acide aminé contribue à la spécificité biologique de la protéine, participe à sa structure et influe sur la valeur du point isoélectrique de la protéine et donc sur le caractère polaire ou apolaire de la protéine.

Les **peptides** sont définis comme des polymères synthétiques ou naturels résultant de l'enchaînement d'un nombre limité d'acides aminés (moins de 60). L'enchaînement des peptides entre eux, c'est-à-dire la formation des liaisons covalentes peptidiques a lieu par condensation (départ d'eau) entre le COOH porté par le C α d'un acide aminé et le NH $_2$ porté par le C α d'un autre acide aminé (Voet et Voet, 2005).

On parle d'**oligopeptides** lorsque le nombre d'acides aminés enchaînés est inférieur à 10. Les **polypeptides** sont les protéines les plus petites. Elles sont le résultat de l'hydrolyse partielle de précurseurs protéiques plus longs. Leur nombre d'acides aminés est compris entre 10 et 50-100 (masse moléculaire < 10 000 Da). Au-delà de cette taille, on parle de protéines : plus de 100 acides aminés, pour un poids moléculaire supérieur à 10 000 Da.

On trouve des peptides d'intérêt parmi les hormones (glutathion par exemple), parmi les antibiotiques, qui jouent un rôle dans la structure des cellules (peptidoglycane), ...

Une **protéine** est, par définition, un composé colloïdal macromoléculaire constitué par l'enchaînement d'un grand nombre d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Les protéines possèdent trois grandes caractéristiques : l'universalité, le caractère indispensable (notamment du fait de la présence dans certaines d'entre elles des acides aminés essentiels), la diversité extraordinaire de propriétés et de fonctions à partir des mêmes éléments constitutifs. Il existe de multiples classifications des protéines, qui s'établissent selon différents critères, tels que la conformation (sphéro ou scléroprotéines), la composition (hétéro et holoprotéines) ou encore la fonction (à activité biologique, de structure, de réserve,...). Les holoprotéines (albumines, globulines, prolamines, glutélines, histones, scléroprotéines) sont constituées uniquement d'acides aminés, au contraire des hétéroprotéines (phosphoprotéines, glycoprotéines, lipoprotéines, nucléoprotéines, chromoprotéines).

Les principales sources protéiques sont d'origine animale (cellules germinales, liquides biologiques, muscles, tissus conjonctifs) ou d'origine végétale (graines, racines et tubercules, feuilles).

La **structure primaire** est l'ordre séquentiel linéaire déterminé génétiquement des acides aminés constituant la protéine. Les liaisons covalentes reliant les acides aminés peuvent être de deux types : soit liaison peptidique, soit pont disulfure entre deux résidus de cystéine.

La **structure secondaire** des protéines est la conformation spatiale élémentaire prise par la chaîne polypeptidique, stabilisée par des liaisons hydrogène entre les groupes de l'ossature (mais pas des chaînes latérales). C'est le premier niveau d'organisation macromoléculaire. Il existe trois possibilités de disposition spatiale pour l'enchaînement entre acides aminés : structure hélicoïdale (hélice α), structure en feuillet plissé (feuillet β) et structure désordonnée appelée pelote statique. Les deux premières structures représentent 60 % des protéines environ.

La **structure tertiaire** des protéines est l'organisation dans l'espace des différentes structures secondaires présentes sur une même chaîne polypeptidique. C'est en quelque sorte le repliement de la chaîne polypeptidique sur elle-même, donnant le second niveau d'organisation macromoléculaire, permettant une stabilité thermodynamique maximale de la protéine. La structure tertiaire résulte de liaisons de faible énergie qui s'établissent entre les chaînes latérales d'acides aminés. Ce sont des liaisons hydrogènes (entre chaînes latérales d'acides aminés polaires de groupements voisins), des interactions de Van der Waals (ioniques ou hydrophobes entre résidus apolaires, aliphatiques ou aromatiques) ou encore des liaisons covalentes (ponts disulfures). Ainsi, ce niveau d'organisation permet de différencier les protéines fibrillaires (collagène, kératine, élastine,...) des protéines globulaires (prolamines, albumines et globulines) par exemple (*Moussard, 2006, Petsko et al., 2004*).

La **structure quaternaire** est l'association spécifique entre plusieurs sous-unités peptidiques (ou protomères) permettant l'expression de la fonction biologique de la protéine (polymère). Elle n'est pas systématique pour toutes les protéines. Chaque protomère possède sa propre structure tertiaire. Les interactions entre polymères ne sont pas de type covalente, mais uniquement de faible énergie, de type hydrogène, électrostatique ou hydrophobe. En outre, la conformation des protéines et leur activité biologique ne sont conservées que dans un domaine précis de pH, de température et de force ionique. Au-delà de ce domaine, la protéine

peut être dénaturée et perdre sa structure et son activité biologique. Cette dénaturation est soit réversible (elle peut retourner à son état natif), soit irréversible.

I.3.1.2 Propriétés biochimiques et physicochimiques des principales protéines foliaires

La majeure partie des protéines de luzerne est localisée dans les feuilles. Dans les feuilles, la structure dominante est l'appareil chloroplastique, qui représente 90 à 95 % des membranes des cellules des feuilles d'épinard (Douillard, 1985). L'ensemble constitué par les protéines chloroplastiques et les autres protéines solubles représente les trois quarts des protéines foliaires. Dans les chloroplastes, deux catégories de protéines sont représentées : les éléments constitutifs des lamelles chloroplastiques et les protéines hydrosolubles du stroma (Figure I. 6). Ainsi, cette distinction entre protéines insolubles dans l'eau et protéines hydrosolubles des chloroplastes a conduit à une répartition générale des protéines foliaires :

- **Protéines hydrosolubles**, localisées en grande majorité dans le stroma des chloroplastes, ou encore dans le cytosol de la cellule végétale
- **Protéines non solubles dans l'eau**, en général constitutives des membranes des lamelles chloroplastiques

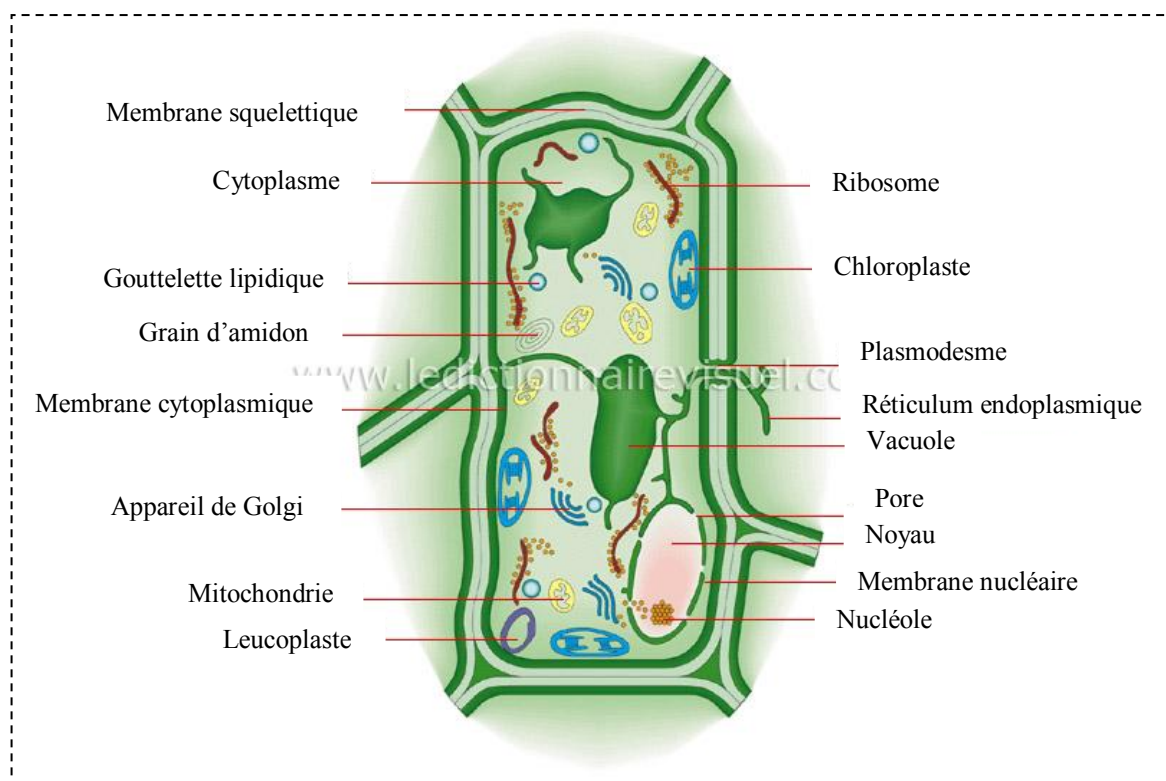


Figure I. 6 : Organisation générale d'une cellule végétale
(© QA International, Tous droits réservés, www.ikonet.com)

Les **protéines hydrophiles, ou protéines blanches**, solubles dans l'eau, sont localisées dans les organites cellulaires. Ainsi, dans la phase soluble du stroma des chloroplastes, se trouvent des protéines, des acides nucléiques, des ribosomes et de nombreuses enzymes catalysant les réactions du métabolisme de cet organite. L'enzyme la plus caractéristique est la RuBisCO (**Paragraphe I.3.1.3**), intervenant au niveau du cycle de Calvin. Deux groupes de protéines ont été différenciés parmi les protéines blanches. Le premier groupe, appelé fraction-I, a été dénommé ainsi en référence au fait que c'est la première fraction à sédimenter lors d'une étape d'ultracentrifugation (*Wildman et Bonner, 1947, Wildman et Kwanyuen, 1982, Bahr et al., 1977, Sheen, 1991*). Les protéines de cette fraction représentent jusqu'à 65 % des protéines blanches totales. La fraction-II est composée de protéines ayant des poids moléculaires hétérogènes et représentent moins de 35 % des protéines solubles.

Les **protéines hydrophobes, ou protéines vertes** (insolubles dans l'eau) des feuilles sont principalement les protéines membranaires des chloroplastes, représentant 60 % des éléments constitutifs de ces chloroplastes, les 40 % restant étant des lipides. Ces derniers sont principalement des glycérolipides, ainsi que des pigments. Les protéines sont liées à ces éléments. En outre, les protéines étant des molécules à caractère amphiphile, en milieu aqueux, les protéines hydrophobes forment des associations très fortes entre elles, ou avec d'autres molécules hydrophobes ou amphiphiles.

Les principales protéines des lamelles chloroplastiques sont des complexes protéine/chlorophylle (d'où le nom de protéines vertes), intervenant dans le procédé de photosynthèse. Ainsi, le complexe protéine-chlorophylle appelé Light-Harvesting Chlorophyll a/b Protein (LHCP) peut représenter jusqu'à 50 % des protéines membranaires, selon *Thornber, 1975*.

Tableau I. 2 : Caractéristiques biochimiques des protéines « vertes » insolubles de la luzerne
(*Dilly et De Mathan, 1978*)

Poids moléculaire	20 à 100 kDa
pH isoélectrique	4.6-4.8
Résistance aux traitements thermiques	Très faible, précipitent totalement au-delà de 50 °C

I.3.1.3 La RuBisCo

La RuBisCO (ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase : E.C. 4.1.1.39, (Ellis, 1979)) est une enzyme indispensable à la vie sur Terre, car elle intervient dans les mécanismes de photosynthèse et de photorespiration chez les végétaux (**Figure I. 7**). Elle permet la formation de matière organique à partir du carbone inorganique de l'atmosphère.

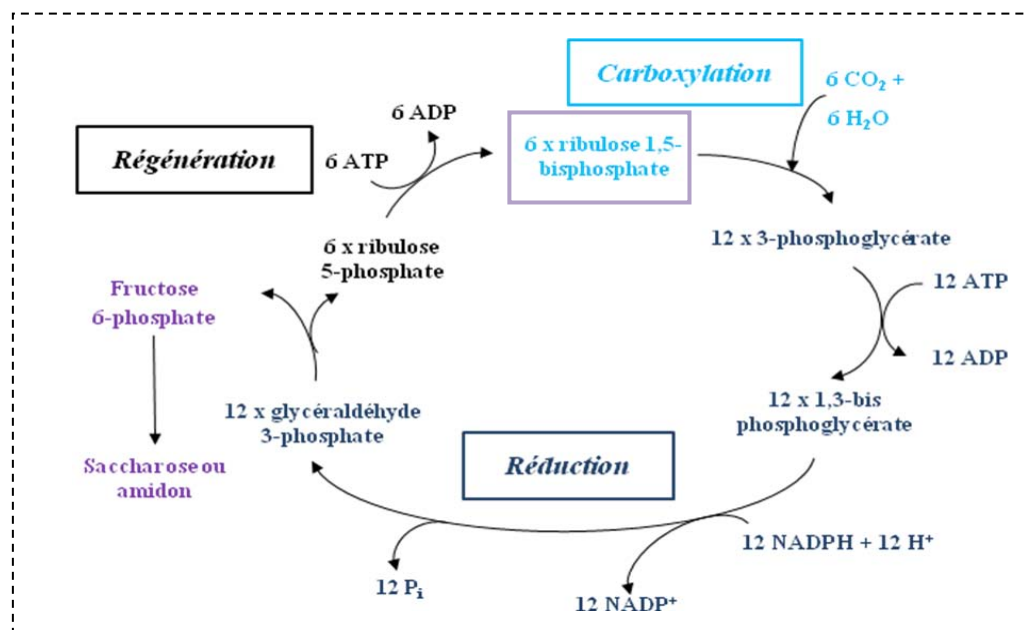


Figure I. 7 : Rôle de la RuBisCo dans le cycle de Calvin
(sources : Hopkins et Evrard, 2003, Moreau et Prat, 2008)

C'est la protéine la plus abondante de la biosphère. En effet, elle représenterait à elle seule 0.2 % des protéines du globe (Douillard, 1985) et constitue jusqu'à 65 % des protéines solubles des feuilles des espèces en C₃ et jusqu'à 15 % pour les plantes herbacées en C₄. La RuBisCo est naturellement abondante dans les chloroplastes et est obtenue assez facilement à un haut niveau de pureté (Prévot-d'Alvise et al., 2004). Dans les feuilles de luzerne, cette enzyme représente entre 42 et 51 % des protéines totales (Koschuh et al., 2004).

La structure de cette protéine reste assez stable chez tous les végétaux supérieurs (Barbeau et Kinsella, 1986, Douillard et De Mathan, 1994). La RuBisCO est une oligoprotéine constituée de 16 sous-unités (Lamsal et al., 2007) :

- 8 grosses sous-unités catalytiques (de nomenclature L) d'environ 55 kDa chacune, composées d'environ 446 acides aminés
- 8 petites sous-unités (nomenclature S) d'environ 14 kDa chacune, constituées d'environ 123 acides aminés

Sa masse moléculaire totale est d'environ 560 kDa pour une stoechiométrie L_8S_8 . Les petites et grosses sous-unités n'ont pas la même origine. En effet, les grosses sous-unités sont biosynthétisées grâce à l'ADN chloroplastique, sur les ribosomes de ces chloroplastes. Les petites sous-unités sont quant à elles synthétisées sous forme de précurseurs à partir d'ADN nucléaire, sur les ribosomes du cytoplasme. L'association de ces sous-unités a lieu lorsque que les précurseurs des petites sous-unités, chargés positivement, ont traversé l'enveloppe des chloroplastes présentant une charge négative. Les précurseurs perdent alors un peptide chargé positivement, avant de s'associer aux grosses sous-unités, formant alors l'enzyme active.

Sa température de dénaturation est de 76.2 °C, et sa chaleur de dénaturation enthalpique de 6.3 kcal.kg⁻¹ (Lamsal et al., 2007).

Tableau I. 3 : Point isoélectrique (pI) de la RuBisCO selon les méthodes de détermination et l'origine végétale de la protéine

pI	Origine	Méthode de mesure	Références
4.5	Tabac/coton/épinard/maïs	Solubilité dans une large gamme de pH	<i>Bahr et al., 1977</i>
6.6-6.9 : grande sous-unité 7.45 : petite sous-unité	Luzerne	Focalisation isoélectrique, dissociation dans l'urée	<i>Daday et Whitecross, 1983</i>
6.0, molécule native	Luzerne	DSC	<i>Douillard et Songvilay Kongphet, 1990</i> <i>Libouga et al., 1996</i>

Le point isoélectrique est différent selon l'origine végétale de la protéine, et selon la méthode de mesure. En effet, l'urée par exemple, utilisée pour séparer les sous-unités de la RuBisCO, agit sur la composition en acides aminés et donc sur le pI. En outre, le pI des sous-unités est supérieur à celui de la protéine globale, que ce soit pour de la RuBisCo de luzerne ou de la RuBisCO extraite de maïs ou d'épinard (Douillard et De Mathan, 1994).

1.3.1.4 Propriétés fonctionnelles des protéines foliaires de la luzerne

Les propriétés fonctionnelles sont ici décrites pour un concentré protéique comestible de luzerne (Knuckles et Kohler, 1982). Les principales propriétés dont nous parlons dans ce paragraphe sont la solubilité, les propriétés émulsifiantes et gélifiantes, et la capacité moussante.

- **Solubilité**

La solubilité est le résultat des propriétés de surface des protéines. Elle affecte les propriétés moussantes, émulsifiantes (liaison avec l'eau et l'huile), mais aussi gélifiantes des protéines. La solubilité dans l'eau d'une protéine dépend de sa composition en acides aminés, de la flexibilité moléculaire, de la forme et de la taille de la molécule (*Lamsal et al., 2007*). Les profils de solubilité des protéines foliaires de luzerne montrent que la plupart de ces protéines sont le moins soluble autour de leur point isoélectrique (*Prévoit-d'Alvise et al., 2004*). En outre, la solubilité des protéines de luzerne dépend fortement de leur mode d'obtention. Ainsi, les concentrés protéiques obtenus par précipitation acide sont plus solubles que les protéines obtenues par précipitation à 80 °C, du fait de la dénaturation due à la chaleur (*Betschart, 1974*). *Miller et al. (1975)* ont montré que la solubilité des concentrés de protéines solubles de luzerne diminue de 90 g de protéines solubles pour 100 g à 15 g pour 100 g lorsque la température de lavage et de précipitation augmente de 2 à 25 °C. Ainsi, le procédé mis en œuvre pour le fractionnement de la plante influe significativement sur la solubilité des protéines séparées, et par conséquent sur leur potentiel d'utilisation.

- **Propriétés émulsifiantes**

L'étude réalisée par *Lamsal et al., 2007*, a montré que le procédé d'obtention du concentré protéique joue un rôle important sur ses propriétés émulsifiantes. En effet, un concentré protéique obtenu par précipitation à chaud du jus clarifié puis par ultrafiltration présentait de meilleures propriétés (activité émulsifiante, capacité émulsifiante et stabilité de l'émulsion) que des produits obtenus après précipitation à chaud suivie d'une précipitation acide. En effet, dans ce second cas, la forme native a pu être modifiée par le changement de pH du milieu imposé par le traitement. En outre, cette étude, ainsi que celle de *Wang et Kinsella*, ont montré que la bonne stabilité de l'émulsion obtenue était due au traitement à chaud subi par le jus. Enfin, les résultats obtenus avec un concentré de protéines de blanc d'œuf ont montré une meilleure activité émulsifiante et une meilleure stabilité de l'émulsion, mais la capacité émulsifiante est plus importante dans le cas des protéines de luzerne.

- **Propriétés gélifiantes**

Un gel à 5 % de protéines de luzerne (*Knuckles et Kohler, 1982*) est plus de deux fois plus résistant qu'un gel de protéines de soja à 15 %. La capacité gélifiante des protéines de luzerne dépend fortement de la température appliquée lors du séchage du concentré. En effet, lorsque la température de l'atomiseur passe de 85 à 140 °C, il faut augmenter la concentration du gel de 2 à 5 % pour obtenir un gel de résistance comparable.

▪ **Capacité moussante et stabilité de la mousse**

Betschart (1975) a suggéré que le concentré protéique issu des feuilles de luzerne, avec de bonnes propriétés moussantes, pourrait être utilisé dans les systèmes alimentaires afin d'améliorer la texture et la structure en mousse de certains aliments. Le foisonnement du concentré protéique (atomisé à 85 °C) à 2, 4 et 10 % entraîne la formation d'une mousse représentant 10 fois le volume de la solution de départ. L'augmentation de volume obtenue est la même que celle observée lors du foisonnement de blanc d'œuf congelé et décongelé. En outre, la mousse obtenue à partir du concentré protéique de luzerne est plus stable (structure conservée plus longtemps).

Les protéines de luzerne possèdent des qualités fonctionnelles intéressantes, les rendant utilisables en industrie alimentaire, pouvant remplacer des protéines de soja ou de blanc d'œuf notamment. Toutefois, le procédé d'obtention de ces protéines doit être adapté à l'usage que l'on destine aux isolats protéiques.

I.3.2 Les autres constituants de la luzerne

Outre les protéines, on trouve de nombreux composés d'intérêt dans l'extrait vert issu de la luzerne. Les **teneurs en principaux constituants** sont listées dans le **Tableau I. 4**. Les valeurs ont été déterminées sur la plante entière, soit lorsque les fleurs sont encore en boutons, soit quand les fleurs sont entières. La teneur en fibres (lignines, hémicelluloses et cellulose) augmente avec le degré de maturité de la luzerne. En effet, plus la plante grandit, plus sa tige se développe, plus la proportion tige/feuilles augmente et donc plus la teneur en fibres croît. Nous pouvons constater également que la teneur en protéines de la plante entière diminue lorsque la plante est en fleurs, ce qui explique que les coupes de luzerne doivent préférentiellement avoir lieu avant le fleurissement.

Tableau I. 4 : Composition chimique de la luzerne

	Luzerne immature ¹ (état bouton)	Luzerne mature ¹ (fleur entière)	Luzerne déshydratée ² (90.6 % de MS)
Protéines	12.7	8.8	16.7
Lipides	0.9	0.7	2.6 – 6.4 ³
Cendres	8.1	5.8	10.6
Sucres solubles	5.5	4.9	4.2
Amidon	0.3	0.2	0.0
Cellulose	27.5	30.6	25.7
Hémicellulose	10.5	12.2	12.3
Pectines	12.5	11.9	n.d.
Lignines	15.8	17.5	16.1

En % sur la matière sèche (Sources : ¹: Dien et al., 2006, Samac et al., 2006 ; ²: INRA 1988 pour la luzerne déshydratée ; ³: Van der Veen et Olcott, 1964 pour les lipides de la luzerne déshydratée)

▪ **Lipides de la luzerne**

Les lipides sont majoritairement situés dans la fraction verte. 95 % d'entre eux proviennent des membranes lipoprotéiques des chloroplastes, mais constituent seulement 2 % de la masse totale de la feuille fraîche. (Godon, 1985). Au total, dans la plante, les lipides constituent environ 1 % de la masse sèche de la plante (**Tableau I. 4**), et pouvant atteindre 6 % pour la luzerne déshydratée.

▪ **Sucres**

Parmi les sucres solubles, le sucre majoritaire de la luzerne est le saccharose (entre 2.9 et 3.7 % de la matière sèche de la plante selon la maturité). Les sucres simples composant les parois cellulaires sont également listés dans le **Tableau I. 5**. Le sucre largement majoritaire est ici le glucose.

Tableau I. 5 : Composition de la luzerne en sucres simples

		Luzerne immature (état bouton)	Luzerne mature (fleur entière)
Sucres solubles	Glucose	1.5	1.8
	Fructose	0.1	0.1
	Saccharose	3.7	2.9
	Raffinose	0.2	0.1
	Stachyose	0.0	0.0
Sucres de la paroi cellulaire	Glucose	27.5	30.6
	Xylose	8.5	9.9
	Arabinose	2.0	2.1
	Galactose	1.7	1.7
	Mannose	1.8	2.1
	Rhamnose	0.6	0.5
	Fructose	0.2	0.2
	Acides uroniques	8.2	7.6

En % sur la matière sèche (Source : Dien et al., 2006)

▪ **Minéraux**

Le **Tableau I. 6** présente la composition en macro-minéraux de la luzerne. Des évolutions selon le degré de maturité de la plante sont ici aussi remarquées, notamment pour le magnésium, le phosphore et le soufre, dont la teneur diminue nettement lorsque la luzerne fleurit.

Tableau I. 6 : Composition en macro-minéraux de la luzerne, selon le degré de maturité

	Luzerne immature (état bouton)	Luzerne mature (fleur entière)
Calcium	0.69	0.76
Chlore	0.54	0.41
Magnésium	0.31	0.19
Phosphore	0.32	0.18
Potassium	2.94	2.11
Silice	0.14	0.12
Soufre	0.16	0.07

En % de la matière sèche (source : Dien et al., 2006)

▪ **Composés phénoliques** (Hernandez et al., 1991)

Les liaisons entre polyphénols et protéines sont un facteur pouvant entraîner une diminution de la qualité nutritionnelle des aliments. Ces liaisons peuvent être de deux types :

- Non covalentes, formées à des pH acides ou neutres. Avec les polyphénols polymériques ou les tanins. Ces liaisons irréversibles engendrent une modification de la structure 3D des protéines, et donc une altération de leurs propriétés fonctionnelles
- Covalentes, entre polyphénols et protéines, entraînant des transformations enzymatiques contribuant au phénomène de brunissement de l'extrait vert par exemple. Ce type de liaison est également irréversible. Des liaisons avec les acides aminés essentiels provoquent l'altération des qualités organoleptiques, notamment la saveur et la couleur, et donc diminuent la valeur nutritionnelle des aliments.

▪ **Saponines**

La teneur en saponines est plus importante dans l'extrait vert obtenu après pressage que dans la plante de départ. Les saponines sont des glucides complexes appartenant aux terpènes cycliques ou aux stéroïdes. Elles sont issues de la combinaison chimique d'un sucre et d'un stéroïde, d'un stéroïde alcaloïde ou d'un triterpène. Elles sont dotées de propriétés tensioactives et ont un pouvoir moussant et peuvent donc servir de détergent. Dans l'organisme animal, elles provoquent la lyse des globules rouges et ont un goût amer. Ce sont donc des facteurs antinutritionnels, diminuant l'utilisation par l'organisme des nutriments en affectant l'utilisation des protéines et la digestibilité. Parmi les saponines de la luzerne, on trouve principalement l'acide médicagénique, ainsi que le soyasapogénol A, le soyasapogénol B ou encore l'acide lucernique. Mais l'acide médicagénique est le principal responsable de l'effet antinutritionnel (*Sen et al., 1998, Livingston et al., 1979*). La teneur en saponines dans la luzerne est plus faible au printemps et en automne, et atteint son maximum au milieu de l'été. Toutefois, des cultures de luzerne à faible teneur en saponines peuvent être développées (*Lu et Jorgensen, 1987, Golawska et Lukasik, 2009*).

Lors du procédé classique d'obtention de l'extrait vert de luzerne par pressage, 65 à 87 % des saponines sont retenues dans le gâteau de pressage. La fraction protéique verte contient la plupart des saponines extraites (*Livingston et al., 1979*).

Golawska et Lukasik (2009) ont montré qu'il existe une corrélation opposée entre la concentration en saponines et en composés phénoliques dans les feuilles de luzerne (luzerne à faible teneur en saponines).

▪ **Colorants issus de la chlorophylle**

La chlorophylle, principal pigment assimilateur des végétaux photosynthétiques est extraite traditionnellement de la luzerne (**Figure I. 8**), de l'herbe ou encore de l'ortie, pour la coloration des aliments en vert. Cependant, au cours du procédé d'extraction et du stockage, il existe des risques de dégradation de la chlorophylle en phéophytine, composé incolore et en d'autres produits de dégradation. Ceci entraîne une modification de l'extrait, qui devient brunâtre. Cette couleur provient d'autres composés colorés présents naturellement dans la plante : xanthophylles, caroténoïdes et flavonoïdes, de couleur rouge ou brune. Cela résulte également de la production de produits de dégradation de la chlorophylle. Les facteurs responsables de la dégradation de la chlorophylle sont le pH, la température, la présence d'ions métalliques ou encore d'enzymes (*Yin et al., 2007*).

Il existe plusieurs types de chlorophylles différenciées selon leur structure chimique. Dans la luzerne, on trouve de la chlorophylle a, la plus commune du règne végétal, et de la chlorophylle b. De formule brute $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$, elles ont une masse moléculaire d'environ 900 kDa et sont localisées, sous forme d'agrégats, dans les chloroplastes des cellules végétales.

La chlorophylle est un composé non toxique à l'état naturel, mais suspecté de toxicité à forte dose (*Directive Européenne 95/45/CE, 1995*). Seuls certains solvants d'extraction sont autorisés en vue d'applications en industrie alimentaire : acétone, méthyléthylcétone, dichlorométhane, méthanol, propan-2-ol, hexane (toxiques) ; dioxyde de carbone et éthanol (non toxiques).

Le **Tableau I. 7** présente les différents colorants alimentaires, de couleur verte, obtenus à partir de la chlorophylle.

Tableau I. 7 : Les colorants alimentaires à base de chlorophylle obtenus par extraction à partir de luzerne, ortie et herbes (Directive Européenne 95/45/CE, 1995)

Dénomination du colorant	Autres appellations	Procédé d'obtention	Remarques
<u>Chlorophylles</u> (E 140 i)	- Vert naturel CI no 3 (système américain) - Chlorophylle au magnésium - Phéophytine au magnésium	Extraction par solvant	Élimination du solvant → Séparation partielle ou totale du magnésium naturel lié à la chlorophylle → Formation des phéophytines
<u>Chlorophyllines</u> (E 140 ii)	- Vert naturel CI no 5 - Chlorophylline sodique - Chlorophylline potassique	Obtention par saponification du produit d'extraction par solvant	Saponification → Suppression des groupes méthyle et ester phytol → Groupements acides neutralisés → Formation de sels de K et/ou de Na
<u>Complexes cuivriques de chlorophylles</u> (E 141 i)	- Vert naturel CI no 3 - Chlorophylle cuivrique - Phéophytine cuivrique	Obtention par addition d'un sel de cuivre à la substance obtenue par extraction par solvant	Principales matières colorantes : phéophytines cuivriques
<u>Complexes cuivriques de chlorophyllines</u> (E 141 ii)	- Vert naturel CI no 5 - Complexe cuivrique de la chlorophylline sodique - Complexe cuivrique de la chlorophylline potassique	Obtention par addition de cuivre au produit de saponification d'un extrait par solvant	Saponification → Suppression des groupes méthyle et ester phytol → Addition de cuivre aux chlorophyllines purifiées → Groupements acides neutralisés → Formation de sels de K et/ou de Na

Il faut signaler que tous les colorants alimentaires verts ne sont pas issus de la chlorophylle. Ainsi, le colorant E 142, ou vert S par exemple, est obtenu à partir d'un dérivé de goudron de houille.

Des **carotènes** (Figure I. 8) peuvent également être extraits de la luzerne. Ils sont généralement de couleur orange, même si la **lutéine** est plutôt de couleur jaune (Alves-Rodrigues et Shao, 2004). Ils sont retrouvés sous le code E 160a, parmi les carotènes mélangés, issus de plantes (les autres carotènes mélangés sont issus des algues).

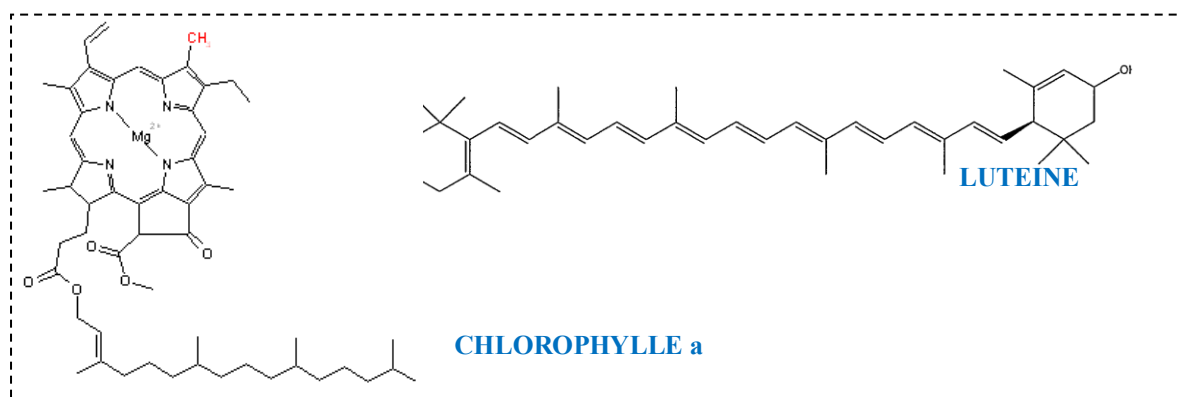


Figure I. 8 : Structures de la chlorophylle a et de la lutéine

La lutéine se trouve en forte concentration dans la macula (c'est une petite partie de la rétine, responsable de la vision centrale et de la haute acuité visuelle) dont elle constitue les seuls caroténoïdes présents dans ce tissu. Ainsi, la lutéine et la zéaxanthine (son dérivé) jouent un rôle dans la vision humaine, même si leur fonction biologique précise n'est pas encore bien connue, d'où l'émergence de compléments alimentaires à base de luzerne, même si elle est plus communément extraite du jaune d'œuf.

En outre, la luzerne est riche en vitamines du groupe B (choline, nicotinamide). Dans le fourrage vert, on trouve de la vitamine C (acide ascorbique) à une teneur d'environ 0.5 % de la matière sèche. Il faut toutefois préciser que le chauffage appliqué lors de la déshydratation la détruit partiellement. La vitamine D (calciférol), elle, augmente au cours du séchage et la quantité de vitamine E (tocophérol) diminue lorsque le nombre de coupes augmente (*Gautier et Le Gall, 2003*).

I.4. Traitement de la luzerne

I.4.1 Déshydratation thermique de la luzerne

Le séchage est la plus ancienne méthode connue de préservation des produits alimentaires. Le procédé de déshydratation consiste à enlever l'eau présente naturellement dans la plante. La déshydratation industrielle (**Figure I. 9**) par chauffage permet de sécher plus rapidement et plus complètement la plante.

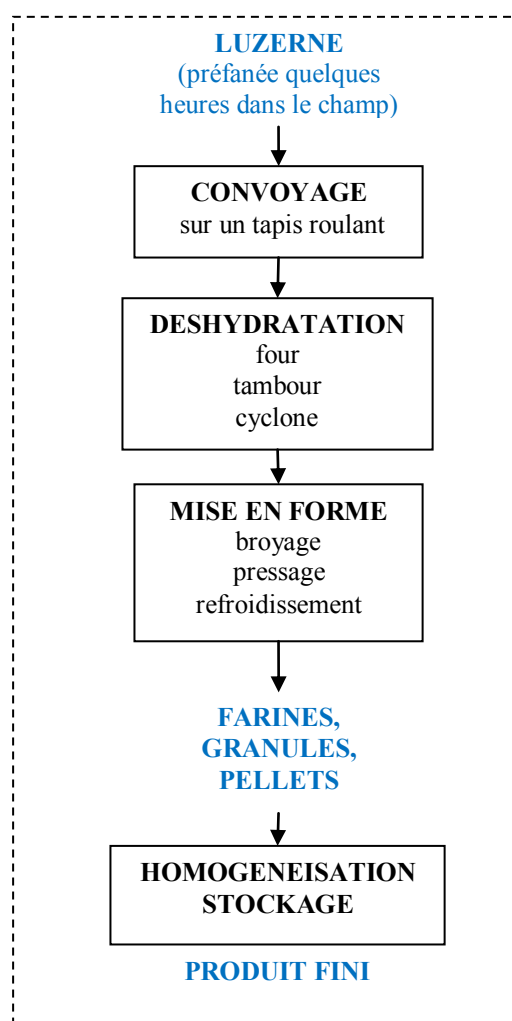


Figure I. 9 : Procédé classique de déshydratation de la luzerne
(d'après luzernes.org, 2009)

La luzerne est tout d'abord pré-fanée quelques heures au soleil dans le champ, puis déshydratée dans un tambour sécheur rotatif dès son arrivée à l'usine de traitement. Le séchage est effectué à haute température à l'aide d'un courant d'air chaud entre 600 et 800 °C en entrée de sécheur et permet le tannage des protéines (réduction de la solubilité et donc de la dégradation dans le rumen de l'animal) ainsi que la préservation des qualités alimentaires

essentielles. Cette déshydratation permet d'abaisser le taux d'humidité de la plante à 10 %. La luzerne est par la suite conditionnée selon les différentes formes désirées, nécessitant ou non un broyage : poudres, granulés, bouchons, brins longs. Enfin, le produit fini est conditionné sous atmosphère sans oxygène ou sous gaz inerte.

Lors de la mise en forme, la luzerne peut être pressée, ce qui permet l'expression d'eau résiduelle de la plante, et par conséquent la production d'un extrait liquide appelé jus vert. Ce jus, riche en protéines et en autres composés d'intérêt, peut être valorisé et doit être considéré comme un co-produit à part entière.

I.4.2 Traitement des jus verts de luzerne

Le jus vert peut être produit de plusieurs manières. Usuellement, la luzerne est tout d'abord coupée plus ou moins finement puis broyée (*Prévot-d'Alvise et al., 2004, Hernandez et al., 1998*). La pâte obtenue est ensuite pressée. Le liquide alors récolté est appelé jus vert. Il est constitué de protéines solubles issues des compartiments cellulaires tels que noyau, chloroplastes, mitochondries, cytoplasme, vacuole, ainsi que d'autres éléments constitutifs des cellules, ou des fragments de membranes lipoprotéiques (*Douillard, 1985*). Ce jus vert peut être séparé en deux fractions, généralement par décantation (*Prévot-d'Alvise et al., 2004*) ou par précipitation à chaud (*Lamsal et al., 2007, Kapel et al., 2006*) :

- Une fraction verte, composée des protéines insolubles vertes qui précipitent (issues souvent des lamelles chloroplastiques)
- Une fraction blanche, dans laquelle se trouvent les protéines solubles blanches, les minéraux, les composés solubles et les sucres constituant un jus brunâtre

Les protéines blanches sont divisées elles aussi en deux catégories (*Sheen, 1991*) : la fraction I constituée uniquement de la RuBisCO, et la fraction II, constituée des autres protéines solubles.

Des exemples de procédés industriels ont été développés afin de valoriser les jus verts produits, notamment en purifiant et concentrant les protéines.

Ainsi, le jus brun est dans la plupart des cas, selon les protocoles, concentré puis filtré, ou filtré puis concentré. Par exemple, il peut être clarifié par filtration sur filtre rotatif puis subir une précipitation acide à un pH de 4.5, donnant un concentré protéique lavé par ultrafiltration tangentielle (*Prévot-d'Alvise et al., 2004*). Dans ce procédé d'extraction, les auteurs donnent la composition du concentré protéique :

- 8 % d'azote
- 7 % de matière sèche
- 3 % d'azote non protéique
- 0.5 % de cellulose
- < 10 % de polysaccharides
- 0.6 % de cendres

La **Figure I. 10** ci-dessous présente un autre exemple de procédé d'obtention de concentré protéique (*Wattiaux et Karg, 2004*).

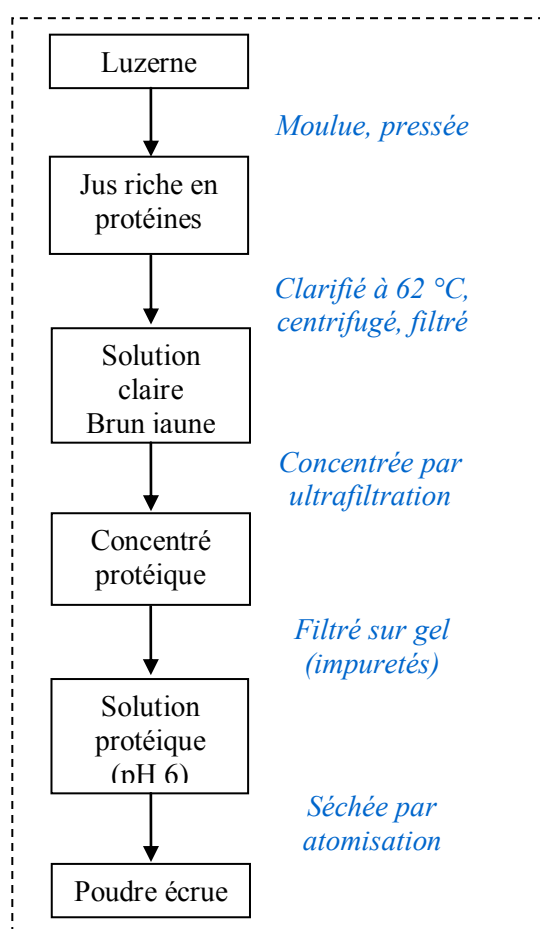


Figure I. 10 : Procédé d'obtention de poudre protéique issue de jus vert de luzerne
(*Wattiaux et Karg, 2004*)

La poudre fabriquée possède de bonnes propriétés émulsifiantes et peut servir en industrie alimentaire à la fabrication de meringues par exemple. Un procédé global de valorisation des jus verts de luzerne est présenté sur la **Figure I. 11**. Ce procédé breveté n'a pas été développé industriellement, ce qui montre les inconvénients liés à la complexité du procédé, aux nombreuses étapes nécessaires et à la quantité non négligeable de produits chimiques indispensables (acides pour diminuer le pH lors de la précipitation, sels d'ammonium pour la séparation de la RuBisCO,...).

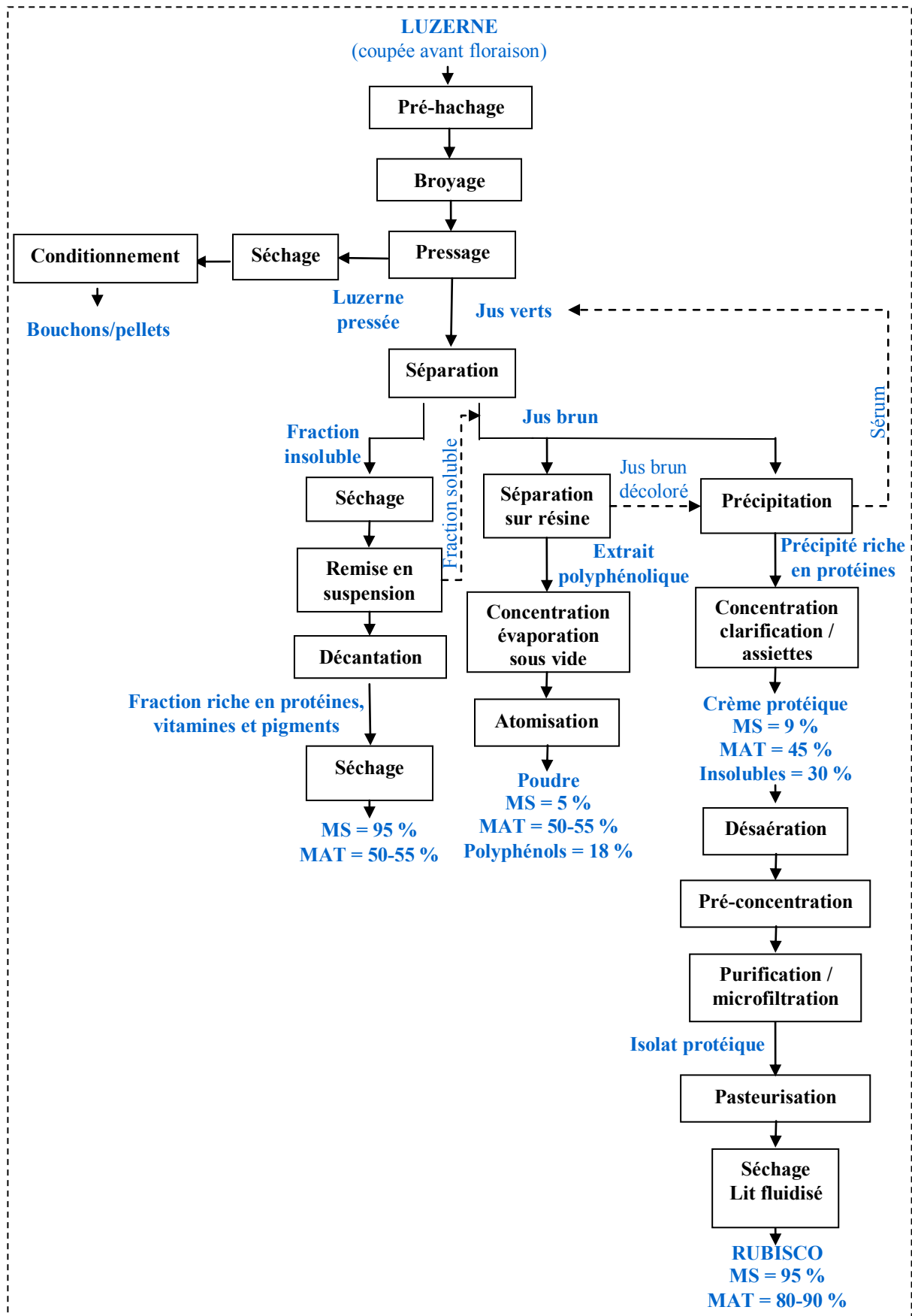


Figure I. 11 : Représentation schématique d'un procédé de valorisation des jus verts de luzerne (Brevet de Levesque et Rambourg, 2002). Les valeurs sont exprimées en pourcentages massiques. MAT est la teneur en matière azotée totale

I.4.3 Procédés de fractionnement de la plante

Même si la mise en œuvre d'un procédé de valorisation global du jus vert à l'échelle industrielle est difficile à réaliser, il existe tout de même des exemples dans lesquels la valorisation de la plante entière est possible. En effet, la **Figure I. 12** présente un exemple de traitement de la plante entière, avec à la fois la déshydratation de la partie solide, mais aussi l'obtention de concentrés riches en protéines et xanthophylles (PRO-XAN) issus des jus de pressage.

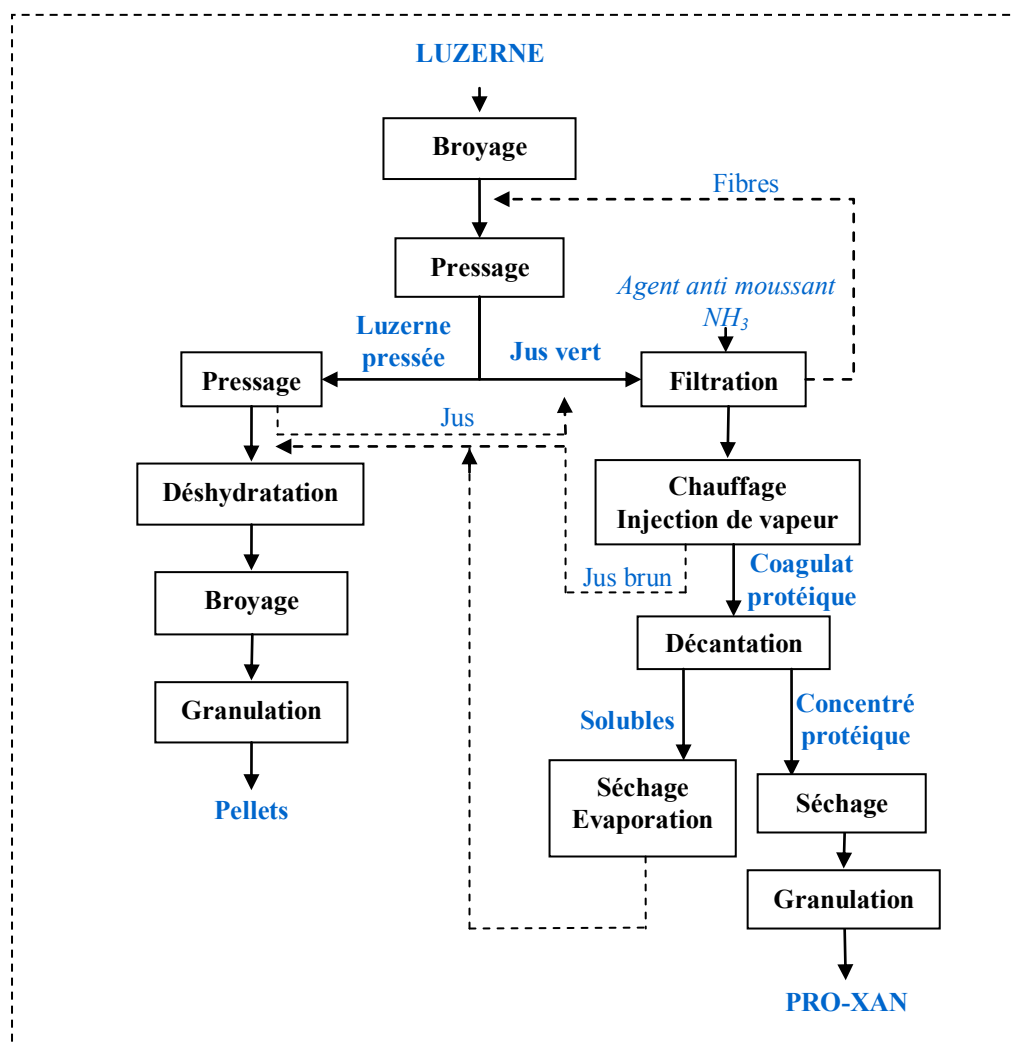


Figure I. 12 : Représentation schématique du procédé d'obtention du PRO-XAN
(Spencer et al., 1971)

La composition intéressante des feuilles de luzerne en acides aminés en fait une source intéressante pour l'alimentation humaine. Toutefois, *Miller et al., (1975)* expliquent que les protéines sont largement indisponibles pour les animaux monogastriques (dont l'homme fait partie), parce qu'elles sont associées à de grandes quantités de fibres. Le procédé PRO-XAN qui a été développé permet l'extraction de la majeure partie des protéines et des pigments

caroténoïdes du résidu fibreux insoluble. Cependant, les concentrés protéiques obtenus présentent des inconvénients, tels que leur couleur, leur faible solubilité ou encore leur flaveur grasseuse, qui sont des obstacles à leur introduction dans la formulation d'aliments. Des traitements existent, permettant d'éliminer les facteurs responsables de ces inconvénients. Par exemple, le procédé PRO-XAN II permet d'éliminer le matériau chloroplastique responsable de la couleur et en partie responsable du goût désagréable, par centrifugation. Le concentré alors obtenu contient 90 % de protéines de couleur claire, avec de bonnes propriétés fonctionnelles (*Lamsal et al., 2007*). La gamme d'utilisation en industrie alimentaire est tout de même limitée par la faible solubilité de ces concentrés. Il est alors nécessaire de faire subir aux préparations protéiques d'autres traitements permettant la conservation de leur solubilité. Cela peut être par exemple la précipitation acide, comme l'ont montré *Miller et al.,* en 1975.

I.4.4 Utilisation des autres parties de la luzerne

Lors du fractionnement de la luzerne, l'intérêt de la récupération des feuilles, notamment pour la fabrication de jus vert a été montré. Mais le pied de la luzerne peut être lui aussi intéressant dans le cadre de la valorisation de la plante entière. En effet, il est riche en lignines et en cellulose, le rendant intéressant pour la fabrication de bioéthanol (*Sreenath et al., 2001a*) ou d'acide lactique, utilisés dans le domaine de la fabrication de plastiques biodégradables, pour la confection de papier et de carton (*Adapa et al., 2004*) ou pour la nutrition des ruminants. Dans ce dernier cas, leur usage est limité car les animaux ne sont pas capables de digérer entièrement ces fibres. Ainsi, lorsque la luzerne est broyée puis pressée pour en extraire le jus, le gâteau de pressage, séché à l'air a la composition suivante (*Sreenath et al., 1999, Sreenath et al., 2001b*) :

- 33 % de cellulose
- 18 % d'hémicelluloses
- 8 % de lignines
- 11 % de protéines
- 9 % de cendres
- 22 % d'autres matières solubles (sucres, pigments, minéraux)

L'acide lactique peut être produit à échelle industrielle, par fermentation, ou synthèse chimique. Une forte demande en acide lactique d'origine naturelle existe actuellement. En effet, ce produit et certains de ses dérivés sont souvent utilisés en tant qu'ingrédients pour la

formulation d'aliments (produits laitiers, boissons, ...) ou pour la fabrication de plastiques biodégradables (*Sreenath et al., 2001a*).

Le biocarburant le plus communément répandu à ce jour est le **bioéthanol**. Il est produit à partir de sucre ou d'amidon. Toutefois, ces matières premières d'origine végétale ne sont pas suffisantes si on envisage la diffusion à grande échelle de ce genre de carburant. En outre, la réduction d'émission de gaz à effet de serre n'est pas aussi importante que ce qui est souhaitable, pour de l'éthanol produit à partir de sucre ou d'amidon. C'est pourquoi la production d'éthanol à partir de matériaux lignocellulosiques est intéressante.

On peut déjà trouver sur le marché des carburants du bioéthanol, produits à des prix compétitifs à partir du sucre au Brésil et à partir de l'amidon aux Etats-Unis (*Hahn-Hagerdal et al., 2006*).

Le principe de production de bioéthanol ou d'acide lactique à partir des fibres de luzerne est globalement analogue. Il est décrit ci-après.

Pour obtenir les fibres de luzerne, cette dernière est macérée dans un appareil rotatif, puis le jus vert est extrait sous presse. La pâte est alors séchée à l'air, puis prétraitée par de l'eau chaude (*Sreenath et al., 1999*). Les molécules hydrosolubles sont extraites en conditions aqueuses à chaud, en conditions basiques ou acides tandis que le résidu solide, constitué principalement de cellulose, peut alors être hydrolysé, pour libérer le glucose qui est fermenté en éthanol. Si le résidu est peu purifié, il contient des hémicelluloses qui peuvent également être hydrolysées et converties en éthanol par des microorganismes spéciaux (*Hahn-Hagerdal et al., 2006*).

Le rendement en sucres pouvant être fermentés est fonction de la concentration et de la composition en glucides, et de l'efficacité avec laquelle les polysaccharides des parois sont convertis en sucres simples (*Samac et al., 2006*). Si les microorganismes utilisés sont des Lactobacilles (*Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus debrueckii* notamment), il y a fermentation lactique et donc production d'acide lactique.

Les deux étapes (hydrolyse pour libération de sucres et fermentation) peuvent être réalisées de manière successive (SHF : Separate Hydrolysis and Fermentation) ou simultanée (SSF : Simultaneous Saccharification and Fermentation) (*Sreenath et al., 2001a, Sreenath et al., 2001b*). Enfin, une purification finale doit être menée. Elle est réalisée généralement par distillation et évaporation. A la fin du procédé, il reste un résidu, composé principalement de

lignine. Celle-ci peut être brûlée, produisant de la chaleur et de l'électricité. Le reste est utilisé en tant que co-produit.

I.4.5 Concept de bioraffinerie verte

Les usines de séchage de plantes (et la luzerne en est un exemple) produisent de grandes quantités de jus du fait de l'étape de pressage avant le séchage pour réduire les coûts énergétiques. Valoriser ces jus, en même temps que valoriser le reste de la plante, dans une seule usine est le but de ce qu'on appelle la bioraffinerie verte.

Il existe plusieurs types de bioraffineries selon le produit de départ : bioraffineries à partir de matériaux ligno-cellulosiques (matière première sèche, biomasse et résidus à haute teneur en cellulose), à partir de plantes industrielles entières (maïs), ou bioraffineries dites « vertes », à partir de biomasse humide (herbe, luzerne, trèfle).

Selon *Kamm et Kamm (2004)*, les bioraffineries vertes représentent des systèmes technologiques complexes, écologiques et économiques pour l'utilisation et l'exploitation raisonnée de matière première constituée de biomasse verte (*Andersen et Kiel, 2000*). Un exemple de concept de bioraffinerie verte appliqué à une plante entière est décrit sur la **Figure I. 13**.

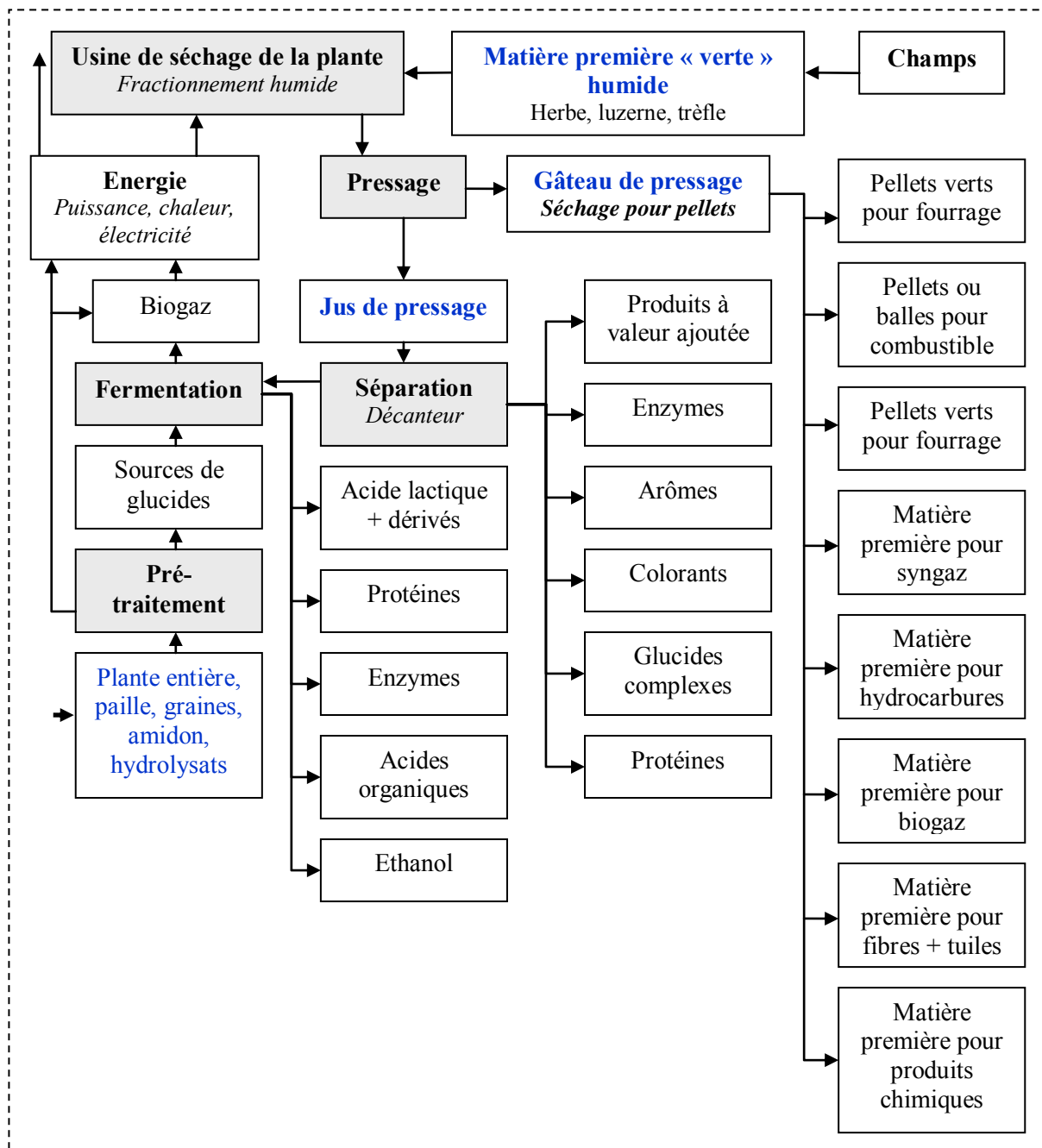


Figure I. 13 : Système de bioraffinerie verte combinée avec une installation de séchage
 D'après un concept de Havelland-Biorefinery, Selbelang, Germany (Kamm et Kamm, 2004)

La plante est pressée, de manière à séparer un gâteau de pressage et un jus vert riche en nutriments. En plus de la cellulose et de l'amidon, le gâteau contient des pigments et des colorants d'intérêt, ainsi que des acides organiques valorisables. Le jus vert contient des protéines, des acides aminés libres, des acides organiques, des colorants, des enzymes, des hormones et d'autres substances organiques ou minérales. En particulier, l'application de méthodes biotechnologiques est prédestinée pour la conversion, car l'eau de la plante peut être utilisée pour plusieurs traitements ultérieurs simultanés. En outre, les composites ligno-

cellulosiques ne sont pas aussi résistants que ceux des matériaux tels que la paille, donc peuvent être hydrolysés en nécessitant moins de prétraitements (*Kamm et Kamm, 2004*).

En outre, la compétition entre usage en alimentaire et dans le domaine de la production de biocarburant est atténuée pour les bioraffineries, puisque le gâteau de pressage est valorisé pour l'alimentation animale, et pas uniquement comme biomasse destinée à la valorisation énergétique.

Toutefois, la mise en place de telles installations n'est pas facile. Par exemple, la conservation de grandes quantités de jus reste un problème, car l'évolution du jus entraîne la formation de composés de dégradation non souhaitables, et ayant une odeur désagréable. Une solution envisagée est l'acidification du jus au moyen de la fermentation lactique, qui stabilise le jus (*Novalin et Zweckmair, 2009, Andersen et Kiel, 2000*).

II. OPERATIONS UNITAIRES UTILES AU FRACTIONNEMENT DE MATIERE VEGETALE

Pour la mise en place d'un procédé de fractionnement global d'une plante comme la luzerne, il est nécessaire de maîtriser chacune des étapes conduisant au produit fini. Dans le cadre de la thèse, nous avons décidé de produire un extrait vert liquide en utilisant la technologie d'extrusion bi-vis. Cette technique permet le fractionnement thermo-mécanico-chimique de la plante, dans un seul appareil. Une première étape de séparation liquide/solide entre un filtrat, le jus vert, et un gâteau solide est réalisée. Pour le traitement ultérieur du jus produit, une étape d'ultrafiltration sera nécessaire, avant la séparation des protéines par chromatographie. Cette partie décrit trois des opérations mises en œuvre pour le fractionnement de la luzerne : l'extrusion bi-vis, l'ultrafiltration et les techniques de chromatographie d'adsorption.

II.1. L'extrusion bi-vis

L'extrusion est un procédé par lequel une matière chauffée est poussée à travers un orifice de faible diamètre. La mise en forme de produits peut être réalisée par extrusion lorsque la sortie de l'appareil est munie d'une filière de la taille et de la forme désirées. Le développement des procédés d'extrusion résulte d'un transfert de connaissances entre l'industrie des polymères synthétiques et l'agro-alimentaire.

II.1.1 Présentation générale du procédé d'extrusion

Le principe de l'extrusion repose sur l'utilisation d'une vis sans fin, système en lui-même très ancien puisque son invention remonte à Archimède. Le premier procédé d'extrusion proprement dit a été breveté en 1797 par un inventeur anglais, Joseph Bramah, qui est également à l'origine de la presse hydraulique. La machine, utilisée pour la fabrication de tubes de plomb, comprenait une vis sans fin, tournant dans un fourreau. Le procédé d'extrusion a par la suite été développé à partir de 1820 par Thomas Burr lors de l'élaboration d'une presse à injection. En 1894, le procédé est adapté à la production d'alliages à base de cuivre. L'extrusion mono-vis a ensuite été utilisée couramment dans le domaine de l'alimentaire, pour la fabrication de saucisses et de pâtes alimentaires par exemple. Le procédé, utilisé dès le début du XX^{ième} siècle sur les matériaux synthétiques, notamment dans

le domaine du caoutchouc, s'est par la suite développé dans l'industrie des matières thermoplastiques. Les premières extrudeurs bi-vis qui ont été employées sont les machines contra-rotatives de l'industrie du caoutchouc et du pétrissage de pâtes. Elles sont apparues vers les années 1880. Les premières machines co-rotatives sont nées vers 1935 en Italie.

L'extrusion est très couramment utilisée dans l'industrie agro-alimentaire, notamment la cuisson-extrusion, pour la pré-cuisson des céréales et des oléagineux pour l'alimentation animale, la fabrication de snacks et de céréales pour le petit-déjeuner ou encore pour la texturation de protéines végétales (*Roussel, 2000*).

Les extrudeurs mono-vis et bi-vis diffèrent essentiellement par leur technique de transport. Dans le cas de l'extrudeur mono-vis, ce sont les forces de frottement entre la vis et la matière première qui permettent le transport de celle-ci. L'efficacité du convoyage dépend donc de l'adhérence de la matière sur le fourreau. En effet, si la matière colle à la vis, l'ensemble tourne à l'intérieur du fourreau. Il faut donc utiliser de longs fourreaux, et des vitesses de rotation de vis faibles. En ce qui concerne les extrudeurs bi-vis, une des vis vient s'insérer en permanence dans le chenal de l'autre, ce qui empêche la matière de coller, donnant ainsi la propriété aux vis d'être « auto-nettoyantes ». Le transport peut également être efficace malgré une longueur de fourreau plus faible si la vitesse de rotation est plus élevée. La grande variété de profils de vis qu'on peut employer dans ce type d'appareillage, et donc la variété de géométrie qui en découle permet le traitement de matières premières de composition diversifiée.

L'extrusion bi-vis (**Figure I. 14**) permet de combiner des actions mécanique, thermique et chimique, dans un même appareil. En outre, plus récemment, les domaines d'utilisation de la technologie bi-vis ont été élargis, avec par exemple le fractionnement de la matière végétale (*Rigal, 2000*). Ainsi, l'extraction de solutés contenus dans des matrices végétales est possible, et différentes opérations peuvent être enchaînées : broyage et trituration de la matière, imprégnation par un solvant, cisaillement, compression et détente de la matière ou encore séparation liquide/solide entre un extrait liquide riche en solutés extraits (huiles essentielles, fractions lipidiques et protéiques, sucres,...) et un raffinat solide.

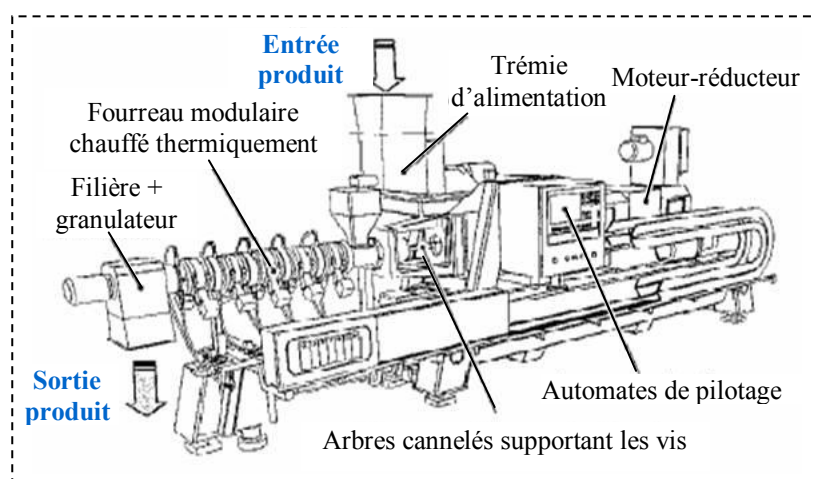


Figure I. 14 : Schéma d'une installation d'extrusion bi-vis

II.1.2 Les éléments constitutifs de l'extrudeur bi-vis pour le traitement de la matière

L'extrudeur bi-vis est constitué de deux arbres insérés dans un fourreau. Sur ces arbres sont disposées deux séries de vis sans fin co-rotatives et co-pénétrantes. L'agencement des différents types de vis sur l'arbre permet d'obtenir différents degrés de déstructuration de la matière et donc des résultats différents. Le profil de vis doit ainsi être choisi en fonction de l'effet souhaité sur la matière première.

Le principe de l'extrusion bi-vis repose ainsi sur la succession des différents éléments de vis constituant les arbres de rotation. Le choix et l'agencement des types de vis sont primordiaux pour obtenir l'action désirée sur la matière.

Ces différentes catégories de vis sont décrites ci-après.

II.1.2.1 Les vis de convoyage : des vis à pas direct

Les vis de convoyage assurent, comme leur nom l'indique, le transport de la matière introduite dans la machine le long de l'axe. Dans une moindre mesure, elles exercent également une action de mélange et de cisaillement de la matière. Deux types de vis de convoyage sont utilisés :

- **Les vis T2F ou C2F, à double filet.** Les vis T2F sont trapézoïdales. Cela signifie que les vis ne sont pas auto-nettoyantes, mais possèdent de meilleures propriétés de convoyage que les vis de type C2F (qui sont, elles autonettoyantes), et surtout, permettent de happer la matière introduite dans l'extrudeur. Ainsi, ce genre de vis est

souvent placé en tout début de profil de manière à améliorer l'avalement de la matière première.

- **Les vis C1F à simple filet.** Le sommet du filet est plus large, ce qui a pour conséquence une meilleure poussée que les vis à double filet, mais également un cisaillement plus important sur la matière. Ces vis permettent une augmentation de la compression de la matière, et aussi son auto-échauffement.

II.1.2.2 Les vis à pas inverse ou contre-filets

Ce sont des éléments de vis qui jouent un rôle crucial dans le profil. Ils exercent une action de mélange et de cisaillement intenses de la matière et assurent la mise sous pression de celle-ci en contribuant à la formation d'un bouchon dynamique (**Figure I. 15**). Ils sont indispensables à la séparation d'une phase liquide et d'une phase solide par pressage de la matière mélangée contre le bouchon dynamique. Le liquide ainsi produit par pressage peut être récupéré par filtration, le module de filtration étant placé en amont des contre-filets (*Rigal, 1997 ; Martelli, 1983*). Deux types de contre-filets sont détaillés ici :

- **Les vis CF2C**, de forme conjuguée et à double filet. La matière est comprimée dans ces contre-filets mais peut tout de même s'écouler grâce à la présence de rainures, qui permettent le passage de la matière sous la poussée exercée par les vis à pas direct.
- **Les vis CF1C**, de forme conjuguée et à simple filet. Ces vis assurent un pressage encore meilleur de la matière, car ils exercent une contre poussée plus grande. Elles permettent également un cisaillement plus important.

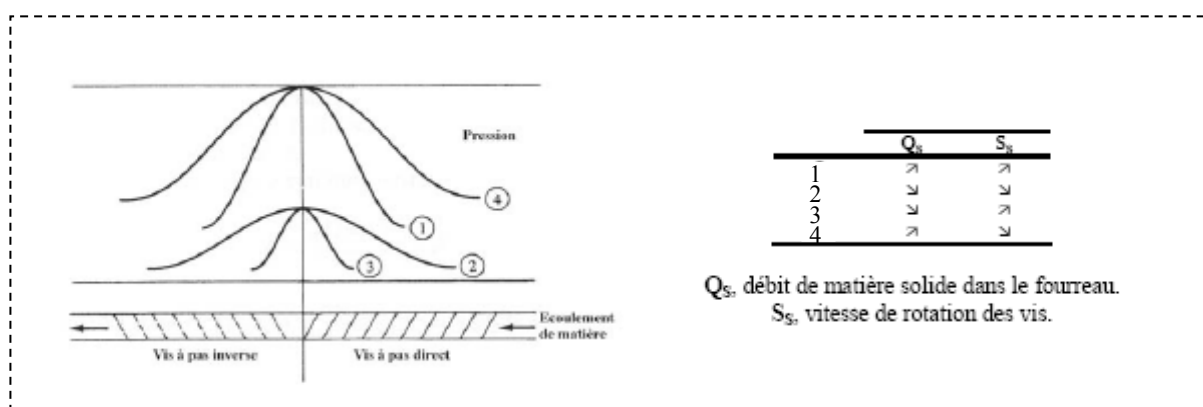


Figure I. 15 : Représentation schématique du principe de formation du bouchon dynamique au niveau des éléments de vis à pas inverse (*Martelli, 1983*)

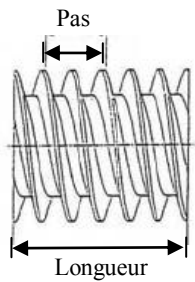
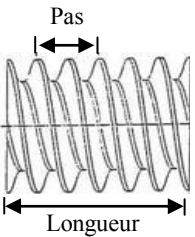
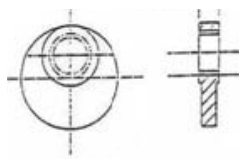
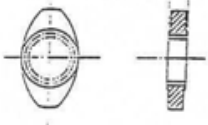
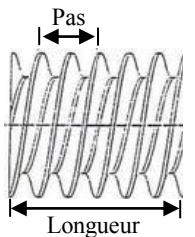
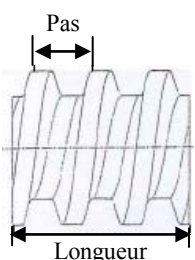
II.1.2.3 Les éléments restrictifs

Les éléments restrictifs n'ont pas d'effet de convoyage de la matière, mais, placés après des éléments de transport, ils servent à augmenter l'effet de mélange et de cisaillement, ainsi que le temps de séjour de la matière et favorisent l'échange thermique entre la matière végétale et le fourreau. Les éléments restrictifs sont des disques malaxeurs dont on trouve deux types :

- **Disques malaxeurs monolobes** (DM ou MAL0). Leur action de mélange est limitée. En revanche, leur action cisailante est forte et ils exercent un fort effet de compression radiale de la matière, qui est écrasée contre la paroi du fourreau.
- **Disques malaxeurs bilobes** (BB ou MAL2). Ce sont les éléments de disque exerçant le plus fort effet cisailant sur la matière dont ils permettent également un mélange intime.

Ces éléments font un centimètre de longueur, et sont souvent enchaînés par dizaine. Selon leur angle de montage (45° , 90°), ils exercent une action plus ou moins forte de convoyage et de compression axiale sur la matière. En effet, ils peuvent être arrangés de manière à former une vis hélicoïdale et donc assurant un convoyage de la matière. Ils peuvent aussi être montés en quinconce, créant un élément de pas neutre n'entraînant pas de convoyage. On utilise ce type d'éléments lorsqu'on souhaite réaliser l'extraction de constituants inclus dans la structure cellulaire.

Tableau I. 8 : Eléments de vis utilisés sur l'extrudeur bi-vis Clextral BC45 et leurs caractéristiques

	Dénomination	Schéma	Mélange	Cisaillement	Convoyage	Remarques
Vis à pas direct	Trapézoïdale double filet (T2F)		+	+	+++	- Non autonettoyantes - Augmentent l'avalement de la matière dans la zone d'alimentation
	Conjuguée double filet (C2F)		+	+	+++	Autonettoyantes
Éléments restrictifs	Disque malaxeur monolobe (DM)		++	+++	+	- Cisaillement plus important que les BB - Compression radiale - Augmentent le temps de séjour
	Disque malaxeur bilobe (BB)		+++	++	0 (pour montage à 90°)	- Forte action de mélange - Convoyage plus ou moins important selon l'angle de montage - Augmentent le temps de séjour
Vis à pas inverse	Contre-filet à double filet conjugué (CF2C)		++++	++++	---	- Forte contre-pression - Augmentent le temps de séjour - Entraînent la formation d'un bouchon de matière
	Contre-filet à simple filet trapézoïdal (CF1C)		++++	+++++	---	- Très forte contre-pression - Augmentent le temps de séjour - Entraînent la formation d'un bouchon de matière

II.1.3 Modularité et avantages de la technologie bi-vis

Différentes zones peuvent être délimitées dans l'extrudeur bi-vis, chacune remplissant un rôle précis dans le procédé.

Entre l'entrée et la sortie de la machine, la matière première subit d'importantes transformations. Quatre zones distinctes sont définies conventionnellement dans l'extrudeur bi-vis. Il faut signaler que la dénomination et la fonction des différentes zones varient lorsque la matière traitée est une matière plastique ou lors de la cuisson-extrusion. Dans le cas du traitement de matière végétale, les zones que l'on peut définir dans l'extrudeur sont les suivantes :

- **La zone d'alimentation** : elle débute par une trémie d'alimentation volumétrique qui permet l'introduction et le convoyage de la matière vers la zone de préparation. Les éléments de vis dans cette partie doivent être choisis de manière à permettre un transport rapide de la matière dans le fourreau. Des vis de convoyage, à pas direct seront donc utilisées dans cette partie.
- **La zone de préparation de la matière** : elle est destinée à broyer, aplatir et cuire (pour de la cuisson-extrusion). Les éléments de vis dans cette zone doivent également permettre le convoyage de la matière. On y trouve en outre des éléments permettant un effet de compression de la matière.
- **La zone de filtration** : elle permet la séparation liquide/solide. Un filtre est monté sur le fourreau de l'extrudeur bi-vis, permettant la récupération d'un filtrat.
- **La zone de pressage** : dans cette zone sont disposés les éléments restrictifs, formant une zone dans laquelle les vis sont à pas inverse. Leur présence juste en sortie du module de filtration va entraîner la formation d'un bouchon dynamique de filtration. La décroissance du pas de vis dans le module de filtration assure la mise sous pression de la matière contre ce bouchon formé, ce qui améliore l'extraction de la matière végétale. Les fentes présentes sur les contre-filets permettent la progression de la matière, et donc un renouvellement dans cette zone de pression. La matière extrudée est ensuite convoyée vers l'extérieur du fourreau.

La combinaison des différents types de vis permet d'appliquer différentes contraintes à la matière. Par exemple, en diminuant le pas des vis de convoyage, une zone de compression de la matière est créée, alors que si on place les vis selon un pas croissant, une zone de détente sera à son tour appliquée à la matière. Une succession de zones de compression et de détente peut ainsi être mise en place, permettant l'amélioration de l'imprégnation de la matrice

végétale si un solvant a été introduit dans la machine. En outre, la compression exercée sur la matière est d'autant plus forte que la présence d'éléments restrictifs, gênant la progression de la matière, est importante. Le profil de vis est le principal facteur influençant la qualité des fractions récoltées en fin de procédé d'extrusion, et donc agissant sur l'efficacité de l'extrusion en agissant sur la distribution des temps de séjour et sur l'énergie transmise lors du procédé.

Ainsi, la combinaison d'éléments de vis à pas inverse et d'éléments malaxeurs permet la diminution du flux de matière et facilite l'action de mélange et la transmission d'énergie (Gogoi *et al.*, 1996 ; Choudhury *et al.*, 1998).

De nombreuses opérations élémentaires peuvent être menées dans l'extrudeur bi-vis, à la différence de ce qu'il est possible de réaliser avec des presses conventionnelles, selon Rigal, (1997) :

- | | |
|-----------------------------|------------------------------------|
| - Convoyage | - Extraction liquide/solide |
| - Broyage | - Séparation liquide/solide |
| - Cisaillement | - Séchage |
| - Mélange | - Extrusion |
| - Réaction chimique | - Introduction de solides et/ou de |
| - Chauffage/refroidissement | liquides |

Le temps de séjour de la matière à l'intérieur de l'extrudeur est fonction des paramètres de fonctionnement et de la configuration du profil de vis, et varie de quelques dizaines de secondes à quelques minutes.

II.1.4 Intérêt de l'utilisation de la technologie bi-vis pour le traitement de matière végétale : exemple des travaux menés au LCA

La technologie d'extrusion bi-vis a en effet déjà été employée dans de nombreuses études pour l'extraction ou la transformation de solutés à partir de matière végétale. Ainsi, on trouve par exemple dans la littérature des études sur l'extraction d'hémicelluloses à partir de matières ligno-cellulosiques (N'Diaye *et al.*, 1996, N'Diaye *et Rigal*, 2000,) ou encore la paille et le son de blé (Maréchal, 2001). Il est également possible d'employer la technologie bi-vis pour la transformation et la texturation de protéines végétales, extraites par exemple du tourteau de tournesol ou de maïs (Wasserman *et al.*, 1992, Silvestre *et al.*, 1999).

II.2. Séparation membranaire

II.2.1 Les procédés de séparation membranaire

Les procédés à membranes sont employés couramment dans l'industrie chimique et agroalimentaire, pour une large gamme d'applications. Ils permettent entre autres de purifier, fractionner ou concentrer des phases liquides (*Baker, 2004*). C'est le cas par exemple de l'ultrafiltration, appliquée dans l'industrie laitière pour la concentration du lait dans le procédé de fabrication du Cheddar (*Jameson, 1987*), ou employée sur des extraits de luzerne afin de séparer des protéines d'intérêt (*Koschuh et al., 2004*).

La différence de vitesse de transport entre les molécules, à l'interface avec la membrane, permet la séparation des solutés et est à l'origine de la sélectivité des membranes. Trois grands types de filtration sont définis, selon la force motrice appliquée : filtration sous gradient de pression, filtration sous gradient de concentration et filtration sous gradient de potentiel électrique. Une autre manière de classer les techniques consiste à les séparer selon la taille des pores (**Tableau I. 9**).

Tableau I. 9 : Classification des techniques de séparation membranaire selon la taille des pores de la membrane et les molécules séparées (d'après *Baker, 2004*)

Technique de séparation	Diamètre moyen des pores	Force motrice	Exemples de molécules séparées
Microfiltration	10 – 0.1 μm	Gradient de pression	Petites particules, colloïdes, bactéries
Ultrafiltration	0.1 μm – 5 nm	Gradient de pression	Macromolécules, émulsions
Nanofiltration	1 – 5 nm	Gradient de pression	Molécules de faible poids moléculaire (sucres, sels)
Osmose inverse	< 1 nm	Gradient de pression	Sels
Electrodialyse	< 5 nm	Gradient de potentiel électrique	Molécules organiques
Electrofiltration	10 μm – 5 nm	Gradient de potentiel électrique	Petites particules, colloïdes, bactéries, macromolécules, émulsions
Dialyse	< 5 nm	Gradient de concentration	Métabolites, sels minéraux
Perméation de gaz	Molécules de gaz	Gradient de pression partielle des molécules	Mélanges gazeux

A l'issue d'une filtration sur membrane, deux fractions sont obtenues : **le rétentat** ou concentrat, composé des molécules retenues par la membrane, et **le perméat** (Causserand, 2006). Les membranes sont dites perméselectives car elles favorisent le transfert de certaines molécules ou particules par rapport aux autres.

Les caractéristiques structurales et de transfert des membranes (perméabilité hydraulique et courbe de sélectivité) sont des données importantes à acquérir pour le choix des membranes, car elles permettent de se renseigner sur les performances de la membrane (débit de perméat attendu, tailles des molécules retenues par la membrane).

II.2.2 L'ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique membranaire de séparation, utilisée pour séparer des particules de faible taille (entre 0.1 μm et 5 nm, **Tableau I. 9**) ou des molécules dissoutes dans des fluides. Les molécules plus grosses que la taille des pores membranaires seront retenues à la surface de la membrane et concentrées durant le procédé d'ultrafiltration.

Comparée aux procédés ne mettant pas en œuvre des membranes, tels que la chromatographie, la dialyse, l'extraction par solvant ou la chromatographie, l'ultrafiltration présente les avantages suivants (Saxena *et al.*, 2008) : elle est plus douce pour les molécules, ne requiert pas d'extraction organique pouvant dénaturer les protéines, ne modifie pas la teneur en ions et le pH du milieu, est rapide et relativement peu coûteuse, peut être mise en œuvre à des températures peu élevées (par exemple en chambre froide) et peut simultanément permettre la concentration et la purification des molécules.

II.2.2.1 Caractéristiques des membranes

Le **seuil de coupure de la membrane** (MWCO : Molecular Weight Cut-Off) représente le poids moléculaire de la plus petite molécule globulaire retenue à 90 % par la membrane et permet ainsi de décrire les propriétés de la membrane choisie. Cependant, il faut préciser que la forme de la molécule peut avoir un effet direct sur sa rétention par la membrane. Par exemple, des molécules linéaires telles que l'ADN peuvent passer à travers les pores qui vont retenir des molécules globulaires de même poids moléculaire.

La performance de la séparation est évaluée à partir de deux caractéristiques : la **perméabilité** (densité de flux volumique de filtration), qui conditionne la productivité de

l'opération, et la **sélectivité**, qui représente l'efficacité de la membrane à retenir certains solutés (Aimar et al., 2010).

Ainsi, sont listés dans le **Tableau I. 10** différents paramètres ayant une influence directe sur la sélectivité de la membrane.

Tableau I. 10 : Paramètres favorisant ou diminuant le passage de molécules à travers la membrane lors de l'ultrafiltration (Causserand, 2006)

Paramètres favorisant le passage des molécules	Paramètres diminuant le passage des molécules
Concentration < 1 mg.mL ⁻¹	Concentration > à 1 mg.mL ⁻¹ ou présence d'autres molécules qui augmentent la concentration de l'échantillon
Traitement de molécules linéaires plutôt que globulaires	Application de conditions de tampons permettant aux molécules de s'agglomérer
Application d'une forte pression transmembranaire	Pression transmembranaire plus faible
Utilisation de tampons favorisant la rupture des molécules	Adsorption des molécules sur la membrane
pH et conditions entraînant un changement de conformation ou la formation d'agrégats	Faibles températures (4 °C par rapport à 24 °C par exemple)

La filtration sous pression peut être mise en œuvre de deux manières différentes soit en filtration frontale, soit en filtration tangentielle (**Figure I. 16**).

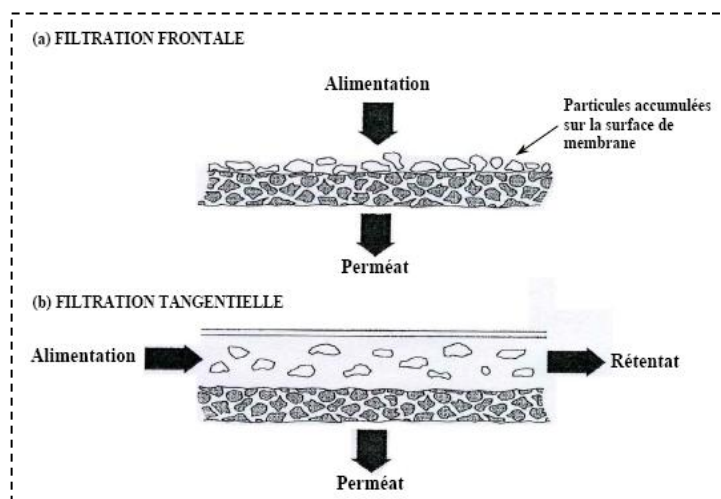


Figure I. 16 : Représentation schématiques des filtrations frontales et tangentielles (Baker, 2004)

Dans le cas de la **filtration frontale**, la solution d'alimentation arrive perpendiculairement à la membrane. Ce type de filtration entraîne la formation d'un dépôt de particules en surface de la membrane, dont l'épaisseur augmente au cours du temps,

provoquant une diminution rapide du flux de perméat. Un lavage régulier de la membrane est nécessaire, rendant l'opération discontinue. Ce type de procédé est utilisé majoritairement pour le traitement des eaux.

Concernant la **filtration tangentielle**, le flux de solution à traiter arrive comme son nom l'indique, tangentiellement à la membrane. Les particules qui se déposent à la surface de la membrane, lors de la filtration, subissent un cisaillement dû au flux tangentiel, ce qui évite la formation d'une couche de dépôt trop importante. Ainsi, cette opération est continue puisque le flux de perméat n'est pas limité par la résistance causée par le dépôt à la surface de la membrane. C'est par conséquent ce type de filtration qui est le plus utilisé à l'échelle industrielle.

La filtration sous pression est possible avec des membranes ayant des structures ou des compositions différentes. La **Figure I. 17** représente les principaux types de structure membranaire.

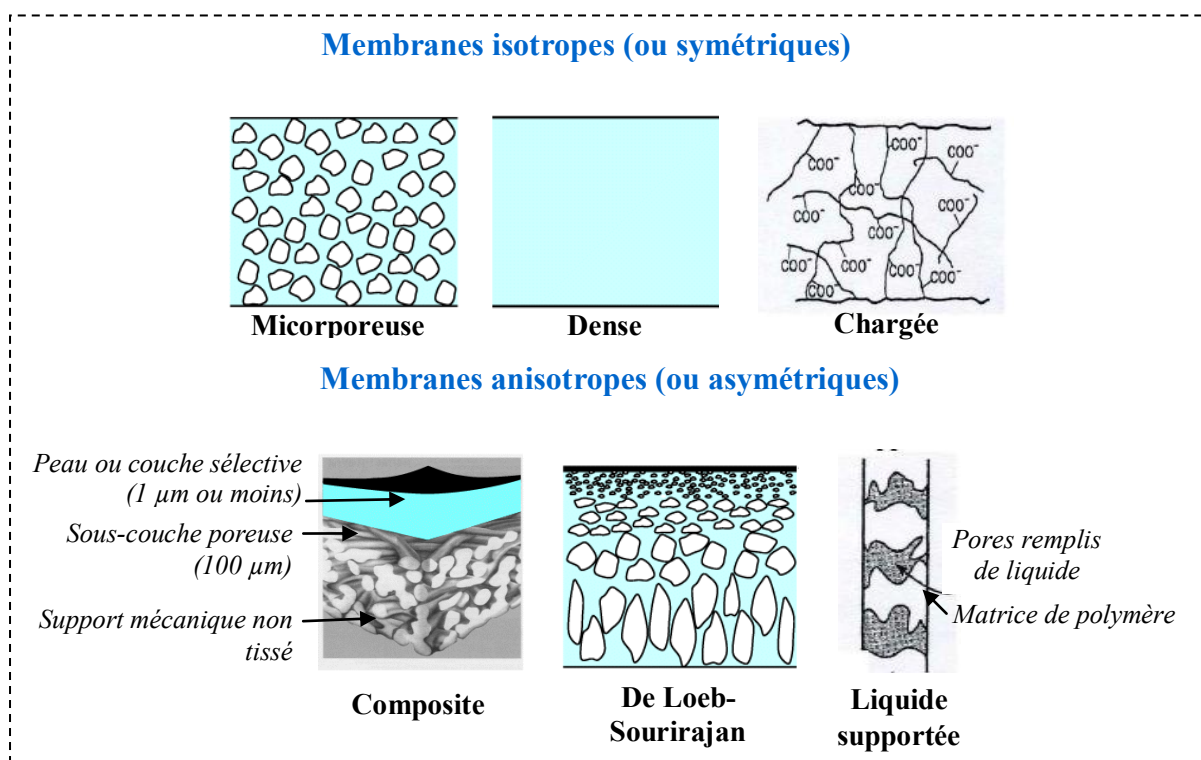


Figure I. 17 : Représentations schématiques des principaux types de structure membranaire
(Baker, 2004, Rémy et Desclaux, 2007)

Les membranes isotropes ont une structure homogène et fonctionnent comme un filtre conventionnel, avec des pores interconnectés, de diamètre compris entre 0.01 et 10 µm.

Ce type de membrane a tendance à colmater rapidement : elles sont donc peu utilisées à l'échelle industrielle.

Les membranes anisotropes sont constituées de couches ayant des propriétés différentes. Elles sont constituées de deux parties distinctes :

- La peau, partie hautement sélective à porosité faible, d'une épaisseur de l'ordre du micromètre et à haute perméabilité. Les performances de la membrane dépendent des performances de cette peau. C'est elle qui est en contact avec le fluide à filtrer.
- La sous-couche poreuse, qui constitue la plus grande partie de la membrane. Sa porosité est importante, et est associée à de larges pores. Elle n'est pas sélective et n'a pas d'influence sur la perméabilité globale de la membrane. C'est cette partie qui apporte de la résistance mécanique à la membrane.

Un type de membrane asymétrique a été développé (*Loeb et Sourirajan, 1962*), avec des pores de taille croissante selon l'axe transversal, empêchant les molécules de rester bloquées lors de leur traversée de la couche filtrante. Ce sont ces membranes qui possèdent le plus d'applications industrielles.

Les membranes composites sont quant à elles constituées d'un assemblage de deux ou plusieurs couches de matériaux ayant des compositions chimiques et des porosités différentes. Elles ont été développées afin d'augmenter la perméabilité des membranes en diminuant l'épaisseur de la couche sélective. Dans les autres couches, la porosité augmente, permettant la tenue mécanique de la couche sélective. Ces membranes sont essentiellement planes ou tubulaires, pour la nanofiltration et l'osmose inverse.

Différents types de modules de filtration sont utilisés pour la séparation membranaire. Les caractéristiques de ces modules sont regroupées dans le **Tableau I. 11**.

Tableau I. 11 : Caractéristiques des différents types de modules de membranes
(Belfort et al., 1994, Baker, 2004)

	Fibre creuse	Spirale	Plan	Tubulaire
Configuration	Tubes de diamètre entre 0.5 et 2 nm en polymère organique, regroupés dans un carter en PVC Filtration de l'intérieur vers l'extérieur ou l'inverse	Une ou plusieurs feuilles membranaires entourées plusieurs fois autour d'un axe poreux Alimentation dans le sens de l'axe ou perpendiculairement Membranes souvent dans un carter en PVC	Basés sur le principe des filtres presses Feuilles de membranes empilées créant une superposition de canaux	Membranes en forme de tubes percés d'un ou plusieurs canaux Rétentat sortant à l'extrémité du tube, perméat sortant latéralement Membranes introduites dans un carter en inox permettant la mise sous pression
Applications	Ultrafiltration frontale surtout	Principalement osmose inverse, mais aussi nano et ultrafiltration	Traitement des molécules sensibles au cisaillement Industrie pharmaceutique	Solutions contenant des particules (canaux de diamètre entre 0.5 nm et 3 cm) Industrie alimentaire
Surface de membrane	Très grande	Moyenne	Moyenne	Très petite
Cisaillement	Très faible	Moyen	Moyen	Très fort
Dimensionnement	Facile	Facile	Assez difficile	Difficile
Flux de perméation	Faible	Faible	Elevé	Elevé
Tendance au colmatage	Très forte	Forte	Moyenne	Très faible
Coût de fabrication (\$·m⁻²)	5-20	5-100	50-200	50-200
Perte de charge	Grande	Modérée	Faible	Faible
Adaptation à haute pression	Oui	Oui	Oui	Limitée

Pour caractériser l'efficacité de la séparation membranaire, plusieurs paramètres peuvent être calculés. Ainsi, la **pression transmembranaire** (PTM) appliquée permet de caractériser la force agissante, permettant le passage de la solution à travers la membrane. La quantification du **flux de perméation** (J exprimé en $m \cdot s^{-1}$ ou $L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$) montre la productivité du système, tandis que le **taux de rejet** (T_R) permet de décrire la sélectivité de la membrane pour une molécule précise, et permet de quantifier son efficacité pour retenir cette molécule en particulier. Enfin, le **taux de conversion** (Y) et le **facteur de concentration** (FCM) représentent le rendement de la filtration (Aimar et al., 2010, Koschuh et al., 2004), en faisant le rapport entre le volume filtré et le volume de solution d'alimentation.

$$\begin{aligned}
 \mathbf{PTM} &= \frac{P_{\text{alimentation}} + P_{\text{rétention}}}{2} - P_{\text{perméation}} \\
 \mathbf{J} &= \frac{Q_{\text{perméat}}}{S_{\text{membranaire}}} \\
 \mathbf{T_R} &= \left(1 - \frac{C_{\text{perméat}}}{C_{\text{alimentation}}} \right) \times 100 \\
 \mathbf{Y} &= \frac{Q_{\text{perméat}}}{Q_{\text{alimentation}}} \\
 \mathbf{FCM} &= \frac{V_{\text{alimentation}}}{V_{\text{alimentation}} - V_{\text{perméat}}}
 \end{aligned}$$

Figure I. 18 : Récapitulatif des formules utilisées pour le calcul des paramètres de l'ultrafiltration

II.2.2.2 Mécanismes de transfert et de rétention

- **Mécanismes de transfert**

Différents phénomènes entrent en jeu lors de l'accumulation de matière sur la membrane, résultant du flux de perméat, et sont classiquement d'ordres diffusif et convectif. Ils dépendent des conditions opératoires : différence de pression transmembranaire et débit d'écoulement tangentiel, des propriétés des solutions traitées et de celles des membranes utilisées.

La convection concerne le déplacement d'ensemble du solvant et des solutés sous l'effet du gradient de pression, qui implique que la solution passe directement dans le pore. L'effet tamis permet la séparation entre les molécules de la solution. La concentration en soluté non retenu dans les pores est la même que la concentration dans la solution d'alimentation. Le flux de perméat (J , exprimé en m.s^{-1} ou $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$) est décrit par la **loi de Darcy** (Baker, 2004).

$$\mathbf{J} = K_T \frac{dp}{\mu dx}$$

K_T (m.s^{-1}) est le coefficient de transfert, μ est la viscosité de la solution, et dp/dx est le gradient de pression. En règle générale, on parle de convection uniquement dans les membranes poreuses, donc en microfiltration, ultrafiltration et nanofiltration (Aimar *et al.*, 2010).

La diffusion est le déplacement des composés de part et d'autre de la membrane sous l'effet du gradient de pression. Il peut y avoir dissolution dans la membrane, séparément pour chaque composé et diffusion selon le gradient de concentration de chaque constituant (*Brun, 1988*). Dans ce cas, la séparation est effectuée selon la solubilité et la mobilité des constituants dans la membrane, décrite de manière simplifiée par la loi de Fick.

$$J_s = - D_s \frac{dC_i}{dx}$$

D_s ($m^2.s^{-1}$) est le coefficient de diffusion du soluté s , dc_i/dx est le gradient de concentration du composé i .

La diffusion est un processus très lent, négligeable devant la convection pour l'ultrafiltration (et la microfiltration), du fait de la porosité des membranes.

▪ **Mécanismes de rétention** (*Brun, 1988 ; Baker, 2004*)

Le taux de rétention traduit le déroulé du procédé, à l'échelle d'un pore. Plusieurs effets sont mis en œuvre pour la rétention.

- **L'effet tamis** : les plus grosses molécules, dont la taille est plus importante que le diamètre des pores, sont retenues à la surface de la membrane. Les molécules les plus petites peuvent être captées par adsorption sous l'action de mécanismes d'adsorption électrostatique, de diffusion brownienne et d'impaction inertielle.
- **L'adsorption électrostatique** : interactions électrostatiques pouvant intervenir entre le soluté et la membrane, entraînant l'adsorption des molécules chargées par simple contact avec la surface, chargée elle aussi, de la membrane.
- **La diffusion brownienne** : les petites particules, soumises aux mouvements browniens, sont transportées facilement grâce aux mouvements du liquide et se retrouvent périodiquement en contact avec la surface des pores, où elles peuvent être capturées par adsorption.
- **L'impaction inertielle** : la solution d'alimentation contient des particules relativement grosses qui ne peuvent pas toutes suivre les changements de direction du fluide lors de son écoulement, et se déposent à la surface de la membrane. C'est le mécanisme de rétention le plus fréquent pour les grosses molécules, tandis que pour les plus petites, la rétention est favorisée par la tortuosité des pores.

II.2.2.3 Phénomènes limitants des techniques de séparation membranaire

Le principal phénomène limitant la performance des modules de filtration est l'accumulation de matière. Celle-ci est inévitable et a des conséquences plus ou moins importantes sur la mise en œuvre du procédé. Ainsi, la **polarisation de concentration**, provoquant le colmatage des membranes, en est la principale conséquence (*Bouroche et Le Bars, 1994 ; Baker, 2004*).

Au cours du procédé de filtration, la solution, constituée de solvant et des molécules, arrive à la surface de la membrane, et sous l'effet de la pression, le solvant traverse la membrane tandis que les molécules sont retenues par la membrane. Au voisinage de la surface de la membrane, la concentration en soluté est supérieure à celle de la solution d'alimentation, entraînant la formation d'une couche de la polarisation de concentration.

Le facteur de polarisation de concentration (γ) peut être déterminé, à partir de la concentration en soluté au niveau de la membrane (C_m) et de la concentration en soluté dans la solution d'alimentation (C_0) :

$$\gamma = C_m/C_0$$

Dans le cas de l'ultrafiltration, on considère également la matière retenue, à l'interface membrane/solution, qui entraîne la formation d'un gradient de transfert supplémentaire à prendre en compte : le gradient local de concentration dans la couche de diffusion. Pour l'élimination du solvant, deux étapes sont à franchir : le transport à travers la couche stagnante puis la filtration.

En outre, si la concentration en soluté au niveau de la membrane dépasse une certaine concentration, il peut y avoir interaction entre les molécules et la formation d'un gel. On parle de **polarisation de gel**. Ceci forme une barrière secondaire, réduisant encore plus le flux de perméat. Ce phénomène est réversible et est éliminé par simple rinçage à l'eau (*Causserand, 2006*). Toutefois, au cours du temps, le gel devient de plus en plus solide à la surface de la membrane, entraînant une diminution du flux. On parle alors de **colmatage de la membrane**. Le colmatage des membranes peut également être entraîné par l'adsorption de molécules à la surface ou dans les pores. La pression appliquée force le passage dans les pores de molécules ayant un diamètre voisin ou légèrement supérieur à celui des pores, les bloquant dans ceux-ci. Ainsi, les molécules adsorbées en surface diminuent le nombre de pores accessibles, tandis que les molécules adsorbées dans les pores diminuent la taille moyenne de ceux-ci. Le colmatage peut devenir irréversible, ne pouvant être éliminé que par nettoyage chimique de la membrane. Plusieurs méthodes peuvent être employées pour limiter ce phénomène :

nettoyage régulier de la membrane, modifications régulières du débit d'écoulement, création de tourbillons par *backflushing* (Kuberkar et Davis, 2001) et *backpulsing* (Mores et al., 2000), ou encore par injection de gaz dans la solution d'alimentation (Cui et Wright, 1994).

II.2.2.4 Facteurs influençant la séparation membranaire

L'efficacité de filtration dépend des conditions hydrodynamiques de fonctionnement (pression, vitesse) et de paramètres physico-chimiques (température, concentration, taille des molécules, pH).

- **Pression transmembranaire**

Lorsque la membrane ne se déforme pas, le flux de perméat du solvant pur augmente théoriquement de façon linéaire avec la pression. Dans le cas de solutions constituées de macromolécules, lorsque la pression augmente, le phénomène de colmatage, par polarisation de concentration ou le colmatage des pores est renforcé, ce qui diminue l'efficacité du transfert. Le flux peut alors devenir indépendant de la pression (Meireles et al., 1995).

- **Vitesse d'écoulement**

Lorsque que le débit d'alimentation augmente, et par conséquent quand la vitesse d'écoulement tangentiel augmente, le flux de perméat augmente également. La vitesse d'écoulement modifie les caractéristiques d'écoulement, notamment la force de cisaillement, ainsi que les propriétés de la solution à traiter. Ainsi, lorsque la vitesse d'écoulement tangentielle est élevée, l'augmentation de la force de cisaillement du fluide à proximité de la surface de la membrane entraîne les molécules de soluté accumulées à la surface de la membrane, ce qui réduit l'épaisseur de la couche de polarisation.

- **Température**

Le flux de la solution est lié à la viscosité de celle-ci. Ainsi, la température influant sur la viscosité, elle va également intervenir sur le flux. En général, l'augmentation de la température diminue la viscosité du fluide, ayant pour conséquences l'augmentation de la convection et la réduction de la polarisation de concentration à la surface de la membrane (Pagliero et al., 2004). En outre, la température modifie également les propriétés intrinsèques de la membrane et la structure des molécules, ce qui influence directement la sélectivité et l'efficacité du procédé. Il est par conséquent difficile de prédire quel effet aura une modification de la température sur le système.

▪ **Concentration en soluté, taille des molécules et pH de la solution traitée**

La viscosité du fluide augmente avec la concentration en soluté. La turbulence de l'écoulement diminue, ce qui augmente la couche de polarisation de concentration et diminue le flux de perméat. En outre, plus les particules présentes dans la solution d'alimentation sont petites, plus la résistance spécifique de la couche de polarisation est grande. En revanche, le transport par diffusion est plus difficile quand la taille des molécules augmente. De même, le pH de la solution d'alimentation est à prendre en compte, puisque généralement, à pH basique, la plupart de membranes présentent une perméabilité plus élevée qu'à pH neutre.

II.2.3 L'utilisation de la séparation membranaire pour le traitement d'extraits liquides de luzerne

L'ultrafiltration est une technique qui a fait l'objet de plusieurs études pour le traitement de jus issus du pressage de la luzerne. Cette séparation peut être utilisée pour concentrer la fraction protéique soluble obtenue par précipitation à chaud du jus vert (*Knuckles et al., 1975, Eakin et al., 1978*). La fraction insoluble, constituée par les protéines chloroplastiques, est éliminée préalablement, puis le jus riche en protéines solubles est ultrafiltré et/ou diafiltré. De 80 à 90 % de l'eau présente, ainsi que certains des composés non protéiques peuvent être éliminés grâce à cette technique. Le taux de récupération des protéines dans le perméat augmente avec la vitesse d'alimentation, et croît également lorsque la température de la solution d'alimentation diminue. En revanche, les auteurs ont montré que la récupération de protéines après l'ultrafiltration est insensible à la concentration de la solution de départ (*Eakin et al., 1978*). La fraction de protéines solubles n'est pas la seule à pouvoir être traitée par ultrafiltration. En effet, le concentré protéique insoluble, une fois hydrolysé à l'aide de pepsine ou de delvolase (*Prévot-d'Alvise et al., 2000, 2004*) peut être ultrafiltré sur une membrane minérale tubulaire grâce à sa solubilisation. Des peptides biologiquement actifs peuvent être séparés grâce à cette technique, qui toutefois n'est pas encore au point à l'échelle industrielle.

L'ultrafiltration est également utilisée efficacement pour la récupération d'enzymes particulières, valorisables, telles que la phytase, en plus grande quantité et à moindre coût qu'en utilisant des techniques de fermentations. Dans ce cas, une luzerne génétiquement sélectionnée, riche en cette enzyme est utilisée (*O'Donnel et al., 1997*).

II.3. Chromatographie - fixation sur résine d'adsorption

II.3.1 Définition et principe

La chromatographie est utilisée depuis de nombreuses années pour la purification de molécules très différentes. Les protéines ont été parmi les molécules les plus étudiées car elles sont très sensibles aux solvants et à la température.

La chromatographie est une méthode de séparation dynamique d'espèces différentes, contenues dans un mélange. Ce procédé repose sur une succession de processus d'échange des espèces à séparer entre une phase mobile (ou éluant) et une phase fixe constituant le support chromatographique (phase stationnaire). La phase mobile entraîne les espèces à séparer, tandis que la phase stationnaire les retient. Ainsi, il est possible de séparer des constituants d'un mélange fluide homogène en utilisant la propriété que possèdent les solides poreux à retenir certains composés. La vitesse de déplacement des composés à travers la colonne dépend des interactions mises en jeu, d'où la possibilité de séparation des solutés ayant un comportement différent dans la colonne (*Caude et Jardy, 1996*).

De nombreux types de chromatographie existent, mais dans le cas du fractionnement des protéines de luzerne, c'est la chromatographie en phase liquide qui nous intéresse plus particulièrement.

II.3.2 Chromatographie en phase liquide

La séparation des molécules peut être réalisée soit dans un réacteur agité soit par un écoulement du fluide au travers d'une colonne garnie du matériau solide (support). Dans ce second cas, le solide peut être déplacé à contre-courant, ou bien il peut rester dans la colonne sous forme d'un lit fluidisé ou d'un lit fixe.

Deux modes de fonctionnement peuvent être distingués lorsque la séparation est réalisée à l'aide d'une colonne en lit fixe :

- Soit l'échantillon contenant les molécules à séparer est injecté pendant une courte durée, puis la séparation est menée par injection, pendant une longue durée, d'un solvant (diluant de l'échantillon ou autre solvant). Le transport des solutés dépend alors de leur affinité respective pour le solvant et le support. Ainsi, les molécules ayant le moins d'affinité pour le support sortent en premier, tandis que celles ayant l'affinité la plus forte sortent en dernier. Cette technique est généralement appelée **séparation chromatographique**.

- Soit l'échantillon est percolé pendant une longue durée, jusqu'à saturation du support par les molécules d'intérêt. Les molécules sont ensuite éluées de manière fractionnée grâce à un ou plusieurs solvants. On parle alors généralement de **fixation**. Lors de la phase d'éluion, dans certains cas, les propriétés de surface du support peuvent être modifiées, et nécessitent donc une étape supplémentaire de régénération du support, à l'aide d'un solvant approprié.

L'efficacité de la séparation dépend de la différence d'intensité des forces soluté/support/solvant. Plusieurs types d'interactions peuvent exister, seules ou associées (**Tableau I. 12**).

Tableau I. 12 : Types de chromatographie couramment employés sur les biopolymères
(d'après Jungbauer, 2005)

Type de chromatographie	Interactions mises en oeuvre	Caractéristiques de la phase stationnaire	Séparation par
Chromatographie d'adsorption	Liaisons de surface – forces de Van der Waals	Adsorbant solide polaire	Structure des molécules
Chromatographie par échange d'ions	Liaisons ioniques	Résine porteuse de groupements chargés	Charge des molécules
Chromatographie d'exclusion de taille	Exclusion de taille – force stérique	Solide poreux	Taille et forme des molécules
Chromatographie d'affinité	Adsorption/désorption biospécifique	Ligand spécifique reconnu par les molécules d'intérêt greffé sur le support	Structure des molécules
Chromatographie par interactions hydrophobes	Formation de complexes hydrophobes	Molécules hydrophobes greffées sur de la silice	Hydrophobie des molécules
Chromatographie en phase normale	Polarité et/ou hydrophobicité	Phase stationnaire polaire	Différence de solubilité dans un solvant liquide
Chromatographie en phase inverse	Polarité et/ou hydrophobicité	Phase stationnaire moins polaire	Différence de solubilité dans un solvant liquide

II.3.3 Support solide : résines synthétiques

Tous les solides sont au sens strict des adsorbants potentiels. Toutefois, il faut qu'un solide ait une surface spécifique suffisante par unité de masse pour avoir des intérêts pratiques. De nombreux supports peuvent ainsi être utilisés, qu'ils soient d'origine naturelle comme le charbon actif ou la silice, ou synthétiques, comme les résines échangeuses d'ions (*Bourgeois et al., 2006*). Nous nous intéressons ici plus particulièrement aux résines, qui sont le support utilisé dans le cadre de nos travaux.

Les résines, principalement utilisées pour l'échange d'ions et l'adsorption, sont généralement constituées d'un squelette macromoléculaire assurant l'insolubilité de la résine dans l'eau et agissant comme support des groupes fonctionnels caractéristiques de cette résine (*Mitsubishi Chemical Corporation, 1995*). L'eau peut cependant pénétrer dans les pores de la résine, facilitant les réactions d'échange. Cette eau contenue à l'intérieur de l'échangeur est appelée eau de gonflement ou eau d'hydratation. Chaque résine échangeuse a des propriétés différentes en fonction du type de matrice qui la constitue et du groupement fonctionnel greffé sur le squelette. Un panorama des différents types de matrice et des groupements fonctionnels associés est présenté dans cette partie.

II.3.3.1 Matrices

Les squelettes des échangeurs d'ions peuvent être de plusieurs types. Les plus courants sont les **squelettes polystyréniques et polyacryliques réticulés**, mais certaines résines peuvent avoir une matrice formophénolique ou polyalkylamine.

Pour les squelettes polystyréniques, par exemple, la **polymérisation** du styrène (ou vinylbenzène) en présence d'un catalyseur d'activation, comme un peroxyde organique par exemple, produit un polystyrène linéaire, transparent, malléable et soluble dans certains solvants. Si une certaine proportion de divinylbenzène (DVB) est mélangée au styrène, il y a réticulation du polymère, qui devient insoluble (**Figure I. 19**). La polymérisation se fait souvent en suspension dans le milieu. Au fur et à mesure de la réaction, des gouttelettes d'oligomère se forment et croissent, jusqu'à devenir des billes dures et sphériques, de diamètre compris entre 1180 et 300 μm .

Dans le cas d'un squelette polyacrylique, selon le même principe, la **réticulation** des polymères d'acrylate, de méthacrylate ou d'acrylonitrile est réalisée à l'aide de DVB. Le taux de réticulation, représentant le pourcentage massique de DVB dans le polymère, est un paramètre très important. Plus ce taux est élevé, plus la résine est dure, donc moins elle est élastique. Par contre, elle est plus résistante aux milieux oxydants, qui ont tendance à déréliculer le polymère. En général, ce sont les taux de réticulation compris entre 8 et 10 % qui sont les plus favorables à la réaction d'échange d'ions.

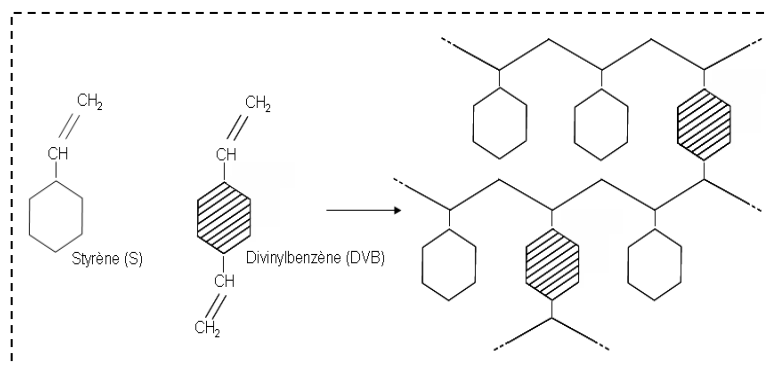


Figure I. 19 : Formation d'un squelette polystyrénique réticulé par polymérisation de styrène et du DVB
(De Dardel, 1998a)

Les matrices des résines ont la propriété d'être poreuses. Deux types d'échangeurs peuvent être identifiés en fonction de leur porosité :

- Les **résines type gel**, dont la porosité est naturellement issue de la polymérisation et de la réticulation
- Les **résines macroporeuses**, dont la porosité est artificielle. Un agent porogène est ajouté aux monomères, lors de la polymérisation, afin de former des canaux au sein de la bille (**Figure I. 20**)

Dans la pratique, les pores d'une résine macroporeuse ont un diamètre de l'ordre de 100 nm, alors que ceux d'une résine type gel sont de l'ordre du nanomètre. Ces pores forment des sortes de canaux remplis d'eau libre, qui facilitent la pénétration des molécules à l'intérieur de la résine où se trouvent les sites de fixation.

Les résines composées uniquement de la matrice, sans groupement fonctionnel, peuvent être utilisées pour la séparation de molécules par adsorption ou par taille, les deux phénomènes pouvant être couplés.

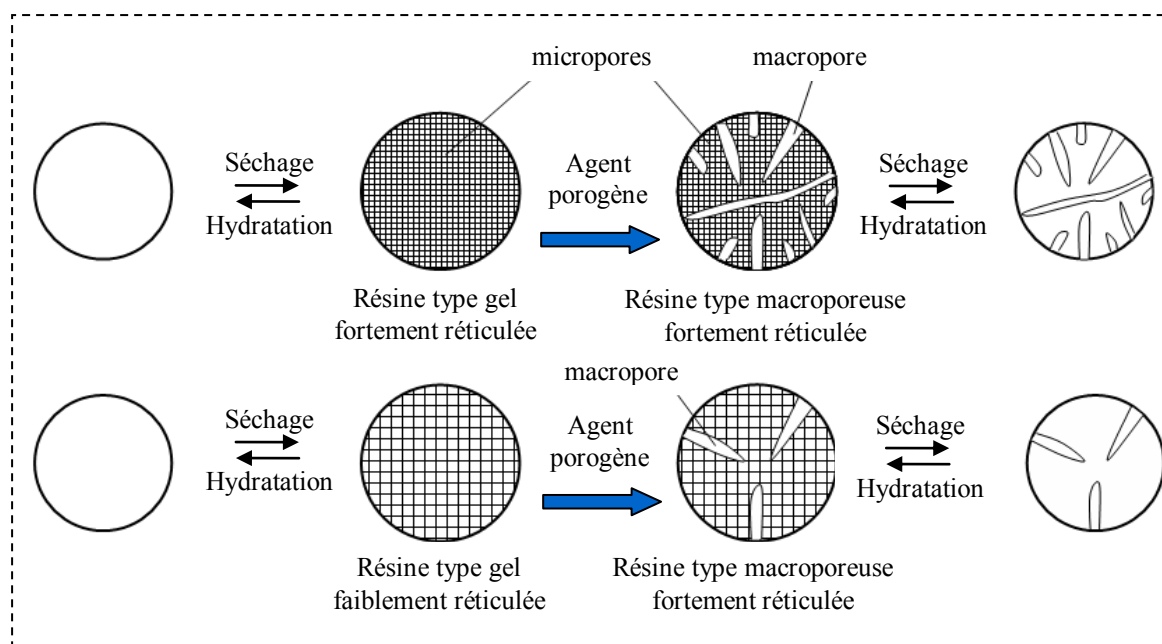


Figure I. 20 : Structure des résines type gel et macroporeuses, hydratées ou déshydratées, en fonction de leur degré de réticulation
(Mitsubishi Chemical Corporation, 1995)

II.3.3.2 Groupements fonctionnels

Une fois la matrice formée, des groupements fonctionnels peuvent y être greffés. En fonction du type d'échangeur d'ions souhaité, ces groupements sont de différentes natures.

Dans le cas des échangeurs de cations, les groupements seront du type sulfonate ou carboxylate, selon que la résine cationique est fortement ou faiblement acide.

Pour les échangeurs d'anions, le groupement fonctionnel est une amine ou un ammoniac. Le greffage se fait par une réaction chimique, différente selon si le greffage a lieu sur une matrice polystyrénique ou polyacrylique. Comme les résines utilisées dans le cadre des travaux étaient des résines polystyréniques, seule cette réaction sera présentée.

Le polystyrène réticulé est traité avec du chlorométhyl méthyl éther, en milieu anhydre et en présence d'un catalyseur ($AlCl_3$ ou $SnCl_4$). Le polystyrène chlorométhylé ainsi obtenu, est modifié au cours d'une seconde étape, durant laquelle le chlore du groupement est remplacé par une amine ou un ammoniac. Ainsi, selon la fonction amine choisie, l'échangeur d'anions obtenu est plus ou moins basique.

Les résines sont classiquement séparées selon quatre catégories principales, décrites dans le **Tableau I. 13**.

Tableau I. 13 : Les principales catégories de résines échangeuses d'ions (Bourgeois et al., 2006)

Catégorie	Formule	Réaction
Résines fortement acides	R—SO ₃ H	$\left. \begin{array}{l} \text{Ca (HCO}_3^-)_2 \\ \text{MgSO}_4 \\ \text{2NaCl} \end{array} \right\} + 2\text{R—SO}_3\text{H} \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \text{Ca}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 \\ \text{2RSO}_3\text{-Mg}^{2+} + \text{H}_2\text{SO}_4 \\ \text{2Na}^+ + 2\text{HCl} \end{array} \right.$ <p>Obtenues par greffage de radicaux sulfoniques, fixent la totalité des cations en solution</p>
Résines faiblement acides	R—CO ₂ H	$\left. \begin{array}{l} \text{Ca(HCO}_3^-)_2 \\ \text{MgSO}_4 \\ \text{2NaCl} \end{array} \right\} + 2\text{R—CO}_2\text{H} \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \text{Ca}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{CO}_2 \\ \text{2RSO}_3\text{-Mg}^{2+} + \text{H}_2\text{SO}_4 \\ \text{H}^+ + 2\text{NaCl} \end{array} \right.$ <p>Obtenues par greffage de radicaux carboxyliques Fixent de préférence les cations de valence multiple</p>
Résines fortement basiques	R—NH ₃ OH	$\text{HCl} + \text{R—NH}_3\text{OH} \rightarrow \text{R—NH}_3\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$ <p>Obtenues par greffage d'ammonium quaternaire Neutralisent tous les anions Transforment les sels neutres en base correspondante</p>
Résines faiblement basiques	R—NH ₂	$\text{HCl} + \text{R—NH}_2 \rightarrow \text{R—NH}_3\text{Cl}$ <p>Obtenues par greffage d'amines (primaires, secondaires ou tertiaires) Neutralisent acides forts mais ni les sels neutres ni les acides forts</p>

Les résines présentant des groupements **ammonium quaternaire**, appelées **résines fortement basiques**, sont de deux types :

- Type 1, dont les groupements fonctionnels sont des benzyltriméthylammonium. Ce sont les plus fortement basiques
- Type 2, présentant une basicité légèrement plus faible. Elles sont constituées de benzyldiméthyléthanolammonium

Lorsque le groupement actif est une **amine**, les résines sont généralement désignées comme **faiblement basiques**. Leur basicité peut varier considérablement en fonction de la catégorie d'amine utilisée (primaire, secondaire ou tertiaire). Les résines faiblement basiques, possédant des fonctions amines tertiaires, sont les plus utilisées car elles présentent une basicité moyenne comparée aux résines présentant un groupement amine primaire ou secondaire.

II.3.3.3 Contre-ions mobiles

Des ions mobiles sont très souvent associés aux groupements fonctionnels. Ils sont appelés contre-ions et ont une charge opposée à celle des groupements. Les résines échangeuses d'anions présentent des contre-ions négatifs. Dans la plupart des cas, ce sont des ions hydroxydes, chlorures ou sulfates.

Cependant, les résines échangeuses ne présentent pas toujours de contre-ions. En effet, les résines faiblement anioniques sont électroneutres à pH basique et sont produites sous forme de bases libres.

II.3.3.4 Capacités d'échange

Une résine échangeuse d'ions peut être considérée comme un réservoir de contre-ions prêts à être échangés. La capacité totale d'échange d'une résine représente ainsi le nombre de ses groupements fonctionnels, et par conséquent le nombre de contre-ions pouvant être échangés. C'est une caractéristique essentielle de la résine (*Trémillon, 1965*).

En réalité, la seule donnée du nombre de contre-ions échangeables ne suffit pas. Il faut toujours spécifier également la quantité de résine et les conditions de mise en œuvre de la mesure. Ainsi, plusieurs capacités d'échange peuvent être définies.

La **capacité maximale** correspond au nombre de groupes échangeurs ionisés pour une quantité spécifique de résine. Dans le cas d'un échangeur polystyrénique, le maximum de sites actifs correspond à la greffe d'un groupe actif par noyau benzénique.

La **capacité apparente** (ou effective) représente le nombre de contre-ions échangeables pour une quantité donnée de résine (*Ladisich, 2001*).

Ces deux capacités sont exprimées en capacité-masse, soit en équivalents par kilogramme de résine sèche (ég.kg⁻¹), ou en capacité-volume, soit en équivalents par litre de résine humide (ég.L⁻¹).

La **capacité utile**, appelée également capacité opératoire est le terme utilisé lorsque l'équilibre réactionnel n'est pas atteint. Elle correspond au nombre de sites où l'échange d'ions se produit réellement au cours d'un cycle. Ainsi, elle est inférieure à la capacité maximale et dépend des conditions opératoires. Par exemple, lorsque les expériences sont réalisées en réacteur agité, la capacité utile est liée à un certain nombre de paramètres, tels que la concentration et le type d'ions fixés ou encore le temps d'agitation. Mais elle peut aussi

dépendre du débit de percolation, de la température, de la hauteur de lit de résine ou encore du type et de la concentration du régénérant, lorsque les essais sont menés en colonne.

La **capacité de perçement**, spécifique à l'échange d'ions en colonne, correspond au nombre de contre-ions échangés jusqu'à ce qu'un critère sur la concentration en ion en sortie de la colonne soit atteint.

II.3.4 Mécanismes d'échanges

II.3.4.1 Absorption

La modélisation structurale d'une bille de résine (**Figure I. 21**) permet de mettre en évidence l'importance des pores. En effet, c'est à l'intérieur de ceux-ci que se situent les groupements fonctionnels et les contre-ions, et donc à cet endroit qu'a lieu la réaction d'échange d'ions. L'espace poral contient également l'eau d'hydratation indispensable à la réaction d'échange, puisque les ions pénètrent dans la résine depuis la solution par diffusion.

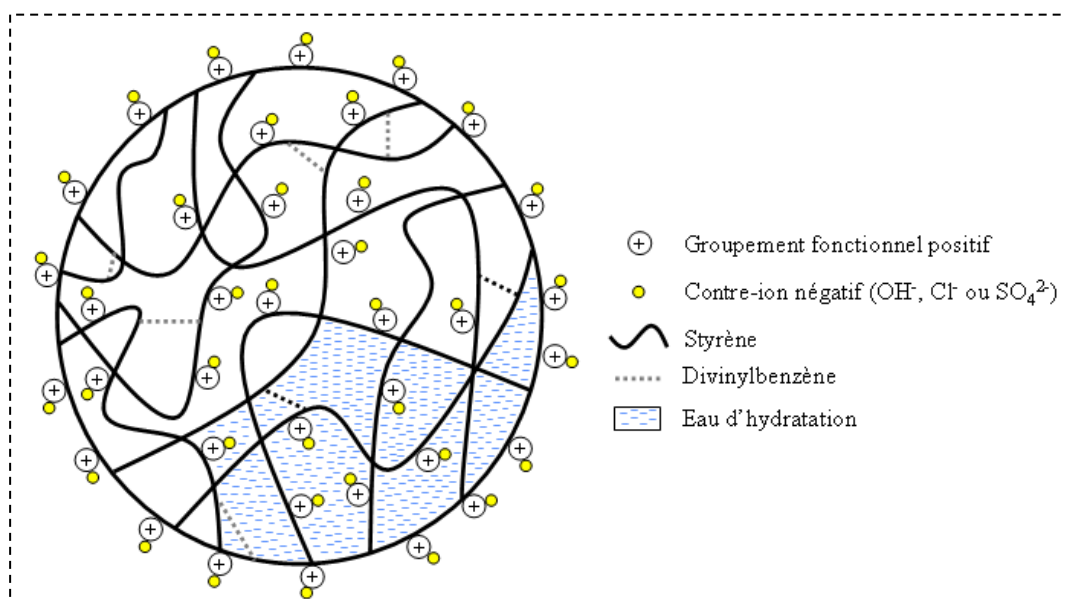


Figure I. 21 : Modélisation structurale d'une bille de résine échangeuse d'anions polystyrénique
(De Dardel, 1998a ; De Dardel, 1998b)

L'absorption est le terme caractérisant la sorption de l'eau dans les résines par équilibre osmotique. Une pression osmotique est créée au sein de la bille du fait de la sorption, ce qui augmente son volume. Ainsi, l'absorption est possible tant que les forces de déformation du réseau de polymère de la résine ne s'opposent pas à la pression osmotique de sorption.

Par extension, il apparaît évident que l'eau n'est pas le seul composant de la solution à être absorbé dans la matrice de la résine. En effet, tout composé neutre est susceptible de pénétrer dans ce réseau macromoléculaire selon le même équilibre.

II.3.4.2 Adsorption

L'adsorption chimique est un phénomène différent de l'absorption. Au cours du processus, des molécules viennent se fixer à la surface du solide, et des réactions chimiques avec formation de liens chimiques entre molécules d'adsorbat et la surface d'adsorbant peuvent intervenir (Meunier et Sun, 2003).

Considérons une résine échangeuse d'anions sous forme OH^- , qui possède donc des groupements fonctionnels positifs notés G^+ . Si cette résine est placée dans une solution aqueuse de chlorure de sodium, il peut y avoir échange entre les contre-ions OH^- et l'ion Cl^- présent en solution (Réaction 1, **Figure I. 22**). Dans ce cas, l'échange est en partie contrôlé par les forces électrostatiques et non pas uniquement par diffusion à cause du gradient de concentration.

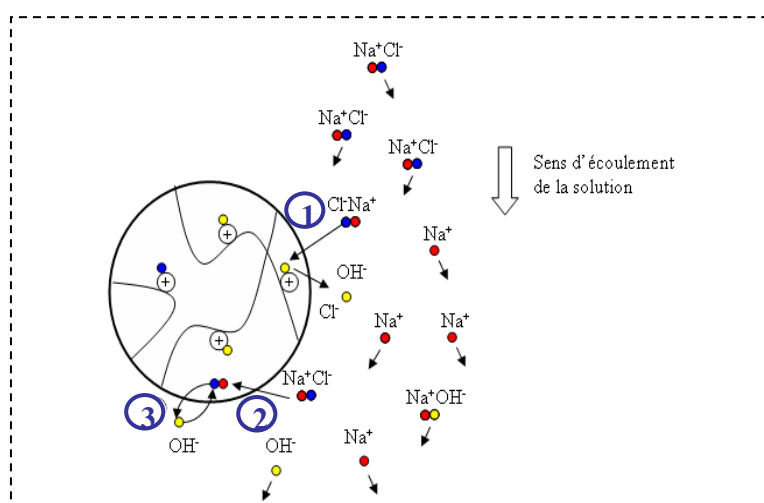


Figure I. 22 : Représentation schématique des mécanismes d'échange d'ions au sein d'une bille de résine anionique (Trémillon, 1965)

Selon les lois de Fick, le gradient de concentration implique une diffusion des ions Cl^- et Na^+ vers la bille de résine et des ions OH^- et G^+ vers la solution. Cependant, les ions G^+ , fixés sur le squelette de la résine, ne peuvent passer en solution. Ainsi en colonne, lorsque le premier ion Na^+ quitte la solution, il se crée un déficit de charges négatives. Ce déficit se traduit par l'apparition d'un potentiel très élevé entre la résine et la solution, ce qui favorise la fixation des co-ions (ions de même charge que les charges fixées sur la résine) dans la matrice

macromoléculaire. Ceci empêche que d'autres ions Na^+ quittent la solution (réaction 2, **Figure I. 22**). Ce phénomène est appelé potentiel de Donnan. Le potentiel de Donnan n'a aucune influence sur la sorption des espèces neutres en solution. Ainsi, comme il a été précisé plus haut, les électrolytes non dissociés en solution aqueuse pénètrent très facilement au sein du réseau macromoléculaire des résines, tant que les pressions de gonflement de ces dernières restent inférieures à la pression osmotique créée par la sorption de ces molécules.

Le phénomène d'adsorption des co-ions amène à considérer un deuxième mécanisme d'échange d'ions au sein des résines. En effet, les contre-ions complétant la paire d'ions adsorbés peuvent à leur tour être échangés avec d'autres ions de la solution aqueuse (réaction 3, **Figure I. 22**). Ce phénomène reste tout de même mineur par rapport au mécanisme principal d'échange d'ions, mais est à prendre en compte pour la détermination de la capacité d'échange.

II.3.4.3 Isothermes d'adsorption

Dans le cas de la chromatographie d'adsorption, l'échantillon présente généralement plusieurs solutés ayant des interactions entre eux. Il est alors nécessaire de connaître les isothermes d'adsorption des corps purs, ainsi que les isothermes de co-adsorption du mélange, afin de pouvoir prédire avec précision les performances du procédé chromatographique (*Meunier et Sun, 2003*).

Les isothermes s'appliquent à l'adsorption sur charbon actif ou sur des résines non fonctionnalisées, ainsi qu'aux supports chromatographiques, même s'ils sont dits « échangeurs d'ions » pour les molécules de grosse taille (protéines, polysaccharides), ou à la rétention de molécules neutres sur tout support.

La connaissance quantitative des isothermes ne peut être obtenue que par expérimentation dans la plupart des cas. Trois méthodes sont employées pour leur détermination, la **méthode du réacteur agité**, la **méthode de la saturation élution en colonne**, et la **méthode de l'analyse frontale en colonne**.

La courbe de fixation du soluté sur un solide, rendant compte de la relation entre concentration de soluté adsorbé et concentration de soluté restant dans le liquide est appelée

isotherme d'échange. A partir de cette courbe, il est possible de déterminer la loi d'équilibre associée à la fixation étudiée (*Coulson et Richardson, 1979*). Deux cas se présentent alors :

- Soit la loi d'équilibre est indépendante, c'est-à-dire que la fixation du soluté ne dépend que de sa concentration et non de celles des autres espèces dans le milieu (solvant ou contre-ions)

- Soit la loi d'équilibre est dépendante de la réaction d'échange, c'est-à-dire qu'elle tient compte du fait que les solutés sont en compétition pour se fixer sur le site de la résine.

Dans le cadre de ce travail de thèse, il a été choisi de travailler selon une loi d'équilibre indépendante. Ainsi, le soluté A étudié est considéré comme dépourvu de charge, et la réaction d'adsorption peut être caractérisée par le coefficient de distribution (K_D , dépendant de la composition de la solution et de la température). K_D est défini comme le rapport des coefficients d'activité de A en phase solide ($[A]$) et en phase liquide ($[\bar{A}]$) (Equation I. 1).

$$\text{Equation I. 1 : } K_D = \frac{[\bar{A}]}{[A]}$$

Dans le cas d'une loi d'équilibre indépendante, la fixation est limitée uniquement par le nombre de sites disponibles sur le solide. Parfois, K_D est indépendant de la concentration du soluté dans la phase liquide, c'est le cas de l'adsorption linéaire. Mais ce type d'adsorption est souvent le cas limite d'autres types de fixation.

Les isothermes peuvent être décrites selon trois modèles principaux : linéaire, Freundlich et Langmuir. La capacité de la résine est calculée dans chaque cas à partir des équations suivantes (q représente la concentration de soluté adsorbé sur le solide, et C est sa concentration en solution) :

- **Linéaire** : $q = K.C$, (avec q en mol.g^{-1} de résine). Ce modèle est valable dans le cas de solutions diluées.
- **Freundlich** : $q = K.C^n$. Ce modèle est empirique, n étant déterminé expérimentalement. Il est surtout utilisé pour les surfaces non homogènes, comme le charbon actif par exemple.

- **Langmuir** : $q = \frac{K \cdot C \cdot q_0}{1 + KC}$ (où q_0 représente la quantité maximale fixée). Ce modèle fonctionne assez bien avec les protéines et peut être adapté, par exemple à la fixation de plusieurs molécules en compétition : $q_i = \frac{K_i \cdot C_i \cdot q_{0,i}}{1 + \sum K_j C_j}$

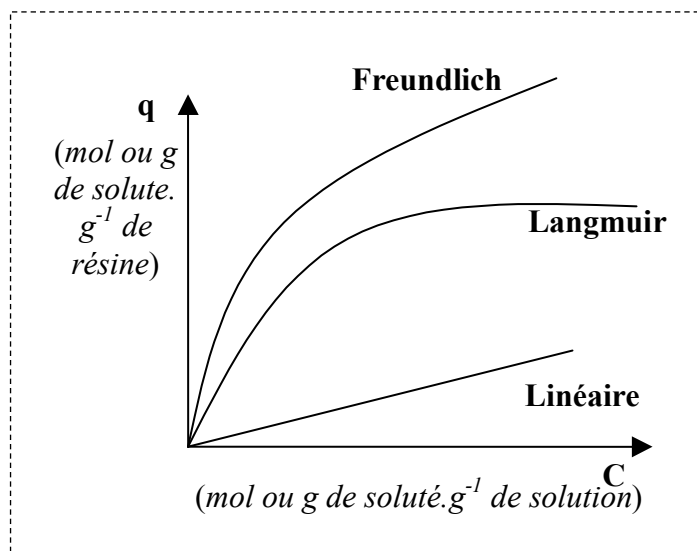
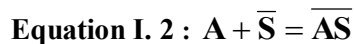


Figure I. 23 : Représentation schématique des trois modèles principaux pour la description du système

Différentes relations (**Figure I. 23**) permettent de décrire la variation de la concentration du soluté adsorbé sur le solide en fonction de sa concentration en solution. Elles dépendent essentiellement de la nature de l'adsorbant.

- **Si le solide est un matériau homogène**, c'est-à-dire qu'il possède des sites d'adsorption (\bar{S}) d'énergie équivalente, fixant une seule molécule de soluté (A) (Equation I. 2), alors la loi d'équilibre suit une **isotherme de type Langmuir**. Le coefficient de distribution de cette réaction d'adsorption (K_L) s'écrit selon l'expression présentée dans l'Equation I. 3.



$$\text{Equation I. 3 : } K_L = \frac{\bar{AS}}{[A][\bar{S}]}$$

Sur le solide S, il y a un nombre S_0 constant de sites prédéfinis (Equation I. 4). Ainsi à l'équilibre, l'expression de K_L est modifiée (Equation I. 5).

$$\text{Equation I. 4 : } \bar{S}_0 = \bar{S} + \bar{AS} = \text{cte}$$

$$\text{Equation I. 5 : } \bar{[A]} = \frac{K_L S_0 [A]}{1 + K_L [A]}$$

En réacteur agité, cette équation devient l'équation caractéristique des isothermes du type Langmuir (Equation I. 6).

$$\text{Equation I. 6 : } q_e = \frac{q_0 K_L C_e}{1 + K_L C_e}$$

q_e est la capacité d'échange à l'équilibre (mol.g^{-1})
 q_0 est capacité d'échange initiale (mol.g^{-1})
 K_L est la constante de Langmuir ou énergie d'adsorption (L.mol^{-1})
 C_e est la concentration du soluté en solution à l'équilibre (mol.L^{-1})

La linéarisation de cette équation (Equation I. 7) permet, à partir des données expérimentales, de retrouver les valeurs de q_0 et K_L , en traçant la courbe $\frac{1}{q_e} = f(C_e)$.

$$\text{Equation I. 7 : } \frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_0 K_L C_e} + \frac{1}{q_0}$$

- **Si l'adsorbant présente une surface hétérogène**, certains sites de fixation ont des énergies plus importantes que d'autres. La loi d'équilibre suit une **isotherme de type Freundlich**. Si un site peut fixer n moles de soluté A, le coefficient de distribution (K_F) de cette réaction est défini comme suit (Equation I. 8) :

$$\text{Equation I. 8 : } \bar{[A]} = K_F [A]^n$$

L'expression de l'isotherme d'échange qui en découle est présentée dans Equation I. 9.

$$\text{Equation I. 9 : } q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}}$$

K_F est la constante de Freundlich ou capacité d'adsorption du solide pour A (L.g^{-1})
 n est l'exposant de Freundlich ou intensité d'adsorption

Les essais sont réalisés en réacteur fermé donc, comme pour l'équation de Langmuir, une linéarisation de cette expression est possible (Equation I. 10). Le graphique $\log q_e = f(C_e)$ permet de déterminer n et K_F à partir des résultats expérimentaux.

$$\text{Equation I. 10 : } \log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$$
 Les équations de loi d'action de masse

s'appliquent seulement aux systèmes qui sont en équilibre, c'est-à-dire en réacteur fermé agité.

II.3.4.4 Échange d'ions

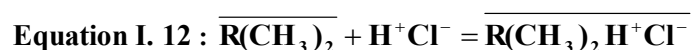
II.3.4.4.1 Présentation

L'échange d'ions à partir de résines anioniques est différent selon la basicité de la résine.

Sur les **résines fortement anioniques**, très souvent rencontrées pour éliminer les nitrates dans le processus de déminéralisation des sources d'eau, l'échange se fait de manière simple entre le contre-ion de la résine et l'ion en solution. Par exemple, l'Equation I. 11 présente la fixation d'un ion chlorure, à partir d'une solution de NaCl (Na^+Cl^-), sur une résine fortement anionique, de type 1, sous forme OH^- ($\overline{\text{RNH}_4^+\text{OH}^-}$).



Dans le cas des **résines faiblement anioniques**, la forme ionisée du groupement actif n'existe qu'en milieu acide. En effet, comme il a été vu précédemment, les groupes actifs de ces résines sont des amines, qui sont donc sous forme de bases libres en milieu basique ou alcalin. Elles fixent les acides forts sous forme d'hydrate d'amine (chlorhydrates ou sulfhydrates). Dans l'Equation I. 12, il apparaît clairement que la fixation de l'acide chlorhydrique (H^+Cl^-) sur une résine faiblement anionique ($\overline{\text{R}(\text{CH}_3)_2}$) permet d'obtenir une résine ionisée sous forme de chlorhydrate ($\overline{\text{R}(\text{CH}_3)_2\text{H}^+\text{Cl}^-}$). Cette résine peut alors jouer le rôle d'échangeur d'ions pour fixer d'autres ions négatifs présent en solution. Dans la pratique, les hydrates d'amine sont désignés comme forme chlorure ou sulfate de la résine.



Par contre, lorsque les résines faiblement anioniques ne sont pas sous forme ionisées, elles ne peuvent couper les sels neutres, comme le NaCl, ou les acides faibles qui n'ont plus de proton dissocié. En effet, dans ces deux cas, aucun hydronium n'est présent en solution pour assurer l'ionisation du groupement amine et donc la fixation des anions.

II.3.4.4.2 Mécanismes d'échange ionique

La cinétique d'échange d'ions représente le suivi de la fixation des ions d'intérêt au cours du temps. De manière générale, le système représenté par la solution contenant les ions d'intérêt et une bille de résine est partagé en trois zones distinctes : la phase aqueuse (solution d'alimentation), la phase solide et l'interface liquide-solide. L'extérieur du solide est tapissé d'une couche de liquide immobile, dite **film de Nernst**, car n'importe quel fluide est visqueux

(De Dardel, 1998a). Cette couche statique existe malgré l'agitation ou la vitesse d'écoulement du fluide.

La cinétique d'échange d'ions s'intéresse aux mécanismes impliqués lors de la migration d'un ion dans chacune de ces zones, mais aussi à la réaction d'échange, au niveau du groupement fonctionnel, entre cet ion et le contre-ion de la résine.

La description des différentes étapes de la cinétique d'échange est basée sur un exemple précis, à savoir la fixation d'ions chlorures sur une colonne de résine fortement anionique, sous forme OH^- , à partir d'une solution de chlorure de sodium (Na^+Cl^-) (**Figure I. 24**).

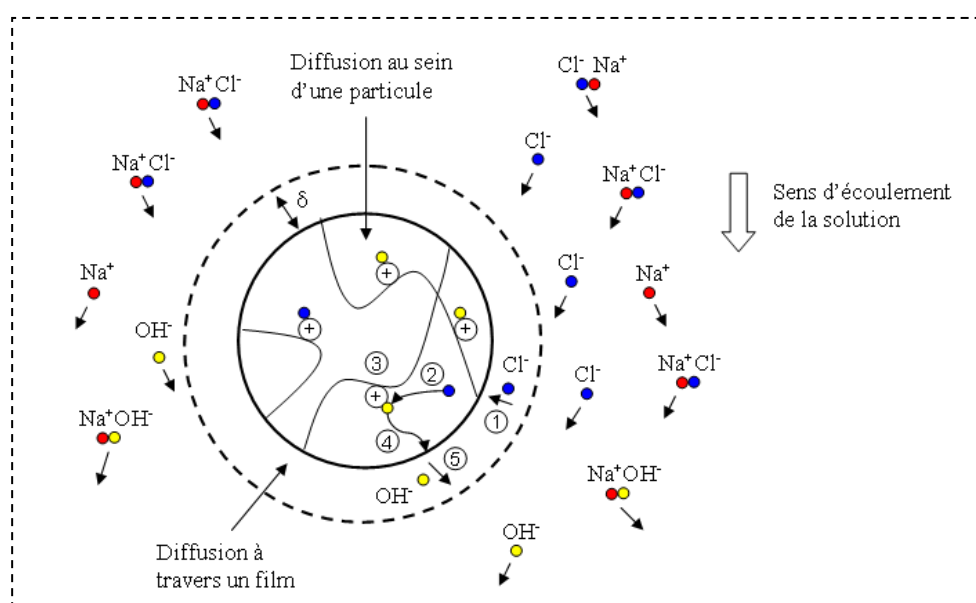


Figure I. 24 : Présentation schématique des différentes étapes de la cinétique d'échange
(De Dardel, 1998a)

Comme l'alimentation de la colonne est continue, la solution d'alimentation est considérée comme ayant une concentration globale constante. Afin de pouvoir être fixé sur le solide, l'ion Cl^- doit traverser le film de Nernst par diffusion, c'est le **transfert externe** (étape 1). La vitesse de diffusion est indépendante de la nature de la résine et est proportionnelle au gradient de concentration du soluté entre la solution et le solide. L'épaisseur du film (δ) a aussi une influence sur la vitesse de diffusion. Elle se définit d'ailleurs comme l'inverse de la vitesse d'écoulement de la solution.

Dans le cas des résines échangeuses d'ions, la phase solide est un milieu poreux dans lequel le fluide ne peut pas circuler par convection, car les espaces interstitiels, ou pores, sont trop étroits. Ainsi, le soluté migre jusqu'au site d'échange par diffusion dans le liquide des pores, c'est le **transfert interne** (étape 2). Notons que les étapes de transfert externe et interne

$$\text{En solution, } \begin{cases} x_A = \frac{(A)}{C_{\text{tot}}} \\ x_B = \frac{(B)}{C_{\text{tot}}} \end{cases} \quad \text{dans la résine, } \begin{cases} y_A = \frac{(\bar{A})}{Q} \\ x_B = \frac{(\bar{B})}{Q} \end{cases} \quad \text{avec } \begin{cases} x_A + x_B = 1 \\ y_A + y_B = 1 \end{cases}$$

Equation I. 16

Equation I. 17

Equation I. 18

L'équilibre est alors représenté par l'Equation I. 19 et la **Figure I. 25** :

$$\text{Equation I. 19 : } y_A = \frac{\alpha_B^A x_A}{1 + (\alpha_B^A - 1)x_A}$$

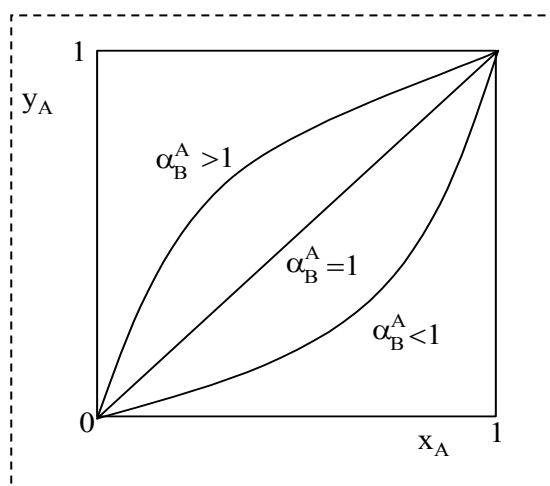


Figure I. 25 : représentation de l'équilibre

On obtient $K = \frac{y_A}{x_A} \frac{x_B}{y_B} = \frac{y_A}{x_A} \frac{1-x_A}{1-y_A}$ et on définit le facteur de séparation, qui permet de comparer les affinités des ions pour le support, et donc de les classer :

$$\text{Equation I. 20 : } \alpha_B^A = \frac{(\bar{A})(B)}{(A)(\bar{B})} = \frac{(\bar{A})/(A)}{(\bar{B})/(B)} = \frac{\text{coefficient de partage de A}}{\text{coefficient de partage de B}} = K$$

II.3.4.4.4 Échange mono-divalent



On définit la constante apparente d'échange, K.

$$\text{Equation I. 21 : } K = \frac{(\bar{\text{Ca}}^{2+})(\text{Na}^+)^2}{(\text{Ca}^{2+})(\bar{\text{Na}}^+)} = \frac{C_{\text{tot}} y_{\text{Ca}} (1-x_{\text{Ca}})^2}{Q x_{\text{Ca}} (1-y_{\text{Ca}})^2}$$

La courbe y_{Ca} en fonction de x_{Ca} varie avec la normalité de la solution. Toutefois, l'ion divalent est préférentiellement fixé lorsque la solution est diluée.

II.3.4.4.5 Équilibre de l'échange d'ions

D'un point de vue thermodynamique, la **réaction d'échange d'ions** est considérée comme une **réaction hétérogène** car elle met en jeu au moins deux électrolytes et une surface solide chargée. Étant considéré comme une réaction chimique, la loi d'action de masse peut-être appliquée à ce système et l'affinité de la surface solide pour un ion peut-être calculée grâce au coefficient de sélectivité.

Dans la pratique industrielle, la solution percole à travers la résine. L'équilibre n'étant pas atteint, les résultats sont influencés par des considérations cinétiques. Ainsi la cinétique d'échange doit être étudiée pour avoir une vue d'ensemble sur le mécanisme de fixation des protéines.



CHAPITRE II.

ÉTUDE DU FRACTIONNEMENT D'UN EXTRAIT VERT DE LUZERNE ET CARACTERISATION DES FRACTIONS

SOMMAIRE

I. PRODUCTION DE L'EXTRAIT VERT RICHE EN PROTEINES	- 86 -
I.1. Extraction des protéines de la luzerne par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement	- 86 -
I.1.1 Evaluation de la déshydratation de la luzerne.....	- 87 -
I.1.2 Evaluation de la composition de l'extrait vert	- 87 -
I.2. Extraction des protéines de luzerne en réacteur agité.....	- 88 -
I.3. Production d'extrait de luzerne par extrusion bi-vis	- 91 -
I.3.1 Caractérisation des lots de luzerne.....	- 91 -
I.3.2 Bilan de l'étape d'extraction des protéines lors de l'extrusion	- 92 -
I.4. Caractérisation des extraits de luzerne.....	- 94 -
II. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT VERT : SEPARATION LIQUIDE/SOLIDE .	- 96 -
II.1. Influence de la vitesse de centrifugation	- 96 -
II.2. Etude du traitement du jus à l'aide de détergents.....	- 97 -
II.3. Bilan de l'étape de centrifugation	- 101 -
II.4. Caractérisation des fractions protéiques	- 103 -
II.4.1 Composition des extraits	- 103 -
II.4.2 Composition en acides aminés.....	- 105 -
II.5. Extraction de la chlorophylle.....	- 107 -
III. DESCRIPTION DU PROCEDE DE FRACTIONNEMENT MIS EN ŒUVRE : TRAITEMENT DU JUS CLARIFIE PAR ULTRAFILTRATION.....	- 109 -
III.1. Membrane de 30 kDa	- 110 -
III.2. Membrane de 10 kDa	- 113 -
IV. CONCLUSIONS	- 118 -

Ce second chapitre s'articule autour du procédé de fractionnement de la luzerne mis en œuvre au cours de la thèse, et décrit en particulier le traitement de l'extrait liquide, appelé jus vert. Ce chapitre est consacré plus particulièrement aux étapes du procédé de fractionnement de l'extrait vert comme exemple de schéma de bioraffinerie adapté aux plantes vertes (**Figure II. 1**).

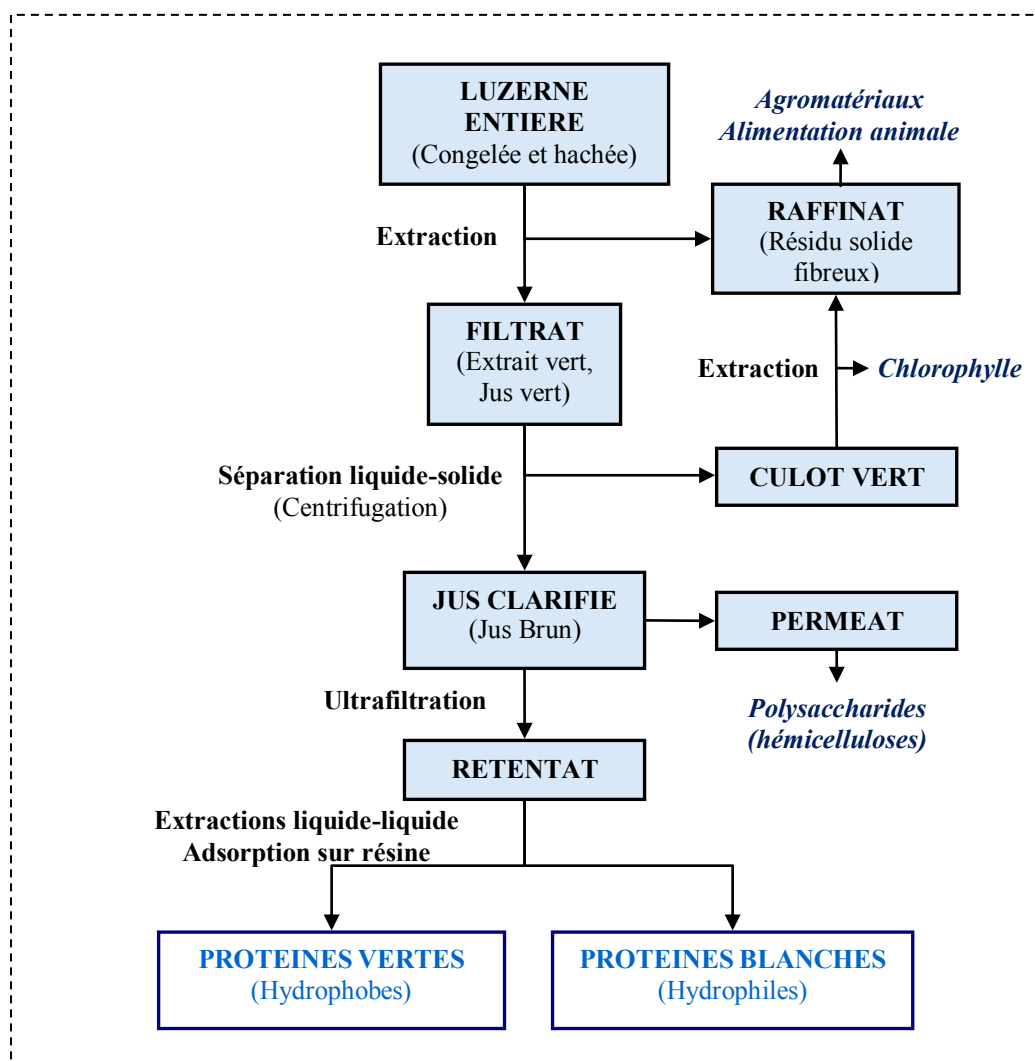


Figure II. 1 : Schéma global du procédé de fractionnement appliqué à la luzerne plante entière

Ce schéma de valorisation de la plante inclurait l'utilisation des fibres du résidu solide comme base pour la fabrication d'agromatériaux. Cette partie n'a pas fait l'objet d'investigations dans le cadre de cette thèse. Seul le fractionnement de l'extrait a été étudié, avec pour objectif la récupération de composés à valeur ajoutée, tels que des colorants comme la chlorophylle, la récupération des protéines hydrophobes et hydrophiles, ainsi que la récupération de polysaccharides.

Ainsi, le traitement de l'extrait vert comprendra une étape de séparation liquide/solide, produisant un culot solide sur lequel l'extraction de la chlorophylle sera étudiée. Le surnageant sera alors ultrafiltré de manière à concentrer les protéines, mais aussi afin d'extraire les polysaccharides dans le filtrat. Le concentré protéique sera alors traité par chromatographie afin de réaliser la séparation entre protéines hydrophiles et protéines hydrophobes.

Ce schéma théorique a été étudié à l'échelle laboratoire afin d'en valider la faisabilité technique. Devant la quantité d'extrait de luzerne nécessaire à la conduite des essais, la première partie du travail a été consacrée à la phase d'expression du jus de luzerne.

I. PRODUCTION DE L'EXTRAIT VERT RICHE EN PROTEINES

1.1. Extraction des protéines de la luzerne par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement

Dans le cadre du projet ANR PRODULUZ, un des partenaires, le Centre RAPSODEE de l'Ecole des Mines d'Albi a étudié le traitement de biomasse par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement (DMAT). Cette étude a permis de mettre en évidence l'effet du pressage couplé au chauffage de la plante (luzerne et épinard) sur la qualité des extraits liquides obtenus (*Arlabosse et al., 2011, Kerfai et al., 2011*).

La DMAT permet de coupler en une seule étape une action de pressage de la matière avec une action de séchage thermique. Cette technique est déjà utilisée pour la déshydratation de matières telles que la lignite ou la bagasse (*Clayton et al., 2006, 2007, Bergins, 2003*), mais a peu été mise en œuvre sur une matière végétale comme la luzerne.

La cellule (**Figure II. 2**) consiste en un piston de compression, une cuve cylindrique perforée et un milieu filtrant. La chambre de filtration a un diamètre de 148 mm et une hauteur maximum de 60 mm. Deux étapes de mise sous pression peuvent être appliquées à la matière : une compression faible à 300 kPa, puis une compression forte autour de 1500 kPa. La température des parois de la cellule est contrôlée afin de chauffer la matière végétale.

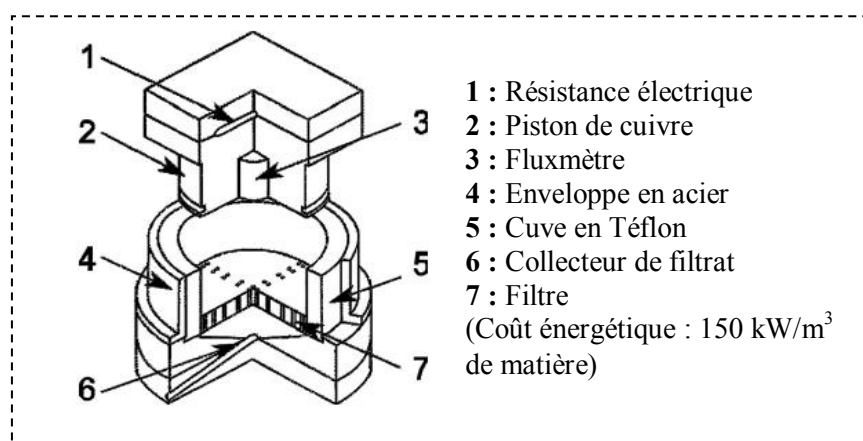


Figure II. 2 : Détail de la cellule expérimentale de Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement
 (Arlabosse *et al.*, 2011)

I.1.1 Evaluation de la déshydratation de la luzerne

Arlabosse *et al.* (2011) ont mis en évidence une efficacité de la déshydratation pouvant atteindre 69 % de l'eau éliminée en conditions de pressage modérées (300 kPa : teneur en matière sèche (MS) du gâteau obtenu égale à 41.1 % pour une luzerne de départ à 17.1 % de MS), contre 55 % d'élimination de l'eau dans un procédé de déshydratation classique. La déshydratation peut atteindre 83 % pour un pressage en deux étapes (pression modérée puis plus forte, autour de 1500 kPa, Mahmoud *et al.*, 2008). Entre 30 et 70 °C, la création d'un gradient de température dans le gâteau de filtration semble entraîner une différence de la pression osmotique au sein de la biomasse et donc l'apparition d'un flux de jus vert à travers les parois des cellules végétales. Toutefois, la plante doit être broyée avant pressage, de manière à mieux exprimer le liquide. En effet, un simple pressage de la plante entière ne permet pas l'éclatement des cellules et limite l'efficacité de la déshydratation.

Des analyses physiologiques montrent que le chauffage de la luzerne entraîne l'évaporation de l'eau par les stomates des feuilles, alors que lorsqu'on applique une pression, l'eau sort à l'état liquide au niveau des tiges. La combinaison du pressage et du chauffage permet ainsi l'utilisation des deux voies de circulation de l'eau dans la plante, ce qui explique l'efficacité de cette technique.

I.1.2 Evaluation de la composition de l'extrait vert

La qualité du jus exprimé a été étudiée (Kerfai *et al.*, 2011), sur des jus produits par DMAT à partir de feuilles d'épinards, de manière à évaluer l'influence du prétraitement, et de la température.

Le broyage fin des feuilles d'épinard avant déshydratation permet une meilleure extraction des protéines solubles, tandis qu'il n'a aucune influence sur l'extraction des protéines vertes insolubles. En effet, une grande partie des protéines solubles étant localisées dans le stroma des chloroplastes, le broyage fin permet l'éclatement de cellules et donc la libération de ces molécules.

La température joue également un rôle sur la récupération des protéines dans le filtrat avec un maximum d'extraction à 50 °C. Ce résultat peut s'expliquer par l'altération de la structure et de la conformation des protéines aux fortes températures, ce qui modifie leur solubilité et leur comportement.

La production de jus par la cellule de DMAT ne pouvant pas couvrir les besoins des études de fractionnement menées au LCA, il a été nécessaire d'étudier une voie alternative d'obtention de jus de luzerne. Dans un premier temps, une étude a été menée en réacteur fermé agité.

1.2. Extraction des protéines de luzerne en réacteur agité

La récupération des protéines peut être envisagée par extraction, c'est-à-dire que le solide est mis en contact avec un solvant extracteur. Généralement, l'augmentation de la surface de contact après broyage favorise la vitesse du transport diffusif, et augmente la disponibilité du contenu cellulaire, le broyage s'accompagnant d'une lyse partielle des cellules. Dans un premier temps, le phénomène diffusif d'extraction des protéines a été étudié. Pour cela, un échantillon de luzerne coupée en fragments d'environ 1 cm de long a été placé dans un excès d'eau, et laissé sous agitation magnétique modérée (afin d'éviter toute contrainte de cisaillement) pendant une journée à température ambiante. Dans ces conditions, il apparaît à l'équilibre que 10.5 % des protéines de la luzerne peuvent être extraites (moyenne obtenue sur 3 essais, avec un écart-type de 2.0 %), par simple diffusion dans l'eau.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du cisaillement, appliqué à la luzerne pour réduire sa taille, sur l'extraction des protéines. Ainsi, la plante a été traitée en réacteur fermé, agité à l'aide de différents types de modules cisailant : un Ultra-Turrax, un émulsificateur Silverson L4RT et un hachoir de cuisine Maxi Chopper. Le protocole est décrit

dans le **Chapitre V**. Le temps de contact est de 10 min pour l'Ultra-Turrax et le Silverson, et de périodes de 50 s pour le hachoir de cuisine.

Le rendement de protéines extraites (rapport entre teneur en protéines du solide après traitement sur teneur en protéines de la luzerne de départ) a été évalué pour différents ratios liquide/solide.

Tableau II. 1 : Extraction des protéines de luzerne en réacteur agité : effet du cisaillement

Teneur massique en luzerne (%)	Pourcentage de protéines extraites				
	Ultraturax Premier essai	Ultraturax Deuxième essai	Emulsificateur Silverson LART	Emulsificateur Silverson LART + diffusion ¹	Hachoir de cuisine
5	5.1	4.6	6.9	16.1	2.2
7.5	5.2	5.5	5.5	<i>n.d.</i>	2.4
10	5.8	5.7	5.2	7.7	1.9
12.5	5.2	5.7	4.6	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
15	6.4	6.7	3.8	<i>n.d.</i>	10.3
20	6.4	7.1	Masse collée de luzerne, pas d'agitation homogène	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>

¹ Après 10 min de traitement par Silverson, les échantillons sont laissés une nuit au repos, puis soumis à une agitation magnétique douce pendant 7 heures. Témoin à 5 % de luzerne (même traitement sauf Silverson) : pourcentage de protéines extraites = 8.4 %

Les résultats présentés dans le **Tableau II. 1** montrent une assez bonne répétabilité du traitement par Ultra-Turrax. Lorsque la proportion de luzerne dans le mélange augmente, le pourcentage de protéines extraites reste constant. Une deuxième phase d'extraction a été menée, sur les résidus après filtration, pour les échantillons à 12.5, 15 et 20 % de luzerne, par ajout d'eau pure dans les mêmes proportions. Les résultats (non présentés ici) ont montré que le rendement d'extraction des protéines était de seulement 1.2 à 2 % (par rapport à la teneur initiale de la luzerne), donnant ainsi un rendement total final autour de 8 %. Ainsi, la durée de mise en contact pour le premier cycle est suffisante, et les protéines extractibles sont récupérées dès la première étape d'extraction.

Avec l'émulsificateur, plus la proportion massique de luzerne augmente dans le mélange, moins les protéines sont extraites. Le rendement diminue de 6.9 % de protéines extraites quand il y a 5 % de luzerne en mélange à seulement 3.8 % de protéines extraites avec 15 % de luzerne dans le mélange. Ceci peut être expliqué par le fait que la tête d'agitation du Silverson est constituée d'une grille de maillage de 2 mm, retenant les morceaux de plante, gonflés et plus visqueux, ayant tendance à se coller les uns aux autres à la surface de la grille et empêchant un broyage efficace de la luzerne.

Avec le hachoir ménager, le rendement d'extraction des protéines est de 10 % lorsque la proportion de plante est de 15 % de la masse totale eau + luzerne.

Dans tous les cas, les rendements sont plus faibles lorsque la luzerne est broyée et que le jus est immédiatement filtré. Ainsi, il apparaît que le cisaillement seul de la plante n'est pas suffisant pour réaliser l'extraction des protéines hors de la plante. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ce résultat :

- Le cisaillement a détruit les vaisseaux empruntés lors de la circulation naturelle de l'eau dans la plante. Ainsi, même si les protéines sont théoriquement plus accessibles, les voies de sortie pourraient être plus compliquées
- Le cisaillement libère des structures (morceaux de plante) ayant des propriétés de fixation de l'eau, et donc inhibant la diffusion des protéines.

Toutefois, après broyage au Silverson, si la luzerne est laissée au contact de l'eau pendant une journée, sous agitation magnétique faible, un accroissement de la teneur en protéines extraites est constaté, montrant que la diffusion est plus lente après broyage. La quantité de protéines extraites dans ce cas (**Tableau II. 1**), est plus importante lorsque la luzerne a été cisillée (16.1 %) que lorsqu'elle est juste découpée en morceau (8.4 %). Ainsi, le cisaillement permet d'augmenter l'accessibilité des protéines, favorisant leur extraction, mais uniquement lorsque le temps de contact est suffisant à une diffusion de ces molécules hors de la plante. Dans ce cas, la diffusion s'arrête lorsque l'équilibre des concentrations est atteint, ce qui explique que le rendement d'extraction diminue avec le rapport liquide/solide, passant de 16.1 % à 7.7 %.

En outre, la deuxième extraction est peu efficace pour déplacer les molécules extraites (Ultra-Turrax), ce qui montre que les liaisons entre les protéines et les structures de la plante sont fortes, ou que les voies de sortie des protéines ne peuvent plus être utilisées. Ces résultats mettent en évidence que pour être efficace, l'extraction des protéines doit combiner une phase de broyage augmentant la surface de contact et donc l'accessibilité des protéines, et une phase de pressage pour éliminer l'eau qui est enchâssée dans la matière végétale.

L'extrusion semble par conséquent être une alternative intéressante, puisqu'elle assure à la fois la mise sous pression de la plante, ainsi qu'un cisaillement de la matière, favorisant l'expression de l'eau de la plante et des protéines. En outre, le chauffage appliqué lors de l'extrusion devrait augmenter l'extraction des protéines comme dans le cas de ce qui est observé avec la déshydratation mécanique assistée thermiquement.

I.3. Production d'extrait de luzerne par extrusion bi-vis

L'étude de l'extraction des protéines par extrusion bi-vis sera étudiée de manière plus approfondie dans le **Chapitre III**. Dans le présent chapitre, sont présentées uniquement les conditions de production de grandes quantités d'extrait à partir du lot 1 de luzerne, ainsi que des exemples précis de traitements des lots 2 et 3.

La composition chimique de la luzerne évolue avec le stade de développement de la plante (**Chapitre I**). Ainsi, au cours de l'année et selon la coupe, une variabilité importante de sa qualité est observée. Or, plusieurs lots de luzerne ont dû être utilisés lors de l'étude du procédé, car l'approvisionnement en matière première au cours de la thèse a été rendu complexe par le manque de stabilité de la plante. Comme la composition de la matière première conditionne la qualité des fractions obtenues tout au long du procédé, dans un premier temps, les différents lots de luzerne utilisés vont être caractérisés.

I.3.1 Caractérisation des lots de luzerne

Trois lots de luzerne ont été employés au cours de la thèse. Ils provenaient de champs de culture différents, fauchés à des stades de développement variés. Leur description est détaillée dans le **Chapitre V**.

Sur chacun des lots de luzerne, la teneur en principaux constituants (protéines, lipides, fibres, sucres solubles, matière minérale) a été déterminée (**Tableau II. 2**).

Tableau II. 2 : Composition chimique des différents lots de luzerne reçus

	Luzerne entière Lot 1	Luzerne entière Lot 2	Luzerne entière Lot 3
Matière sèche (%)	23.8 ± 0.9	37.9 ± 0.8	20.1 ± 0.3
Matière minérale	10.2 ± 1.5	13.7 ± 1.6	8.7 ± 1.5
Protéines totales	27.2 ± 1.7	15.25 ± 1.2	28.1 ± 1.5
Lipides	5.4 ± 0.4	8.3 ± 0.3	5.2 ± 0.3
Sucres solubles	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	8.4 ± 2.0
Cellulose	26.2 ± 1.1	<i>n.d.</i>	20.3 ± 1.1
Hémicelluloses	19.5 ± 0.3	<i>n.d.</i>	15.6 ± 1.7
Lignines	7.6 ± 1.4	<i>n.d.</i>	10.3 ± 0.3

En % sur la matière sèche, moyennes et écarts-types calculés sur au moins 3 valeurs. La teneur en sucres solubles et en fibres de la luzerne du lot 2 n'a pas été déterminée du fait d'un problème technique ayant causé la perte de la matière.

Les résultats des dosages de constituants principaux de la luzerne montrent un recouvrement de la matière sèche qui est compris entre 96.1 % pour le lot 1 et 96.6 % pour le

lot 3. Les principales fractions de la plante sont donc bien identifiées, la variabilité étant liée à la difficulté d'avoir des aliquots identiques pour les différents dosages (rapport feuilles/tiges notamment). Les protéines totales et la cellulose sont les deux fractions majoritaires de la plante, mais les hémicelluloses et les lignines sont également des constituants représentés en forte proportion.

La comparaison des trois lots indique que la teneur en matière sèche et la composition de la plante varient fortement selon la période de la coupe. Le deuxième lot a une teneur en MS de 38 %, nettement supérieure à celle des deux autres lots, qui n'est que de 24 et 20 % pour les lots 1 et 3 respectivement.

Cette différence s'accompagne d'une plus forte proportion de composés lignocellulosiques et de lipides. Ainsi, la quantité de ces derniers, en pourcentage de la plante verte, est de 5.5 % pour le lot 2 alors qu'elle n'est que de 1.3 % pour le lot 1. Le potentiel en protéines totales reste néanmoins assez stable. Il est d'environ 6.4 % (pourcentage plante verte) dans le lot 1, de 5.5 % dans le lot 2, et de 5.6 % dans le lot 3. Mais compte tenu des changements de structure de la plante, ces protéines peuvent être de nature très différente.

Il sera important de garder à l'esprit que la composition des différents échantillons obtenus après chacune des étapes du procédé de fractionnement est liée à un lot de luzerne en particulier. Il aurait été intéressant d'avoir eu la possibilité de faire un suivi de l'évolution de la qualité des fractions au cours du temps, sur une luzerne provenant d'un même champ, selon son stade de développement.

I.3.2 Bilan de l'étape d'extraction des protéines lors de l'extrusion

La luzerne traitée par extrusion bi-vis produit deux fractions distinctes :

- **L'extrudat**, solide riche en fibres et en protéines. Il pourrait, à échelle industrielle, être incorporé dans un procédé d'obtention de luzerne déshydratée classique, pour la nutrition animale.
- **L'extrait liquide**, appelé jus vert.

Alors que le traitement de la luzerne en extrusion bi-vis fera l'objet d'un chapitre entier (**Chapitre III**), il est intéressant de présenter ici des exemples de bilans sur la matière et les protéines, correspondant à quelques essais d'extrusion, pour chacun des lots de luzerne employés.

Les exemples choisis (**Tableau II. 3**) correspondent à des essais d'extrusion de la luzerne menés sur chacun des lots différents de plante, pour plusieurs profils de vis employés,

dans des conditions de fonctionnement de la machine sans eau ajoutée, ou au ratio liquide/solide le plus faible.

Tableau II. 3 : Bilan de l'étape d'extraction des protéines après extrusion de la luzerne, pour chaque lot étudié

Lot de luzerne	Lot 1		Lot 2		Lot 3	
Profil de vis	1	1	2	2	4	
S_s (rpm)	140	110	110	110	110	
θ_c (°C)	20	31	31	50	50	
Q_{EL} (kg.h ⁻¹)	28.5	11.3	9.9	11.8	15.3	
Q_{EE} (kg.h ⁻¹)	0.0	1.8	1.8	0.0	0.0	
Total ENTREE (kg.h ⁻¹)	28.5	13.1	11.7	11.8	15.3	
Q_{SF} (kg.h ⁻¹)	13.4	4.4	1.0	5.4	9.9	
Q_{SE} (kg.h ⁻¹)	12.9	5.2	12.5	6.6	5.7	
Total SORTIE (kg.h ⁻¹)	26.3	9.6	13.5	12.0	15.7	
% écart à l'entrée	-7.7	-26.4	+16.5	+0.5	+2.6	
Teneur en MS de l'extrudat (%)	59.5 ± 0.7	51.1 ± 1.9	33.5 ± 0.2	30.1 ± 0.2	34.2 ± 2.1	
RP_F (%)	21.7	39.3	8.4	35.9	28.4	

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; Q_{EL} est le débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} est le débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} est le débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} est le débit de sortie de l'extrudat ; RP_F est le rendement d'extraction des protéines dans le filtrat brut. Pour le lot 2, les exemples présentés ici correspondent aux essais 1 (profil 1) et 9 (profil 2). Pour le lot 3, les exemples correspondent à l'essai 18 (profil 2) et l'essai 22 (profil 4). Ces essais sont décrits dans le Chapitre III.

Les bilans matière effectués montrent un bon recouvrement de la matière entre l'entrée et la sortie pour les lots 1 et 3, plus faible pour le lot 2, du fait de l'introduction d'eau dans les exemples montrés ici (mauvaise maîtrise du débit de la pompe, comme mentionné dans le **Chapitre III**).

Nous constatons également une variabilité importante de la qualité des résidus solides obtenus à l'issue de l'extrusion, préfigurant l'importance du choix des paramètres (configuration du profil de vis, température) de l'extrusion. En effet, la teneur en matière sèche est de 60 % avec le lot 1, et de 30 % seulement avec le lot 3. En outre, le rendement d'extraction des protéines dans l'extrait liquide est supérieur aux pourcentages d'extraction obtenus en batch (pour les temps de mise en contact plante/eau faibles (**Tableau II. 1**)), montrant que l'extrusion permet effectivement l'extraction des protéines de luzerne, tout en assurant une déshydratation efficace de la plante.

1.4. Caractérisation des extraits de luzerne

L'objectif de l'étape d'extrusion était avant tout la production d'extraits en quantité suffisante, afin de pouvoir en étudier le fractionnement.

En premier lieu, la composition chimique de l'extrait produit au laboratoire à l'aide du procédé d'extrusion bi-vis est comparée à celle de jus de luzerne industriels, frais ou reconstitués (jus vert atomisé puis à nouveau solubilisé dans l'eau), bruts ou centrifugés.

Tableau II. 4 : Caractéristiques physico-chimiques et composition chimique de différents jus de luzerne

	Jus de luzerne industriels ¹			Jus produit par DMAT ²	Jus produits par extrusion-pressage ³		
	Jus frais	Jus reconstitué	Jus reconstitué centrifugé	T°C = 50 °C	Lot luzerne 1	Lot luzerne 2	Lot luzerne 3
Matière sèche (%)	10.1	10.0	8.1	3.2	11.9 ± 0.8	7.6 ± 3.4	7.2 ± 2.7
Matière minérale (%/MS)	<i>n.d.</i>	18.1	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	13.6 ± 0.3	<i>n.d.</i>	17.3 ± 3.0
Protéines totales (g.L⁻¹)	32.6	29.5	19.4	15.3	24.4	20.9	21.5
(%/MS)	32.3	29.5	24.0	47.7	20.5 ± 1.1	27.5 ± 3.2	29.9 ± 1.6
Protéines hydrophobes (g.L⁻¹)	15.2	11.8	1.8	3.1	13.8 ± 1.3	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Protéines hydrophiles (g.L⁻¹)	17.3	17.2	16.9	9.6	20.7 ± 1.8	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
Sucres totaux (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	35.3 ± 3.1	<i>n.d.</i>	29.4 ± 4.1
Lipides totaux (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	2.5 ± 0.2	<i>n.d.</i>	3.2 ± 0.5
Fibres (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	10.9 ± 1.1	<i>n.d.</i>	5.4 ± 1.1
pH	5.9	5.8	5.8	6.6	5.8	5.9	5.8
Conductivité (mS.cm⁻¹)	20.1	16.9	16.9	20.7	16.1 ± 1.1	8.1 ± 2.1	8.9 ± 3.2

¹ Kerfai, 2011 et données France Luzerne ; ² extrait vert brut obtenu par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement (Kerfai et al., 2011); ³ extraits verts issus de l'extrusion-pressage du lot 1 (T°C ambiante, sans ajout d'eau, profil 1), du lot 2 (moyenne sur 14 jus produits, profils 1 et 2), du lot 3 (moyenne sur les 10 jus produits, profils 2, 4 et 5).

Les données concernant le jus frais ont été obtenues auprès de France Luzerne, qui a également fourni du jus vert atomisé. Cette poudre a conduit à la production de jus reconstitué, analysé par le LISBP (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA Toulouse) avant et après centrifugation. Le LISBP a également analysé le jus obtenu par DMAT.

Le jus reconstitué après atomisation et le jus frais industriel présentent des compositions très proches, en matière sèche, protéines et répartition entre protéines hydrophobes et hydrophiles. La centrifugation du jus reconstitué conduit à une réduction de la teneur en protéines, principalement par élimination des protéines hydrophobes. Il est difficile d'établir des comparaisons entre des jus de luzerne dont on ne connaît pas la provenance, du fait de la variation liée au stade de développement de la plante. Néanmoins, il semble que le jus obtenu par extrusion-pressage montre une composition chimique proche de celle du jus industriellement produit. La teneur en protéines est légèrement plus élevée, avec une proportion plus importante en protéines hydrophiles, mais cette différence peut être liée à une variabilité de composition des plantes. En revanche, le jus produit par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement présente une composition plus proche d'un extrait de luzerne centrifugé que d'un jus brut. Les résultats obtenus montrent que l'extrusion bi-vis est parfaitement adaptée à la production d'extrait vert pour étudier son fractionnement.

II. FRACTIONNEMENT DE L'EXTRAIT VERT : SEPARATION LIQUIDE/SOLIDE

La première étape de fractionnement appliquée à l'extrait vert (jus vert) de luzerne est une séparation liquide-solide par centrifugation. Cette technique est le mode de séparation liquide/solide qui a été choisi par les autres acteurs du projet PRODULUZ pour la clarification des extraits liquides de luzerne. Afin de « standardiser » les extraits produits, de manière à ce qu'ils possèdent des propriétés proches de celles du jus produit par DMAT et de pouvoir ensuite appliquer notre procédé de fractionnement, nous avons décidé d'employer, de la même façon, la centrifugation comme seconde étape de séparation liquide/solide. La première phase de séparation liquide/solide avait lieu lors de la filtration à l'issue de l'extrusion, permettant la séparation entre le filtrat et le résidu solide d'extrusion. L'application industrielle serait l'utilisation d'une centrifugeuse à assiettes, mais dans un premier temps, l'étude a été menée avec une centrifugeuse discontinue.

La centrifugation a pour but l'élimination du jus vert des particules solides de taille variable, allant jusqu'à 2 ou 3 mm pour les fragments les plus gros (observations à la loupe binoculaire).

II.1. Influence de la vitesse de centrifugation

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'influence de la vitesse de centrifugation, afin d'optimiser au mieux cette étape, et de trouver un compromis entre quantité de matière en suspension éliminée et quantité de protéines vertes restant dans le surnageant (jus brun).

Les essais ont été conduits avec les extraits obtenus avec les lots 1 et 2 de luzerne (**Tableau II. 5**).

Tableau II. 5 : Influence de la centrifugation sur la qualité du jus clarifié obtenu

Vitesse de centrifugation (g)	Extrait de luzerne 1			Extrait de luzerne 2		
	Pourcentage massique de surnageant (%)	Teneur en MS du culot (%)	Teneur en protéines du surnageant (g.L ⁻¹)	Pourcentage massique de surnageant (%)	Teneur en MS du culot (%)	Teneur en protéines du surnageant (g.L ⁻¹)
3000	71.0 ± 1.9	30.0 ± 0.9	20.6 ± 0.3	95.5 ± 0.9	19.7 ± 2.3	23.2 ± 2.0
4000	59.3 ± 1.1	32.6 ± 0.7	18.7 ± 0.3	94.0 ± 0.8	31.4 ± 1.2	19.3 ± 0.2
5000	77.4 ± 0.0	26.9 ± 0.2	24.4 ± 0.2	96.4 ± 1.1	27.9 ± 1.1	18.2 ± 0.1

Extrait vert 1 : Teneur en MS = 13.5 %, teneur en protéines = 28.4 g.L⁻¹ (21.4 % de la MS) ; *Extrait vert 2* (jus préalablement décanté) : Teneur en MS = 8.4 %, teneur en protéines = 24.3 g.L⁻¹ (29.0 % de la MS) ; Nombre d'essais : n ≥ 3

Les résultats montrent qu'après centrifugation, les deux extraits présentent des teneurs en protéines assez proches, comprises entre 18 et 24 g.L⁻¹. Ce résultat est similaire à celui présenté dans le **Tableau II. 4** où le jus déshydraté reconstitué puis centrifugé présente une teneur en protéines hydrophobes de 1.8 %. De même, le jus obtenu après DMAT est collecté après une étape de filtration à 1 µm, ce qui expliquerait sa faible teneur en protéines, et particulièrement en protéines hydrophobes.

Dans le cas de l'extrait 1, le culot représente une proportion (40 %) plus importante que dans le cas de l'extrait 2 (5 %). La teneur en matière sèche du culot est similaire dans les deux cas, ce qui indique que la variation de proportion de culot est liée à une différence de composition de l'extrait avant centrifugation.

Dans la gamme étudiée, la vitesse de centrifugation semble pas avoir une influence sur la composition des fractions produites.

Les pertes en protéines sont très élevées, supérieures à 50 % pour l'extrait 1, et de près de 40 % pour l'extrait 2. Ces pertes sont liées à la proportion élevée de liquide, contenant des protéines, retenue dans le culot. Mais il peut également être envisagé qu'une part importante de protéines est perdue, parce qu'elles sont encore liées à des débris de membranes, ou parce qu'elles ont été extraites sous formes de micelles en phase aqueuse.

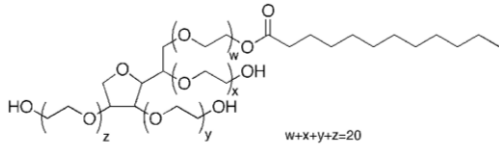
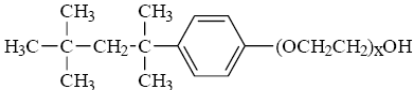
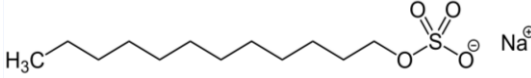
II.2. Etude du traitement du jus à l'aide de détergents

L'ajout de détergent au jus vert avant centrifugation pour la solubilisation des protéines a donc été envisagé. En effet, le détergent permet de rompre des cellules, et ainsi de donner accès aux protéines (Jones, 1999 ; Everberg et al., 2006). A forte concentration (au-delà de la concentration micellaire critique), les détergents entraînent la formation de micelles

mixtes de détergent, de phospholipides et de protéines membranaires, solubilisant les membranes. A faible concentration, les détergents se fixent aux régions hydrophobes des régions membranaires des protéines transmembranaires, les rendant plus solubles (*Lodish et al., 2004 ; Seddon et al., 2004*).

Trois types de détergent ont été testés : Tween 20, Triton X-100 et SDS (**Tableau II. 6**). En raison de leur charge, les détergents ioniques, tels que le SDS, permettent la rupture des liaisons ioniques et hydrogène. Les détergents non ioniques, quant à eux, rompent les interactions lipides/lipides et lipides/protéines plutôt que protéines/protéines, et ne modifient pas l'état natif de celles-ci (*Seddon et al., 2004*).

Tableau II. 6 : Formules et propriétés des détergents utilisés pour la solubilisation des protéines vertes (données issues des fiches produits de Sigma-Aldrich)

Nom du détergent	Formule chimique	Remarques	Concentration Micellaire Critique
Tween 20 (polysorbate 20 ou monolaurate de sorbitane polyoxyéthylène)		Non ionique Agent solubilisant de protéines membranaires	$9.04 \cdot 10^{-5}$ M (à 21 °C)
Triton X-100 (polyéthylène glycol)		Surfactant non ionique Solubilisation de protéines membranaires dans leur état natif	2.2 à $2.4 \cdot 10^{-4}$ M (à 25 °C)
SDS (Sodium dodécyl sulfate)		Surfactant ionique Contribue à la lyse de cellules	$8.2 \cdot 10^{-3}$ M (à 25 °C)

Une première étude a été menée uniquement sur l'effet du Tween 20. L'influence de plusieurs facteurs sur la quantité de protéines récupérées dans le jus clarifié après centrifugation a été testée : durée d'agitation du mélange jus vert/détergent, durée de centrifugation, vitesse de centrifugation et concentration en détergent. Seuls sont présentés dans le **Tableau II. 7** les résultats concernant l'influence de la concentration.

Tableau II. 7 : Effet du traitement du jus vert par le Tween 20 sur la solubilisation des protéines et leur récupération après centrifugation

Echantillon	Concentration Tween 20 (g.L ⁻¹)	% MS du culot après centrifugation	Teneur en protéines du culot (% de la MS)	Teneur en protéines du surnageant (% de la MS)
1	30.0	35.8 ± 1.5	13.7 ± 0.6	22.2 ± 0.2
2	26.7	36.4 ± 0.2	13.2 ± 0.1	22.2 ± 0.6
3	20.1	37.9 ± 3.0	13.4 ± 0.3	24.7 ± 2.7
Témoin	0.0	33.2 ± 0.2	15.4 ± 0.5	21.4 ± 0.1

La centrifugation a été menée dans chacun des cas à 4000 g, pendant 20 min, à 20 °C. Extrait vert utilisé issu du lot de luzerne 1, obtenu par extrusion (profil 1, sans ajout d'eau, à température ambiante). 2 répétitions.

Les résultats mettent en évidence une solubilisation des protéines membranaires. En effet, la teneur en protéines dans le surnageant est plus importante que celle du témoin. Cette augmentation est toutefois limitée, ce qui montre que même si des protéines ont été extraites des membranes, elles se sont agrégées et sont éliminées par centrifugation. Ces observations vont à l'encontre de ce qui est couramment lu dans la bibliographie, le Tween 20 étant connu pour protéger les protéines de l'agrégation (*Bam et al., 1996 ; Katakam et al., 1995 ; Wang et al., 2008*). Il semble donc que la présence de nombreuses autres molécules dans l'extrait de luzerne perturbe l'action de ce détergent, ou que la concentration utilisée n'ait pas été la bonne. Enfin, l'augmentation de la concentration en détergent dans le jus diminue la reproductibilité de la solubilisation (écart-type qui augmente).

Deux autres détergents ont ensuite été testés : Triton X-100 et SDS. Les rapports détergent/protéines utilisés ont été choisis à partir des résultats présentés par *Everberg et al. (2006)*.

Tableau II. 8 : Influence de détergents sur la récupération de protéines dans le jus centrifugé

Détergent	Vitesse centrifugation (g)	Teneur en protéines moyenne du culot (% de la MS)	% de protéines en plus dans le jus par rapport au témoin*
Triton X-100	3000	7.3 ± 0.6	35.7 ± 6.1
	4000	8.3 ± 0.5	22.0 ± 6.6
SDS	3000	6.5 ± 0.4	48.3 ± 3.6
	4000	6.5 ± 0.5	44.0 ± 2.6

Moyennes sur 4 échantillons par expérience. Témoin obtenu par centrifugation à 4000 g : teneur en protéines du culot = 17.0 % de la MS, teneur en protéines du surnageant = 22.5 % de la MS

* Valeur effectivement calculée : pourcentage de protéines ne se retrouvant pas dans le culot par rapport au témoin. La teneur en protéines du surnageant n'a pas été déterminée

Le Triton X-100 a été choisi car, comme le Tween 20, il augmente la solubilisation des protéines (*le Maire et al., 2000a*), alors que le SDS, en permettant la solubilisation des membranes, bicouches lipidiques, pourrait participer à la stabilisation des protéines dans l'extrait.

Les résultats montrent que le Triton X-100 permet d'augmenter le rendement de récupération des protéines de près de 30 %. La teneur en protéines de l'extrait après centrifugation est supérieure à sa teneur en protéines hydrophiles avant centrifugation. L'ajout de tensio-actif permet donc bien d'améliorer la récupération de protéines hydrophobes. Cet effet est encore plus important avec l'ajout de SDS, puisque l'augmentation de la teneur en protéines dans le surnageant est de presque 50 %. Le SDS permet donc de récupérer près de 8.1 g.L⁻¹ de protéines en plus (calcul effectué à partir du témoin à 18.1 g.L⁻¹ de protéines dans l'extrait centrifugé).

Toutes les protéines extraites des membranes ne sont pas solubilisées, car, séparés des membranes, les segments hydrophobes exposés des protéines ont tendance à interagir les uns avec les autres, provoquant l'agrégation des molécules et leur précipitation en solution aqueuse. Ce phénomène est néanmoins atténué par la présence des détergents, se fixant préférentiellement aux segments hydrophobes des protéines, et empêchant leur agrégation (*Lodish et al., 2004*). On peut donc envisager que l'on récupère une quantité importante de protéines hydrophobes dans le surnageant après centrifugation. D'après les données issues de la littérature concernant la répartition entre protéines hydrophiles et protéines hydrophobes (*Douillard et De Mathan, 1994*), il semble que l'addition de détergent permette la récupération de près de 60 % des protéines hydrophobes.

En présence de tensioactifs, la détermination de la teneur en protéines par la méthode de Kjeldahl est moins répétable, mais il apparaît que l'augmentation de la vitesse amplifie la perte en protéines.

Aucun essai d'optimisation de la centrifugation ou d'ajout de tensioactif n'a été effectué, car cette étude avait surtout pour objectif de comprendre sous quelle forme se trouvaient les protéines hydrophobes dans l'extrait, et de valider la faisabilité de leur récupération. Néanmoins, l'utilisation de détergents n'est pas forcément la technique industrielle qui serait utilisée pour la libération des protéines hydrophobe, car elle ne semble pas applicable. En effet, si le jus est traité avec du détergent, il devient alors nécessaire de rajouter une étape afin d'éliminer ce détergent : dialyse, adsorption hydrophobe, chromatographie... (Seddon *et al.*, 2004). Il faut également signaler que les détergents peuvent modifier la structure des protéines. Ainsi, le SDS est presque toujours dénaturant (Le Maire *et al.*, 2000b) car il se fixe aux chaînes latérales des protéines, modifiant leur conformation.

II.3. Bilan de l'étape de centrifugation

La **Figure II. 3** présente un bilan matière de l'étape de centrifugation (4000 g, 20 min, 20 °C), sur le jus produit par extrusion bi-vis de la luzerne du lot 1. Ce bilan est effectué sur la matière totale, ainsi que sur la matière sèche et les protéines.

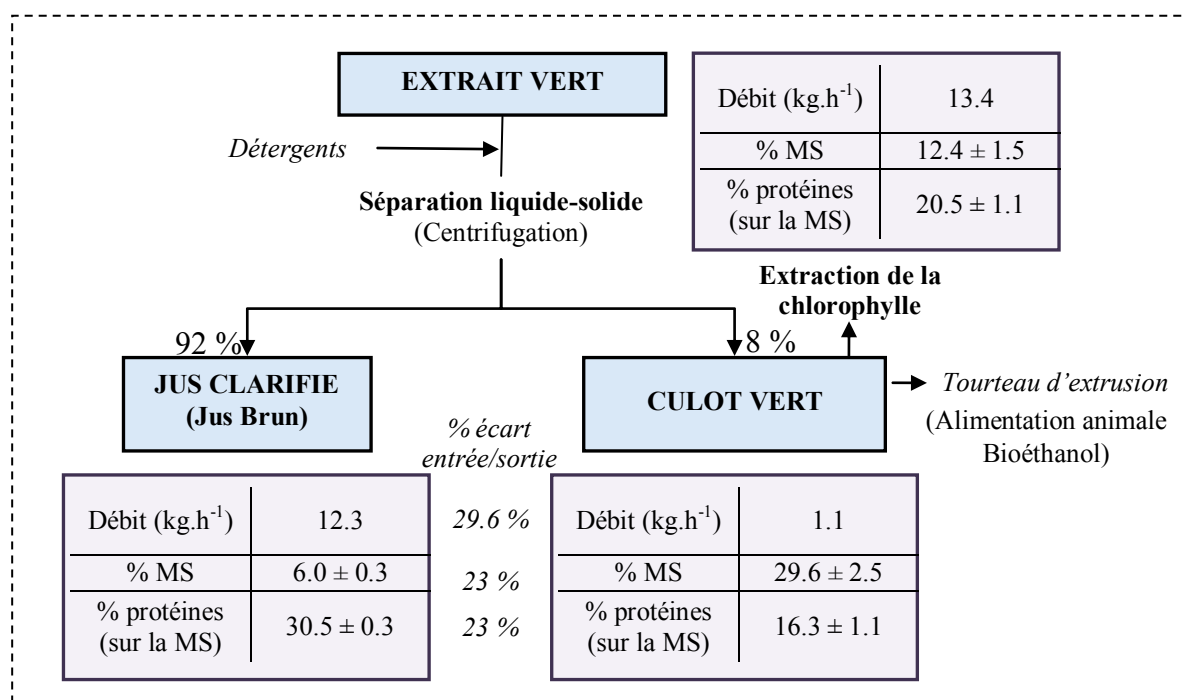


Figure II. 3 : Première étape de fractionnement de l'extrait vert de luzerne : exemple d'un bilan massique sur la centrifugation

(luzerne utilisée : Lot 1, extrudée à l'aide du profil 1, T°C ambiante, sans ajout d'eau : ratio L/S = 3.2)

L'extrait vert de départ a une teneur en matière sèche de 12.4 % (± 1.5 %) et une teneur en protéines égale à 20.5 % de la matière sèche, soit une concentration de 25.4 g.L⁻¹. Les études menées sur cet extrait (Douillard, 1985) indiquent que la moitié de ces protéines sont hydrosolubles (ou blanches) et l'autre moitié consiste en des protéines hydrophobes (ou vertes). L'extrait subit une centrifugation dont la vitesse a été fixée à 4000 g. La quasi-totalité de la masse d'extrait vert (92 %), après centrifugation, est constituée de jus clarifié, tandis que le culot ne représente que 8 % de la masse.

Le jus clarifié est également appelé **jus brun** du fait de sa couleur. Il contient 31.1 % de protéines par rapport à la matière sèche, ou 18.7 g.L⁻¹. 90 % environ de ces protéines sont hydrosolubles, tandis que seulement 10 % sont les protéines lipophiles que nous cherchons à isoler.

Le moyen utilisé pour quantifier la teneur en chacune de ces deux familles de protéines est la saturation du milieu en sulfate d'ammonium. A 27 % de saturation, les protéines vertes précipitent, tandis que les protéines blanches précipitent dans un milieu saturé à 55 % (Di Jeso, 1968). Cette méthode est arbitraire mais nous permet néanmoins de suivre l'évolution de la composition en protéines à chaque étape du procédé de fractionnement, sachant toutefois que sa précision reste faible.

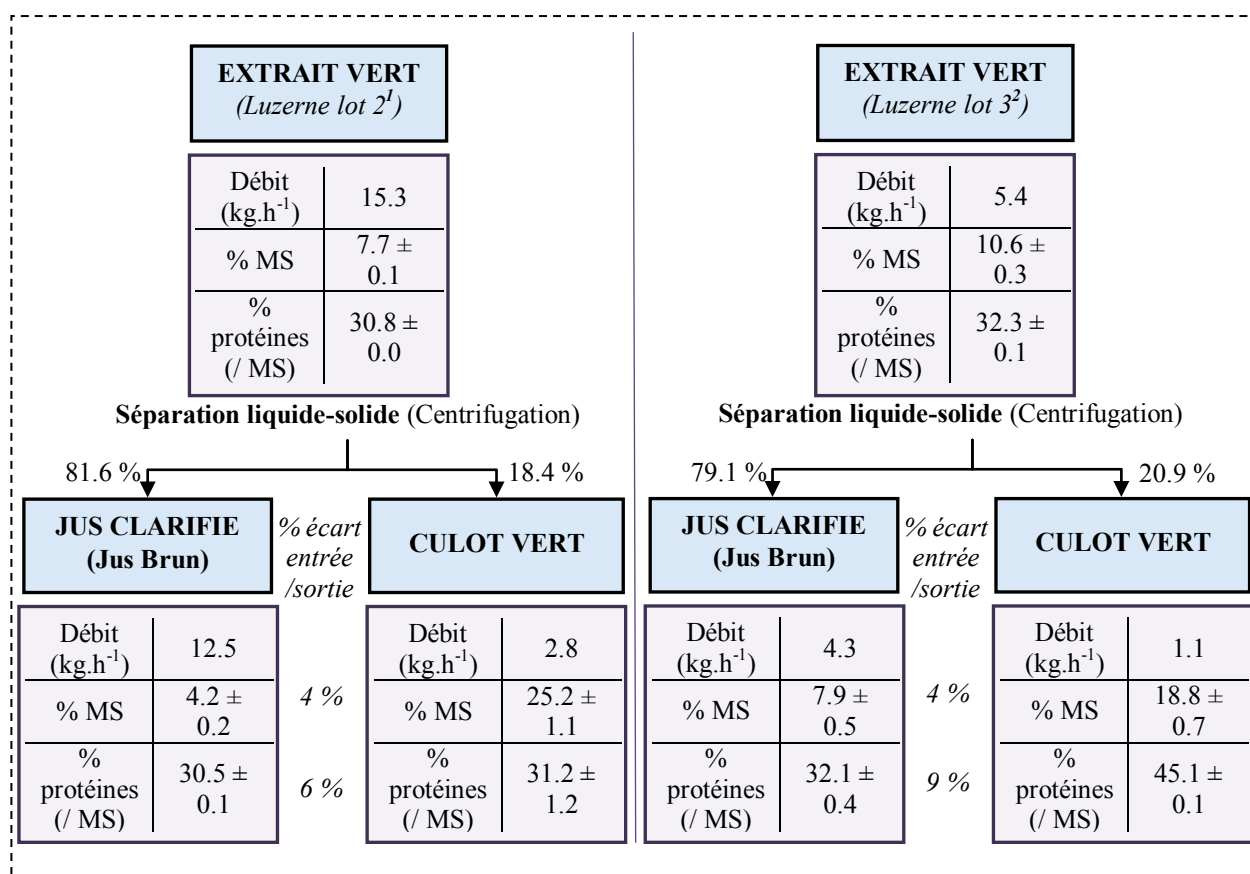


Figure II. 4 : Bilans massiques sur l'étape de centrifugation, luzernes issues des lots 2 et 3
 (Luzernes utilisées : ¹Lot 2, correspondant à l'essai 11 (profil 2, 50 °C, ratio L/S = 5.1) ; ²Lot 3, correspondant à l'essai 18 (profil 2, 50 °C, ratio L/S = 4))

La **Figure II. 4** présente le bilan de l'étape de centrifugation pour des extraits de luzerne obtenus à partir des lots 2 et 3.

Les résultats obtenus dépendent beaucoup des conditions d'extraction. Cependant, les jus clarifiés ont des teneurs en protéines moins variables que celles des extraits verts initiaux. Il semble que les protéines solubles soient très bien extraites, à un rendement similaire selon les conditions opératoires. C'est la teneur en protéines hydrophobes qui change. Cette variation semble liée à la teneur en matières en suspension extraites.

II.4. Caractérisation des fractions protéiques

II.4.1 Composition des extraits

Dans un premier temps, la composition des extraits obtenus après centrifugation a été comparée à celle du jus reconstitué après centrifugation et celui du procédé DMAT (**Tableau II. 9**).

Tableau II. 9 : Caractéristiques physico-chimiques et composition chimique de différents jus de luzerne

	Jus industriel reconstitué <u>centrifugé</u> ¹	Jus produit par DMAT ² T°C cellule = 50 °C	Extrait vert centrifugé produit par extrusion-pressage ³
Matière sèche (%)	8.1	3.2	6.0 ± 0.3
Matière minérale (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	24.1 ± 0.3
Protéines totales (g.L⁻¹)	19.4	15.3	18.3
Protéines (%/MS)	24.0	47.7	30.5 ± 0.3
Protéines hydrophobes (g.L⁻¹)	1.8	3.1	1.2 ± 0.5
Protéines hydrophiles (g.L⁻¹)	16.9	9.6	20.7 ± 6.1
Sucres simples (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	32.2 ± 4.1
Lipides totaux (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.2
Fibres (%/MS)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.0
pH	5.8	6.6	5.8
Conductivité (mS.cm⁻¹)	16.9	20.7	16.5

¹ Kerfai, 2011 et données France Luzerne ; ² extrait vert brut obtenu par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement (Kerfai et al., 2011); ³ extrait vert issu de l'extrusion-pressage du lot 1

La composition de la matière sèche de ces extraits est similaire, avec des teneurs en protéines totales de 15 % pour le procédé DMAT, et 19 % par le procédé industriel. Toutefois, le procédé DMAT conduit à l'obtention d'un extrait contenant moins de matière sèche, et avec une forte proportion de protéines hydrophobes (25 % des protéines totales), alors qu'elle n'est que de 10 % pour le procédé industriel. Le procédé développé au laboratoire, combinant extrusion et centrifugation permet l'obtention d'un extrait de composition proche de celui obtenu par un procédé industriel.

Le procédé DMAT diffère des deux autres par la technique d'extraction, mais aussi parce que la séparation liquide/solide a été menée par filtration, dans un milieu filtrant de l'ordre de 1 µm. Ainsi, le filtrat obtenu contient moins de matière sèche (3.2 % contre 6 à 9 % pour les extraits centrifugés). En revanche, cette matière sèche contient beaucoup plus de protéines, près de 50 %, contre 20 à 30 % pour les extraits centrifugés. La centrifugation entraîne une part importante des protéines dans le culot, principalement les protéines hydrophobes. Il apparaît ainsi que la centrifugation n'est peut-être pas la technique la plus appropriée pour la récupération des protéines hydrophobes. La centrifugation a toutefois été validée, à l'échelle de notre laboratoire, avec une centrifugeuse discontinue, alors que le procédé industriel serait mené à l'aide d'une centrifugeuse continue. Les conditions de

fonctionnement sont très différentes, et pourraient conduire à des résultats également très différents.

Il faut également remarquer que les résultats de précipitation des protéines au sulfate d'ammonium manquent de répétabilité. Ces mesures ont été effectuées sur de nombreux lots de luzerne différents, et les résultats étaient très variables. Aussi cette méthode ne permet-elle pas une quantification précise des fractions protéiques obtenues.

Cette procédure permet néanmoins l'obtention de fractions protéiques qui ont été analysées pour leur caractérisation en termes de composition en acides aminés par HPLC-UV.

II.4.2 Composition en acides aminés

La composition des protéines en acides aminés a été déterminée afin d'étudier si leur aminogramme pouvait définir les protéines vertes comme hydrophobes car riches en acides aminés hydrophobes, et également de manière à mettre en évidence une différence de profil entre protéines hydrophiles et protéines hydrophobes.

Plusieurs essais ont été réalisés pour définir les profils d'acides aminés de culots protéiques issus de la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Des tests ont également été effectués sur un extrait vert préalablement décanté. Les protocoles d'hydrolyse ont dus être modifiés et adaptés selon l'origine des échantillons (**Chapitre V**, quantité injectée dans la machine, volume de tampon à pH 2.2 utilisé pour la solubilisation de l'hydrolysate).

Les résultats obtenus sur les chromatogrammes sont la concentration de chaque acide aminé en nmol dans l'échantillon injecté. Toutefois, les protocoles d'obtention des hydrolysats ayant varié d'un échantillon à l'autre, les résultats sont calculés en pourcentage relatif de chaque acide aminé.

Il faut signaler en outre que la machine comporte deux détecteurs : un détecteur à 570 nm permettant la détection de tous les acides aminés sauf la proline et l'hydroxyproline, ainsi qu'un détecteur à 440 nm permettant la détection de ces deux acides aminés en particulier. Seuls les résultats du détecteur à 570 nm sont ici explicités (**Figure II. 5**), les autres ne mettant pas en évidence de différence entre les profils d'acides aminés.

Deux expériences de précipitation des protéines au sulfate d'ammonium ont été menées. Le culot de protéines blanches issu de la première expérience n'a pas été séché, et a été utilisé pour les prises d'essais et les hydrolyse permettant l'obtention des échantillons 1 et

2. Le culot issu de la seconde expérience a quant à lui été séché, et a servi pour l'obtention des échantillons 3 et 4. De la même manière, les échantillons de protéines vertes 5 et 6 sont issus de la première série de précipitation différentielle (culot non séché), et les échantillons 7 et 8 proviennent de la seconde expérience. Ceci permet de comparer l'aminogramme d'un même échantillon lorsque le dosage est répété, mais aussi de comparer les profils de deux extraits supposés identiques mais obtenus lors de deux essais différents.

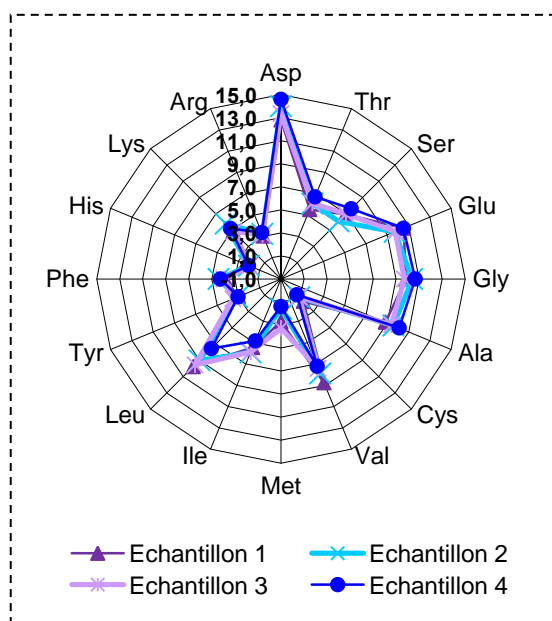


Figure II. 5 : Profil des concentrations relatives en acides aminés pour différents échantillons de culots de protéines blanches

(% relatif de la concentration totale en nmol. Echantillons 1 et 2 issu du même culot de protéines blanches non séché ; échantillons 3 et 4 issus d'un second culot de protéines blanches séché avant hydrolyse)

Les résultats obtenus pour les protéines blanches (**Figure II. 5**) et les protéines vertes (**Figure II. 6**) montrent que cette technique de dosage des acides aminés présente une bonne reproductibilité. Toutefois, il apparaît une plus grande variabilité dans la composition de l'échantillon de protéines vertes.

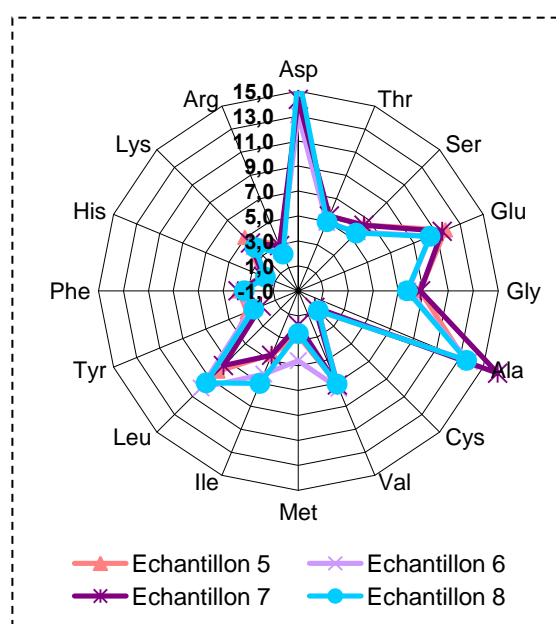


Figure II. 6 : Profil des concentrations relatives en acides aminés pour différents échantillons de culots de protéines vertes

(% relatif de la concentration totale en nmol ; échantillons 5 et 6 issus du même culot de protéines blanches non séché ; échantillons 7 et 8 issus d'un second culot de protéines blanches séché avant hydrolyse)

Dans le cas des protéines blanches, l'acide aminé le plus abondant est l'aspartate (14.5 %) puis le glutamate, la glycine et l'alanine (11 %). Le profil obtenu avec les protéines vertes est différent, avec une plus forte proportion d'alanine (15 %).

La différence notable de pourcentage relatif de l'alanine dans l'échantillon semble être un moyen de discriminer l'origine des protéines (vertes ou blanches), mais ne permet pas vraiment d'établir que les protéines sont plus hydrophobes.

II.5. Extraction de la chlorophylle

Des composés à haute valeur ajoutée peuvent être extraits du culot, notamment les colorants, tels que la chlorophylle ou la lutéine (la lutéine sert usuellement comme complément alimentaire de la nourriture des volailles pour la coloration de la viande et des œufs (Alves-Rodrigues et Shao, 2004)).

En effet, l'extrait après centrifugation présente une couleur brun foncé indiquant que la chlorophylle a été retenue avec le culot de centrifugation (celle restante est dégradée et perd sa couleur verte), tout comme pour le procédé de luzerne obtenu par DMAT.

La chlorophylle, principal pigment des végétaux photosynthétiques, est extraite industriellement de plusieurs végétaux, dont la luzerne fait partie. La production de ce

colorant, utilisé en agroalimentaire, pourrait être réalisée sur un des coproduits de notre procédé de fractionnement : le culot vert de centrifugation, et non pas uniquement à partir de la plante entière.

Un protocole permettant l'extraction et le dosage de la chlorophylle dans le culot, ainsi que dans l'extrait vert, a été élaboré. Il s'agit d'extraire la chlorophylle des feuilles broyées ou du culot à l'aide d'acétone, avant de doser la teneur en chlorophylle des extraits par spectrophotométrie, comparativement à des droites étalons obtenues à l'aide de solutions synthétiques de chlorophylle a et b. Le solvant est enfin éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Tableau II. 10 : Détermination de la teneur en chlorophylle a et chlorophylle b dans les fractions issues du traitement de la luzerne

Echantillon	Chlorophylle a (mg.g ⁻¹)	Chlorophylle b (mg.g ⁻¹)	Total chlorophylle (mg.g ⁻¹)
Jus vert	1.5 ± 0.3	2.7 ± 0.6	3.9 ± 0.8
Culot vert	20.9 ± 0.8	35.5 ± 0.4	57.0 ± 1.3
Epinard ¹	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.25 – 2.23
Laitue ¹	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.42 – 1.14
Chou chinois ¹	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	1.16 – 2.04

¹*Yin et al., 2007*

Le culot s'avère dix fois plus concentré en chlorophylle que l'extrait vert dont il est issu. La quasi-totalité du colorant est en effet récupérée dans le culot à l'issue de la centrifugation. En effet, la teneur en chlorophylle est liée à la quantité de protéines membranaires ayant des fonctions photosynthétiques (*García-Valenzuela et al., 2005*).

Le culot représente donc une réserve importante de ce colorant et pourrait être valorisé à l'échelle industrielle. Ainsi, une étude serait nécessaire afin de déterminer quelle serait la valorisation de ce co-produit la plus judicieuse : déshydratation du culot puis broyage pour la valorisation en alimentation animale, traitement par des solvants pour extraction de la chlorophylle, ou encore combinaison de ces deux étapes, avec extraction de la chlorophylle, lavage du culot puis déshydratation.

III. DESCRIPTION DU PROCÉDE DE FRACTIONNEMENT MIS EN ŒUVRE : TRAITEMENT DU JUS CLARIFIÉ PAR ULTRAFILTRATION

Après clarification et donc élimination des particules en suspension, la concentration en protéines reste faible. Une étape de concentration est donc indispensable. Celle-ci pourrait être réalisée par évaporation, mais l'ultrafiltration est une technique qui s'est imposée pour les protéines, car c'est un procédé plus économique, qui ne dénature pas ces molécules (fonctionnement à températures faibles), et qui permet une purification partielle des protéines en éliminant les petites molécules.

Dans le cas du procédé de bioraffinerie, l'objectif de l'ultrafiltration de l'extrait vert centrifugé n'est pas uniquement la concentration, mais également la production de deux fractions, le rétentat (effluent retenu par la membrane) concentré en protéines, et le perméat (effluent traversant la membrane) enrichi en polysaccharides et plus particulièrement en hémicelluloses.

Pour la concentration des protéines, le seuil de coupure des membranes est généralement de 3 à 6 fois plus petit que la masse du soluté moléculaire à retenir (*Saxena et al., 2008*). Dans notre cas, il est important que la membrane choisie laisse également passer les hémicelluloses. Deux types de membranes ont été utilisées : une ayant un seuil de coupure de 30 kDa ($S = 0.14 \text{ m}^2$), et l'autre laissant passer les molécules de diamètre inférieur à 10 kDa ($S = 0.14 \text{ m}^2$).

L'étude de l'ultrafiltration sera menée en deux temps avec d'une part l'étude des mécanismes limitant les performances du procédé et d'autre part l'étude de la phase de concentration.

La première phase est menée en **mode recyclage**, c'est-à-dire que le rétentat et le perméat sont recyclés dans la cuve d'alimentation. Comme la concentration et le volume de solution restent constants, il est possible de travailler à l'état stationnaire, et dans ces conditions, d'étudier l'influence des paramètres opératoires (pression et vitesse tangentielle) sur l'efficacité de filtration. Lors de la seconde phase, en **mode concentration**, seul le rétentat est recyclé, et il se concentre en fonction du débit de perméat. Cette étape est menée pour des conditions opératoires fixes.

III.1. Membrane de 30 kDa

La perméabilité à l'eau de la membrane a tout d'abord été évaluée. Elle est calculée à partir de l'équation de Darcy, en traçant la courbe décrivant le flux de perméat en fonction de la pression (**Figure II. 7**). Les essais ont été menés à deux vitesses tangentielles (0.4 et 0.6 m.s⁻¹), et dans les deux cas, l'évolution est linéaire, de pente égale à 46 kg.h⁻¹.m².bar⁻¹.

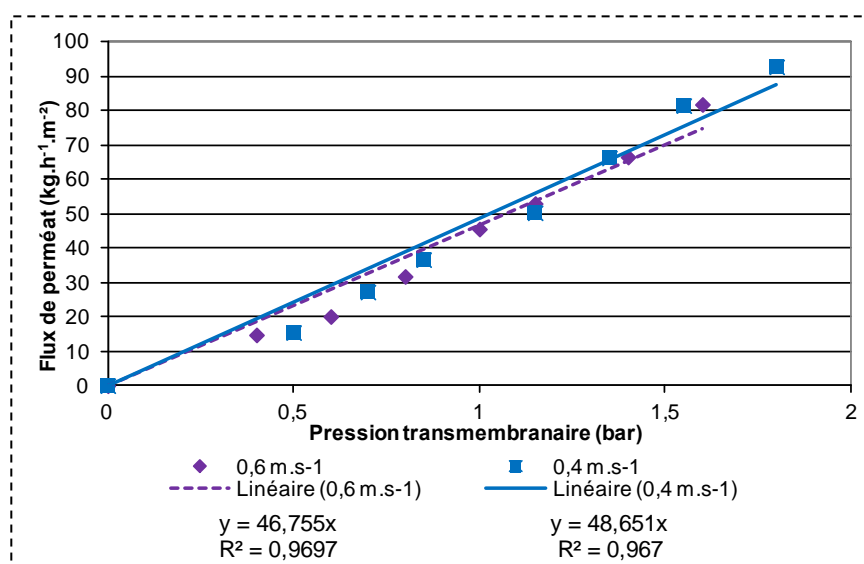


Figure II. 7 : Perméabilité de la membrane 30 kDa à l'eau

Etalonnage de la pompe : débit d'alimentation (L.h⁻¹) = 0,3962 * vitesse pompe (rpm) (R² = 0,9885) → 100 rpm → 39,6 L.h⁻¹ (vitesse tangentielle = 0,4 m.s⁻¹) ; 150 rpm → 59,4 L.h⁻¹ (vitesse tangentielle = 0,6 m.s⁻¹)

L'influence de la pression et de la vitesse tangentielle a ensuite été étudiée avec de l'extrait vert centrifugé (**Figure II. 8**).

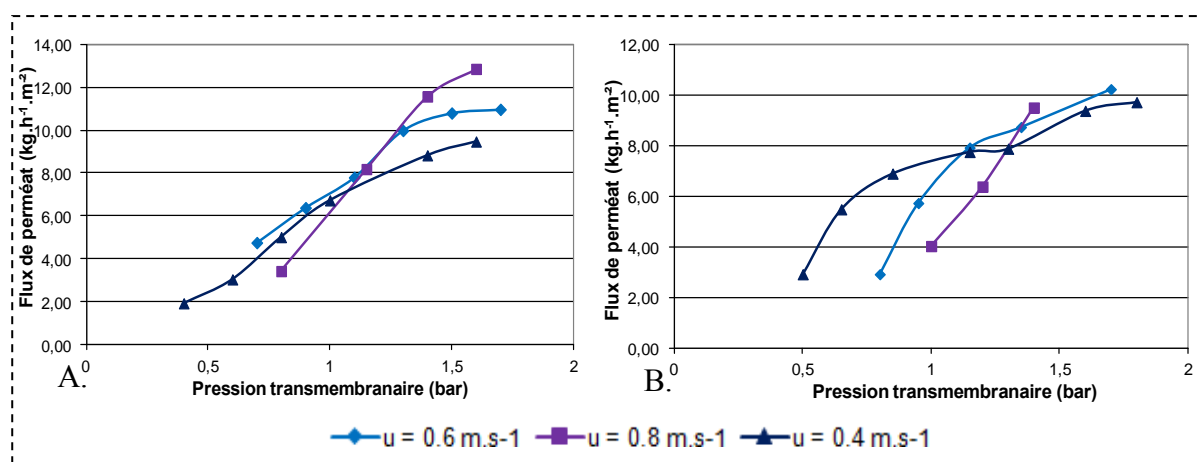


Figure II. 8 : Perméabilité de la membrane 30 kDa au jus centrifugé en fonction du débit d'alimentation

A. Essai 2 ; B. Essai 3
(u est la vitesse tangentielle en m.s⁻¹)

Trois vitesses ont été évaluées, et pour chacune, l'influence de la pression a été étudiée. Ces essais ont été menés sur deux extraits différents, afin de caractériser la reproductibilité de la technique.

Les résultats montrent tout d'abord que le flux de perméat est beaucoup plus faible que celui obtenu avec de l'eau. Dans tous les cas, le flux augmente avec la pression, mais tend vers une valeur maximale, appelée flux limite, qui dépend de la vitesse tangentielle. Lorsque cette valeur maximale est atteinte, la pression ne permet plus d'augmenter le flux de perméat. Cette évolution est caractéristique du phénomène de polarisation de concentration. Dans un premier temps, l'augmentation de pression entraîne une hausse de la concentration des molécules retenues à la surface de la membrane ; c'est le phénomène de **polarisation de concentration primaire**. Lorsque cette concentration atteint une valeur critique, la couche formée à la surface de la membrane se réorganise pour former un gel ; c'est le phénomène de **polarisation de concentration secondaire**. Lorsque cette concentration est atteinte, toute augmentation de pression conduira à une augmentation de l'épaisseur du dépôt, mais pas du flux.

Ce phénomène de polarisation de concentration dépend fortement des conditions hydrodynamiques de filtration, et dans notre cas, de la vitesse tangentielle. C'est pour cette raison que ce phénomène est beaucoup moins prononcé à la vitesse maximale et permet d'atteindre un flux limite plus élevé.

Ce type de résultats est fréquemment rapporté lors de l'ultrafiltration des protéines, ces dernières ayant des propriétés gélifiantes reconnues. Ce phénomène peut être renforcé par la présence d'hémicelluloses qui, elles aussi, présentent des propriétés gélifiantes.

L'extrait vert centrifugé est alors concentré jusqu'à atteindre un facteur de concentration volumique de 3.5 (**Figure II. 9**). Le temps pour atteindre cette concentration est long, mais le point important est que la décroissance du flux est linéaire, et relativement faible, puisque le flux final est de $8 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, ce qui correspond à une diminution de 30 % du flux. Cette décroissance linéaire est généralement liée au colmatage progressif de la membrane et à l'augmentation graduelle de la viscosité de la solution à filtrer. Il semble donc possible de concentrer plus de trois fois l'extrait, avec un flux stabilisé à $8 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

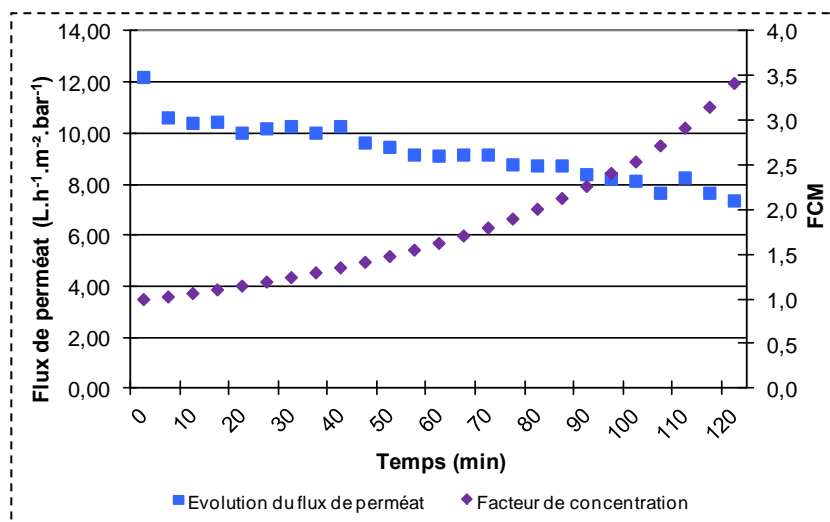


Figure II. 9 : Evolution du flux de perméat et du facteur de concentration massique (FCM) au cours de l'ultrafiltration de l'extrait centrifugé
(Essai 3 ; membrane 30 kDa ; PTM = 1,4 bar ; vitesse tangentielle = $0.4 m \cdot s^{-1}$)

Néanmoins, le facteur de concentration massique correspond à la quantité de solvant éliminé. Il faut ensuite vérifier que les protéines ne passent pas dans le perméat, et qu'elles sont bien concentrées dans celui-ci. Cela ne semble toutefois pas être le cas puisque la comparaison des concentrations (Figure II. 10) ne montre pas de différence significative entre perméat et rétentat, aussi bien pour les matières sèches que pour les protéines. Ces résultats semblent indiquer que le seuil de coupure de la membrane est trop grand et ne permet par conséquent pas de retenir les protéines.

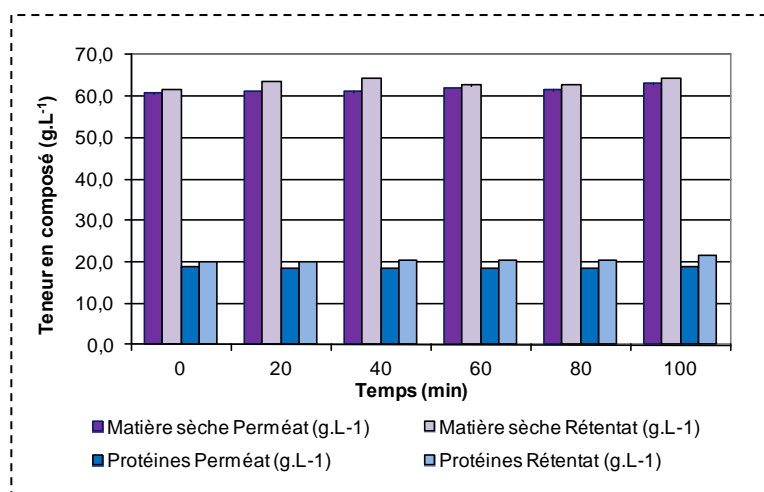


Figure II. 10 : Evolution de la concentration en matière sèche et en protéines dans le raffinat et le perméat au cours de l'ultrafiltration
(Membrane 30 kDa ; Essai 3 ; PTM = 1,4 bar ; vitesse tangentielle = $0.4 m \cdot s^{-1}$)

Des résultats différents sont attendus pour un seuil de coupure de membrane à 10 kDa, qui est plus petit.

III.2. Membrane de 10 kDa

Le seuil de coupure de 10 kDa a été testé pour concentrer les protéines. Il faut noter que ce seuil de coupure est également utilisé pour la concentration des hémicelluloses (Zeitoun, 2011). Dans ce cas, il faudrait valider que la séparation protéines/polysaccharides est possible.

La perméabilité à l'eau de la membrane a tout d'abord été étudiée à partir de l'équation de Darcy, en traçant la courbe du flux de perméat en fonction de la pression (Figure II. 11).

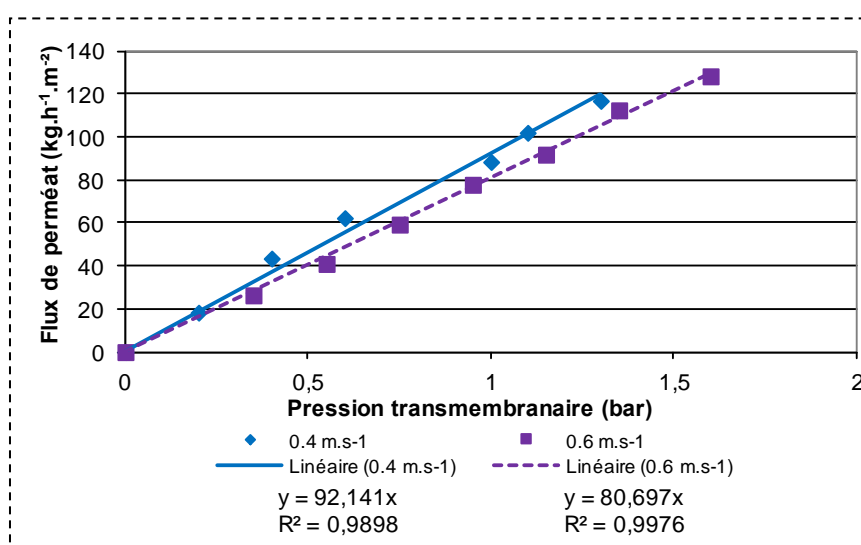


Figure II. 11 : Perméabilité de la membrane 10 kDa à l'eau

Etalonnage de la pompe : débit d'alimentation ($L.h^{-1}$) = $0,3962 * vitesse\ pompe\ (rpm)$ ($R^2 = 0,9885$) → 100 rpm → $39,6 L.h^{-1}$ (vitesse tangentielle = $0,4 m.s^{-1}$) ; 150 rpm → $59,4 L.h^{-1}$ (vitesse tangentielle = $0,6 m.s^{-1}$)

La perméabilité dépend légèrement de la vitesse tangentielle, passant d'une valeur de $92 L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ à $0,6 m.s^{-1}$ à $80 L.h^{-1}.m^{-2}.bar^{-1}$ à $0,8 m.s^{-1}$. Ce type d'évolution est parfois rapporté et serait lié à une modification de l'évolution de la perte de charge dans le canal d'alimentation. A débit élevé, la perte de charge n'est plus linéaire et la membrane ne fonctionne plus de manière optimale.

L'influence de la pression et de la vitesse tangentielle a ensuite été étudiée avec de l'extrait vert centrifugé (Figure II. 12).

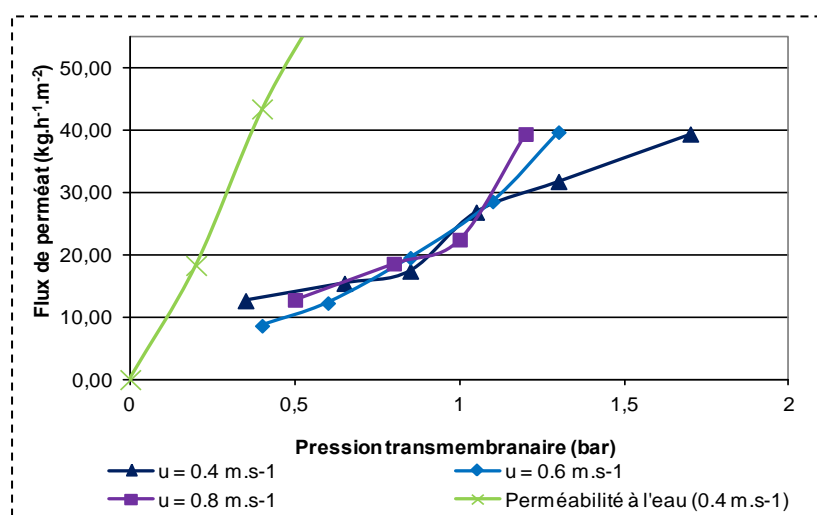


Figure II. 12 : Perméabilité de la membrane au jus centrifugé en fonction du débit d'alimentation et de la vitesse tangentielle
(Membrane 10 kDa)

Le phénomène de couche de polarisation de concentration apparaît lorsque la vitesse tangentielle est faible, à 0.4 m.s^{-1} . Néanmoins, il reste limité à une polarisation de concentration de type primaire, sans qu'apparaisse de flux limite, même à la pression de 1.5 bar. Lorsque la vitesse est supérieure à 0.4 m.s^{-1} , l'augmentation de la pression permet d'accroître le flux de perméat, mais également la perméabilité. Il ne semble pas que la couche de polarisation soit un facteur limitant.

Les valeurs de flux obtenues sont par ailleurs très élevées, avec une diminution de simplement 50 % par rapport à l'eau, et trois fois plus élevées que celles obtenues avec la membrane à 30 kDa. Cette différence entre les deux membranes avait déjà été identifiée dans des travaux précédents, lors de la purification d'hémicelluloses (Maréchal, 2001 ; Zeitoun, 2011). Ces membranes, bien que de composition similaire, semblent avoir été fabriquées selon des procédés différents, qui conduisent à une rugosité de surface différente. La membrane de 30 kDa, plus rugueuse, retient les molécules à sa surface, favorisant la formation d'une couche de polarisation de concentration.

L'extrait vert centrifugé est ensuite concentré jusqu'à atteindre un facteur de concentration massique de 2.5 (Figure II. 13). Cette concentration est rapide, beaucoup plus qu'avec la membrane de 30 kDa, car le flux demeure très élevé tout au long de cette étape, la décroissance n'étant que de 10 %, en comparaison avec la valeur de 25 %, observée au même FCM avec la membrane de 30 kDa. Cette plus faible décroissance peut s'expliquer par un plus faible colmatage de cette membrane, comme supposé par les observations du paragraphe

précédent. En outre, comme le seuil de coupure est plus petit, les molécules rentrent moins dans les pores, et bouchent donc moins la membrane.

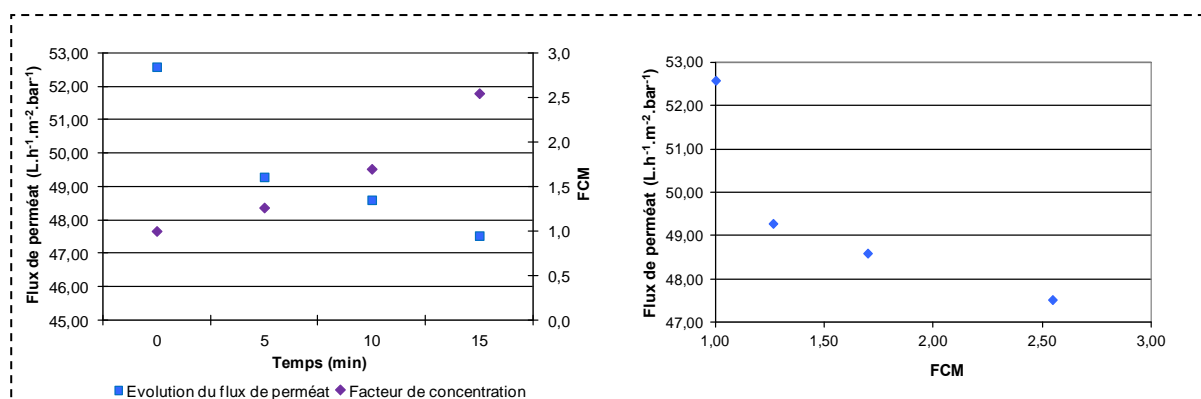


Figure II. 13 : Evolution du flux de perméat et du facteur de concentration massique (FCM) au cours de l'ultrafiltration de l'extrait centrifugé

(Membrane 10 kDa ; PTM = 1.4 bar ; vitesse tangentielle = 0.4 m.s⁻¹)

Ainsi, avec la membrane de 10 kDa, il est possible de concentrer l'extrait vert centrifugé avec un flux de plus de 45 L.h⁻¹.m².bar⁻¹. Toutefois, il faut encore vérifier que les protéines restent bien dans le rétentat pour que le procédé soit efficace.

Mais comme pour la membrane à 30 kDa, il n'y a pas de différence significative de concentration en protéines entre rétentat et perméat. Ainsi, l'hypothèse émise est que, même si le rétentat ne s'enrichit pas en protéines totales, il doit avoir une composition en protéines différente de celle du perméat. Afin de vérifier cette hypothèse et de mettre en évidence des profils protéiques différents, des extraits de perméat et de rétentat sont analysés par HPLC-UV. La quantification des pics n'a pas été possible, mais la comparaison de la composition protéique peut être réalisée qualitativement (**Tableau II. 11**).

Douze pics principaux sont détectés dans l'alimentation (extrait vert décanté). Chacun d'eux est retrouvé soit dans le perméat, soit dans le rétentat, soit dans les deux. Une solution de Rubisco a en outre été ajoutée à cinq échantillons de rétentat, de manière à identifier les pics correspondant à cette protéine.

Tableau II. 11 : Comparaison des chromatogrammes obtenus après passage en HPLC-UV des échantillons de l'ultrafiltration (membrane 10 kDa)

N° du pic	Temps de rétention (min)	Présence dans l'alimentation	Présence dans le perméat	Présence dans le rétentat	Présence dans rétentat + Rubisco
1	1.759 ± 0.026	X		X	X
2	2.888 ± 0.014	X	X		
3	3.519 ± 0.168	X	X		
4	4.789 ± 0.039	X	X	X	X
5	5.590 ± 0.162	X	X		
6	5.903 ± 0.091	X	X		X
7	6.385 ± 0.020	X	X	X	X
8	6.699 ± 0.291	X		X	X
9	7.087 ± 0.068	X	X		
10	7.858 ± 0.116	X	X	X	X
11	8.794 ± 0.076	X	X	X	X
12	9.300 ± 0.010	X		X	X

La dernière colonne représente des échantillons de rétentat dans lesquels a été ajoutée une solution de Rubisco X représente la présence d'un pic au temps de rétention considéré, pour tous les chromatogrammes obtenus correspondant à la fraction

Dans le rétentat, les pics majoritaires sont le pic 8 (aire relative = 34.1 %) et le pic 11 (aire relative = 33.6 %), alors que **dans le perméat**, ce sont les pics 2 (aire relative = 51.3 %) et 11 (aire relative = 31.0 %) qui sont majoritaires. Il apparaît que la protéine 8 (présente uniquement dans le rétentat) est bien retenue par la membrane, alors que la protéine 11 (présente dans les deux fractions), passe plus facilement. Lorsque les aires des pics détectés dans chacune des fractions, un facteur global d'environ 10 est mis en évidence, montrant que les protéines sont moins concentrées dans le perméat. Or, le FCM obtenu après ultrafiltration était égal à 4, ce qui signifie que même les protéines les plus concentrées dans le perméat (comme la protéine 11) sont également partiellement concentrées dans le rétentat.

L'ultrafiltration permet plus particulièrement la séparation entre les protéines 1, 8 et 12, présentes uniquement dans le rétentat, et les protéines 2, 3, 5, 6 et 9, détectées uniquement dans le perméat.

En revanche, les protéines 4, 7, 10 et 11 se partagent entre les deux effluents et ne peuvent pas être séparées et concentrées par ultrafiltration, contrairement aux protéines (ou fractions protéiques) 1, 8 et 12.

Afin de vérifier si la Rubisco correspond à un de ces trois pics, cette protéine a été ajoutée dans le rétentat. Cet ajout n'a pas conduit à une augmentation importante et significative d'un pic en particulier, mais plutôt à l'accroissement de l'aire de plusieurs pics, sans toutefois qu'une quantification répétable de ce phénomène ait pu être déterminée.

Toutefois, un nouveau pic dans le rétentat est détecté : le pic 6. Ceci montre donc que dans la solution préparée, les sous-unités de la Rubisco sont sans doute séparées, et sont éluées à des temps de rétention différents. La fraction de Rubisco composant le pic 6 passe intégralement dans le perméat, puisqu'on ne la retrouve jamais dans le rétentat, sauf quand celui-ci est supplémenté en Rubisco.

Il apparaît donc que la filtration sur membrane permet effectivement la séparation entre différentes protéines contenues dans l'extrait. Le perméat semble contenir plus de fractions protéiques différentes, et il est possible que l'azote quantifié par la méthode de Kjeldahl (et qui ne met pas en évidence de différence des teneurs en protéines entre perméat et rétentat) soit lié à la présence d'oligopeptides, de peptides et d'acides aminés libres dans le perméat. Dans tous les cas, la Rubisco semble se répartir en plusieurs fractions qu'il est difficile de concentrer par ultrafiltration.

IV. CONCLUSIONS

La luzerne est une plante verte riche en eau dont le traitement usuel en usine de déshydratation pour la production de fourrage, consiste en un pressage suivi d'un séchage, généralement sur tambour. La première étape de pressage conduit à la production de larges quantités de jus de luzerne. Or, ce jus, riche en protéines, peut être lui aussi fractionné afin d'être valorisé.

Ainsi, notre objectif a été l'élaboration d'un procédé global de fractionnement de la plante, dans le cadre de la bioraffinerie de la luzerne plante entière. Le traitement de la luzerne par extrusion bi-vis permet l'obtention d'un extrait vert liquide ayant des caractéristiques (teneur en protéines notamment) assez proches de celles des jus verts produits industriellement. En outre, le jus produit au laboratoire a des propriétés plus proches d'un jus industriel que les jus obtenus par Déshydratation Mécanique Assistée Thermiquement dans le cadre du projet PRODULUZ. Dans l'extrudeur, une première étape de séparation liquide/solide est réalisée, grâce à la présence d'un filtre permettant l'obtention des deux fractions distinctes : filtrat et résidu solide.

Le résidu solide, déjà déshydraté en partie, obtenu après extrusion, pourrait être inséré dans la filière traditionnelle de la nutrition animale. Cependant, sa richesse en fibres est susceptible d'en faire une matrice intéressante pour la fabrication d'agromatériaux.

Une seconde étape de séparation liquide/solide est nécessaire pour le fractionnement de l'extrait, car il est encore chargé en particules solides, gênant les étapes ultérieures. Une centrifugation discontinue est par conséquent menée sur l'extrait vert, et permet d'obtenir un jus clarifié, de couleur brune, sur lequel les protéines seront séparées, et un culot riche en chlorophylle. Cette propriété en fait une source pour l'extraction de ce composé coloré, source pouvant se substituer à la plante entière.

Le jus clarifié subit par la suite une étape d'ultrafiltration, permettant d'obtenir un filtrat et un rétentat, ayant des profils protéiques différents. Les protéines contenues dans le rétentat pourraient ensuite être fractionnées par chromatographie.

Ce schéma de fractionnement a été mis au point à l'échelle laboratoire. Passer à l'échelle pilote entrainerait un certain nombre de modifications sur chacune des étapes. Par exemple, la centrifugation, discontinue dans notre cas, serait menée sur une centrifugeuse à

assiettes, l'ultrafiltration, pour être continue comporterait plusieurs étages, ce qui permettrait d'obtenir des facteurs de concentrations massiques plus élevés,...

Nous avons donc décidé d'approfondir nos connaissances sur deux étapes de ce procédé de fractionnement :

- L'extrusion de la luzerne, pour l'optimisation de l'extraction des protéines et de la déshydratation de la plante
- Le fractionnement des protéines par chromatographie.



CHAPITRE III

APPLICATION D'UN PROCÉDE D'EXTRUSION BI-VIS POUR L'EXTRACTION DES PROTEINES DE LUZERNE ET LA PRODUCTION D'UN EXTRAIT VERT

SOMMAIRE

I. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES DE L'EXTRUSION SUR LE PRESSAGE ET L'EXTRACTION DES PROTEINES DE LUZERNE.....	- 123 -
I.1. Description des profils de vis testés.....	- 123 -
I.2. Définition des plans d'expériences	- 125 -
I.2.1 Essais préliminaires.....	- 125 -
I.2.2 Définition des limites du plan d'expériences.....	- 125 -
I.2.3 Préparation de la matière.....	- 126 -
I.3. Extrusion en conditions de pressage dominant	- 127 -
I.3.1 Déshydratation de la plante	- 129 -
I.3.2 Extraction des protéines de luzerne.....	- 132 -
I.4. Extrusion en conditions de cisaillement dominant	- 136 -
I.4.1 Evaluation de la déshydratation de la luzerne.....	- 138 -
I.4.2 Efficacité de l'extraction des protéines	- 141 -
I.5. Comparaison des deux profils de vis.....	- 144 -
II. INFLUENCE DE LA CONFIGURATION DE L'EXTRUDEUR BI-VIS SUR LA QUALITE DES FRACTIONS	- 147 -
II.1. Comparaison des deux lots de luzerne : influence de la qualité de la matière végétale-	147
-	
II.2. Modification du profil de vis	- 148 -
II.3. Influence du rapport liquide/solide sur la qualité des fractions	- 149 -
II.3.1 Répétition du Profil 2 : influence de la matière végétale.....	- 149 -
II.3.2 Contre-filets rapprochés du filtre : Profil 4.....	- 154 -
II.3.3 Profil 5 : double zone de filtration	- 160 -
II.3.3.1 Déshydratation de la luzerne	- 162 -
II.3.3.2 Extraction de la matière minérale	- 163 -
II.3.3.3 Rendement d'extraction des protéines	- 164 -
II.4. Influence de la configuration de profil de vis	- 167 -
III. CONCLUSIONS	- 172 -

Une étude de faisabilité de traitement de la luzerne plante entière par extrusion bi-vis a été réalisée, afin d'évaluer l'efficacité de cette technique pour la déshydratation de la plante, et pour l'extraction des protéines dans l'extrait vert liquide récolté. L'objectif est de savoir si l'extrusion de la luzerne pourrait constituer une étape dans le fractionnement global de la plante, assurant un premier niveau de déshydratation avant utilisation du résidu solide en alimentation animale, tout en produisant une grande quantité d'extrait vert, riche en protéines et en autres composés valorisables à forte valeur ajoutée.

L'extrusion de la luzerne a été menée sur l'extrudeur bi-vis BC-45 avec des profils de vis déterminés à partir de l'expérience du laboratoire sur des plantes similaires (salade) ou avec des objectifs similaires (extraction des composés d'intérêt) (*Evon, 2008, Maréchal, 2001, Amalia Kartika, 2005, Zeitoun, 2011*).

I. ETUDE DE L'INFLUENCE DES CONDITIONS OPERATOIRES DE L'EXTRUSION SUR LE PRESSAGE ET L'EXTRACTION DES PROTEINES DE LUZERNE

L'influence de plusieurs paramètres d'extrusion sur la qualité des fractions obtenues a été étudiée : quantité d'eau introduite, température, profil de vis. L'étude a par la suite été recentrée sur l'influence de la configuration du profil de vis (**Paragraphe II**), afin de déterminer des conditions optimales d'extraction des protéines et de pressage de la luzerne. Pour étudier ces paramètres, il faut dans un premier temps choisir les profils de vis et définir les limites du domaine d'étude.

1.1. Description des profils de vis testés

Le **premier profil de vis** est décrit sur la figure **Figure III. 1**. Des vis de convoyage trapézoïdales à double filet T2F sont insérées en début de profil de manière à assurer un transport efficace de la matière. Ensuite, les vis de convoyage utilisées sont toujours à double filet, de type C2F et exercent une action de convoyage ainsi qu'une faible action de mélange de la matière. Les éléments malaxeurs bilobes BB, insérés dans le troisième module, appliquent un cisaillement prononcé, de manière à réduire la taille des fragments de plante. De l'eau est introduite dans l'extrudeur au niveau du quatrième module, selon le ratio

liquide/solide (L/S) défini, grâce à la pompe préalablement étalonnée. Les vis à pas inverse CF1C entraînent la matière dans la direction opposée, ce qui permet de générer le bouchon dynamique. Elles sont placées juste après le module de filtration. Sous la pression exercée, l'extrait vert est exprimé de la luzerne puis filtré à travers les pores du module de filtration. Le résidu solide, appelé extrudat, est récolté en sortie de l'appareil. Ce profil présente un effet de compression prédominant et sera celui employé dans la partie « extrusion en conditions de pressage dominant » (**Paragraphe I.3**).

Luzerne congelée broyée

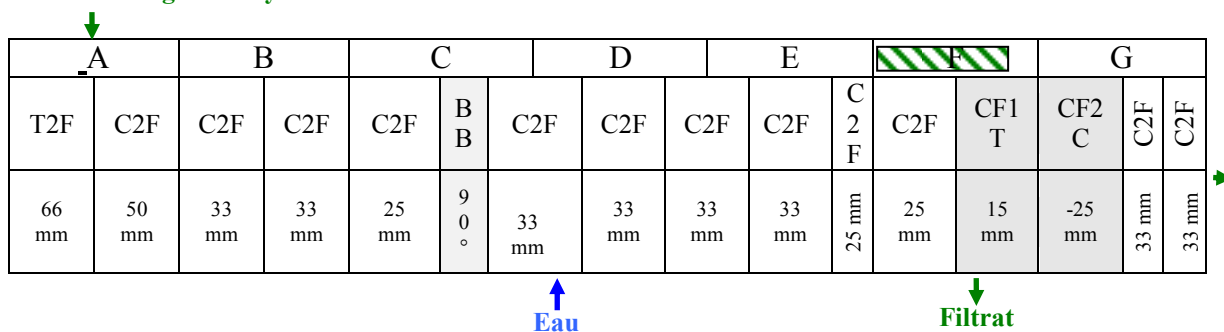


Figure III. 1 : Profil de vis n°1 utilisé pour le traitement de la luzerne sur l'extrudeur bi-vis Cletral BC-45

Dans le **second profil de vis** (Figure III. 2), des éléments restrictifs supplémentaires exerçant une action de mélange sont inclus le long de l'axe (disques malaxeurs monolobes et bilobes), afin d'améliorer la destruction des cellules végétales et d'augmenter la surface disponible pour l'interaction entre la plante et l'eau. En outre, l'utilisation de vis de convoyage à mono-filet C1F à la place de vis à double-filet permet une meilleure poussée de la matière et un effet de cisaillement plus important, ce qui augmente la destruction de la plante. Ce profil sera appelé « extrusion en conditions de cisaillement dominant » (**Paragraphe I.4**).

Luzerne congelée broyée

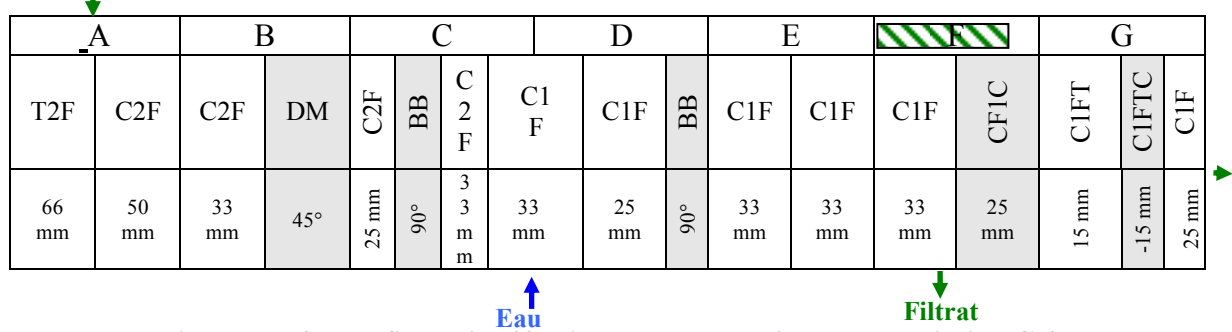


Figure III. 2 : Profil de vis n°2 mis en œuvre sur l'extrudeur bi-vis BC 45

I.2. Définition des plans d'expériences

I.2.1 Essais préliminaires

Les limites haute et basse des conditions opératoires sont définies préalablement aux essais. Ainsi, la vitesse de rotation des vis est fixée à 110 tr.min⁻¹. Elle doit être suffisante pour que la luzerne soit bien avalée par la machine, afin d'éviter à la fois l'engorgement de l'extrudeur et le reflux de liquide vers la zone d'alimentation, mais pas trop rapide pour que l'alimentation manuelle soit suffisante au maintien du remplissage de la machine.

La limite supérieure de débit d'eau est également définie. En effet, au-delà d'un certain débit, le bouchon dynamique formé au niveau des contre-filets perd en densité et en stabilité, rendant impossible la séparation liquide/solide. Dans ce cas, on n'obtient plus de filtrat, toute la matière et l'eau sortant au niveau de la zone de récupération de l'extrudat.

Après avoir procédé à ces essais préliminaires, et afin de pouvoir tester l'influence de la quantité d'eau introduite, de la température et du profil de vis monté sur l'extrudeur bi-vis, il a été décidé de mettre en œuvre deux plans d'expériences (un pour chaque profil de vis).

I.2.2 Définition des limites du plan d'expériences

L'influence de deux paramètres est testée :

- La température (variant entre 25 °C et 50 °C)
- Le ratio liquide/solide (variant entre 0 et 8). Le ratio L/S est défini comme le rapport de quantité de liquide ajoutée dans la machine sur la quantité de solide (matière sèche de la luzerne).

Une matrice de Doehlert, adaptée pour la réalisation de plans d'expériences à deux facteurs est utilisée pour définir chaque expérience à mener (**Tableau III. 1**). Une répétition du point central est effectuée. Un plan d'expériences complet est mis en œuvre pour chacun des deux profils de vis testés.

Tableau III. 1 : Matrice de Doehlert et expériences menées pour chaque profil de vis

X1	Température (°C)	X2	Ratio L/S théorique	Ratio L/S eau introduite ¹		Ratio L/S réel ²	
				Profil 1	Profil 2	Profil 1	Profil 2
0	37.5	0	2.0	3.7	3.4	5.4	5.1
+1	50	0	2.0	3.0	3.4	4.7	5.0
-1	25	0	2.0	2.8	3.1	4.4	4.8
+0.5	44	+0.866	3.7	6.1	6.8	7.7	8.4
-0.5	31	-0.866	0.3	0.4	0.5	2.0	2.1
+0.5	44	-0.866	0.3	0.5	0.5	2.1	2.1
-0.5	31	+0.866	3.7	6.1	5.7	7.7	7.3
0	37.5	0	2.0	2.9	3.6	4.5	5.2

¹ Le ratio L/S eau introduite est le rapport entre l'eau effectivement introduite dans la machine sur la quantité de solide sec (tient donc compte d'une mauvaise maîtrise de la pompe d'introduction d'eau)

² Le ratio liquide/solide réel est calculé comme étant le rapport entre quantité de liquide dans la machine (liquide introduit plus eau de la luzerne) sur la quantité de solide sec dans l'extrudeur.

Les paramètres de sortie étudiés sont la teneur en matière sèche du filtrat et de l'extrudat, pour l'évaluation de l'efficacité de la déshydratation de la luzerne, et la teneur en protéines des fractions, pour la détermination de l'efficacité de l'extraction des protéines. La différence entre ratios L/S théoriques et réels provient du fait que pour le ratio réel, il est tenu compte de la teneur en eau de la plante, des différences entre débits théorique et réel d'introduction de plante, ainsi que d'une mauvaise maîtrise du débit de la pompe, malgré son étalonnage préalable.

I.2.3 Préparation de la matière

La luzerne reçue, provenant d'un champ situé à proximité d'Angers, dans le Maine-et-Loire, a été pré-fanée sur le champ puis congelée avant son transport pour Toulouse. La plante se présentait sous forme de longs brins (**Figure III. 3.a**), pouvant atteindre 1 m de longueur, et était déjà fleurie.

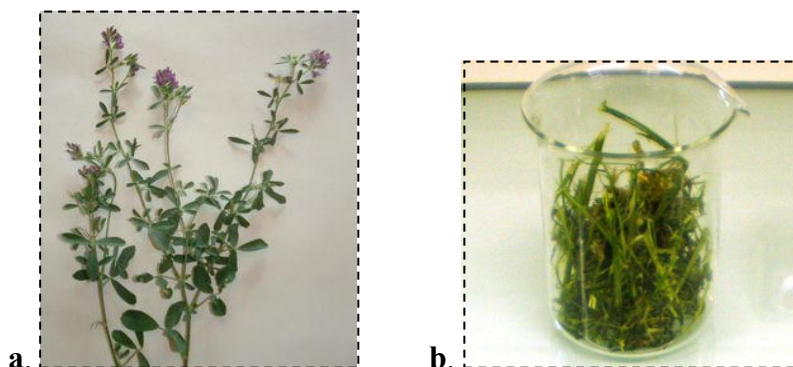


Figure III. 3 : Luzerne entière (a) et Luzerne après passage au broyeur à couteaux (b)

Il s'agissait d'une luzerne issue de la seconde coupe, ayant lieu classiquement vers le mois de juillet. Cette coupe est celle qui, théoriquement, donne le rendement le plus faible en protéines (**Tableau III. 2**). La luzerne a été broyée avant introduction dans l'extrudeur (**Figure III. 3.b**).

Tableau III. 2 : Composition de la luzerne traitée pour l'étude de l'influence des paramètres de l'extrusion sur la déshydratation et l'extraction des protéines

Teneur en matière sèche (%)	Teneur en protéines brutes (% de la MS)
37.9 (\pm 0.8)	15.3 (\pm 1.2)

1.3. Extrusion en conditions de pressage dominant

Huit essais ont été conduits avec le **profil 1** dans les conditions définies par le plan d'expériences. Différents bilans matière ont été réalisés : bilan matière global, bilan sur la matière sèche et bilan sur les protéines, afin de définir la précision des caractérisations. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III. 3** ci-après :

Tableau III. 3 : Bilans matière sur le premier plan d'expériences mené sur l'extrudeur (profil 1)

	N° Essai	1	2	3	4	5	6	7	8
	Ratio L/S réel calculé	2.0	2.1	4.7	4.5	4.4	7.7	7.8	5.4
	θ_c (°C)	31	44	50	38	25	31	44	38
Bilan matière totale	Q_{EL} (kg.h ⁻¹)	11.3	9.3	11.3	11.8	12.2	10.5	10.5	9.2
	Q_{EE} (kg.h ⁻¹)	1.8	1.8	13.0	13.0	13.0	24.3	24.3	13.0
	Total ENTREE (kg.h⁻¹)	13.1	11.1	24.3	24.8	25.2	34.8	34.9	22.2
	Q_{SF} (kg.h ⁻¹)	4.4	5.2	19.5	18.3	20.5	24.0	23.4	20.3
	Q_{SE} (kg.h ⁻¹)	5.2	4.3	4.8	5.6	5.1	3.9	2.9	3.7
	Total SORTIE (kg.h⁻¹) % d'écart à l'entrée	9.6 -26.4	9.5 -14.3	24.3 0.0	23.9 -3.7	25.6 +1.4	27.9 -20.1	26.3 -24.6	24.0 +8.3
Bilan sur la matière sèche	Q_{MSL} (kg.h⁻¹) : Entrée	4.28	3.54	4.29	4.48	4.63	3.99	3.96	3.47
	Q_{MSF} (kg.h ⁻¹)	1.08	1.20	1.34	1.49	1.51	1.22	1.01	1.17
	Q_{MSE} (kg.h ⁻¹)	2.66	2.25	2.57	2.88	2.60	2.05	1.40	1.91
	Total SORTIE (kg.h⁻¹) % d'écart à l'entrée	3.74 -12.6	3.45 -2.6	3.91 -8.9	4.37 -2.4	4.11 -11.2	3.27 -18.0	2.41 -39.2	3.08 -11.5
	Q_{PL} (kg.h⁻¹) : Entrée	0.65	0.54	0.65	0.68	0.71	0.61	0.60	0.53
Bilan sur les protéines	Q_{PF} (kg.h ⁻¹)	0.26	0.26	0.31	0.38	0.38	0.29	0.24	0.27
	Q_{PE} (kg.h ⁻¹)	0.38	0.30	0.34	0.35	0.32	0.23	0.16	0.22
	Total SORTIE (kg.h⁻¹) % d'écart à l'entrée	0.64 -2.5	0.56 +2.9	0.65 -0.6	0.73 +7.2	0.70 -1.9	0.52 +14.6	0.40 -34.6	0.49 -7.7

S_s : vitesse de rotation des vis ; θ_c : température de consigne du fourreau ; Q_{EL} : débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} : débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} : débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} : débit de sortie de l'extrudat ; Q_{MSL} : débit de MS de la luzerne ; Q_{MSF} : débit de MS dans le filtrat ; Q_{MSE} : débit de MS dans l'extrudat ; Q_{PL} : débit de protéines de la luzerne ; Q_{PF} : débit de protéines dans le filtrat ; Q_{PE} : débit de protéines dans l'extrudat.

Les résultats montrent une assez grande variabilité du bilan global.

Pour les essais 1, 6 et 7, un quart de la matière entrée dans l'extrudeur n'est pas retrouvé en sortie. Cette incertitude vient de l'introduction d'eau dans l'extrudeur. En effet, le débit de la pompe a fortement varié lors de la réalisation de ces essais. Néanmoins, les résultats obtenus sur la matière sèche et les protéines sont plus précis.

La composition des fractions récoltées, en matière sèche et en protéines, est décrite dans le **Tableau III. 4**. Ce tableau montre que le rendement d'extraction des protéines est élevé (40 % minimum), et supérieur au rendement d'extraction de la matière sèche. Néanmoins, il reste complexe à analyser.

Tableau III. 4 : Résultats et paramètres du premier plan d'expériences mené sur l'extrudeur bi-vis BC 45 (profil 1)

N° Essai	1	2	3	4	5	6	7	8
S_s (rpm)	110	110	110	110	110	110	110	110
Ratio L/S réel calculé	2.0	2.1	4.7	4.5	4.4	7.7	7.8	5.4
θ_c (°C)	31	44	50	38	25	31	44	38
Teneur en pied (% massique)	100	100	24.2	23.4	32.7	5.1	8.8	23.5
Teneur en MS filtrat (%)	24.6 ± 0.4	23.0 ± 0.2	6.9 ± 0.0	8.2 ± 0.1	7.4 ± 0.5	5.1 ± 0.2	4.3 ± 0.1	5.8 ± 0.1
Teneur en MS de l'extrudat (%)	51.1 ± 1.9	52.2 ± 2.0	53.7 ± 0.2	51.1 ± 0.2	51.5 ± 0.7	53.3 ± 0.8	48.8 ± 0.7	51.1 ± 1.3
RMS_F (%)	25.3	33.8	31.2	33.3	32.6	30.5	25.5	33.6
Teneur en protéines filtrat (%/MS)	23.6 ± 0.1	21.5 ± 0.1	23.5 ± 0.1	25.4 ± 0.3	24.9 ± 0.7	24.2 ± 0.7	23.3 ± 0.6	23.0± 0.0
Teneur en protéines du filtrat (g.L ⁻¹)	59.1	50.0	15.9	20.8	18.5	12.1	10.3	13.3
Teneur en protéines extrudat (%/MS)	14.3 ± 0.2	13.2 ± 0.3	13.1 ± 0.3	12.2 ± 0.2	12.2 ± 0.3	11.0 ± 0.8	11.4 ± 0.6	11.6 ± 0.5
RP_F (%)	39.3	47.4	48.5	55.6	53.0	48.5	39.0	51.1

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; la teneur en pied est le pourcentage massique de culot récolté après centrifugation du jus vert ; Q_{EL} est le débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} est le débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} est le débit de sortie de filtrat brut ; Q_{SE} est le débit de sortie de l'extrudat ; RMS_F et RP_F sont respectivement le rendement de récupération de la matière sèche et le rendement d'extraction des protéines dans le filtrat brut.

Pour les deux premiers essais, la teneur en pied est de 100 %. Cela signifie que le filtrat récolté était constitué non pas d'un liquide contenant des particules solides, mais d'une pâte, qui n'a pas été centrifugée.

Ainsi ces rendements, sur la matière sèche et les protéines, ont été utilisés pour l'élaboration des courbes d'iso-réponse.

L'analyse statistique du plan d'expériences est donnée en **Annexe**. La significativité des paramètres choisis est modérée par l'analyse statistique. Toutefois, le modèle représentant bien les valeurs obtenues expérimentalement, nous pouvons étudier les courbes d'iso-réponse afin de dégager des tendances, dans les limites des conditions expérimentales.

I.3.1 Déshydratation de la plante

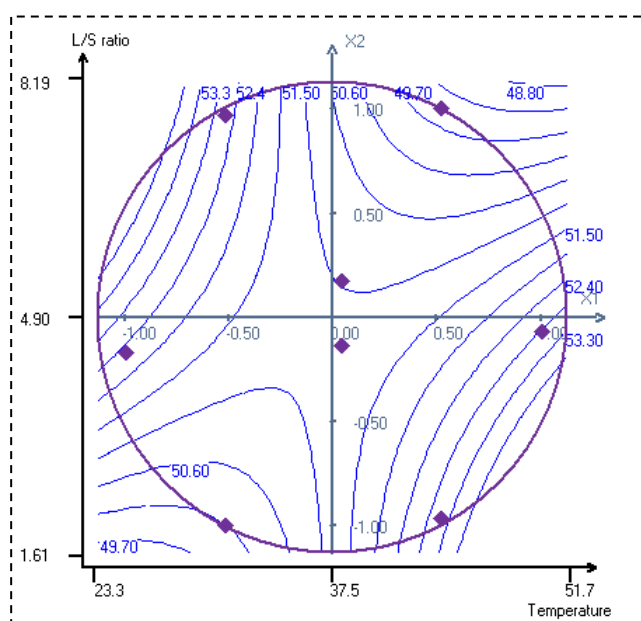


Figure III. 4 : Teneur en matière sèche de l'extrudat en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 1
(MS luzerne avant extrusion = 37.9 %)

La **Figure III. 4** montre la teneur en matière sèche du résidu fibreux obtenu en fonction des conditions de température et de ratio L/S, la teneur initiale en matière sèche de la luzerne étant de 37.9 %. L'extrusion permet donc une déshydratation partielle de la matière, pour tous les essais, même pour les quantités d'eau les plus importantes, puisque la teneur en MS de l'extrudat est toujours supérieure à celle de la luzerne de départ. Deux optimums peuvent être observés sur la **Figure III. 4**, avec un extrudat à 53 % de matière sèche. Ces deux optimums de déshydratation se situent à deux positions opposées sur les courbes d'iso-réponse : pour les températures les plus élevées, aux ratios L/S les plus faibles, ou au contraire aux températures les plus faibles, associées aux ratios L/S les plus importants.

Aux plus faibles ratios L/S, l'extrudeur exerce principalement une action mécanique, pressant les cellules et permettant la sortie de l'eau interstitielle. En outre, l'effet cisailant et destructurant des vis permet de rompre les cellules et de récupérer le contenu cellulaire. La déshydratation reste néanmoins limitée puisque la plante contient encore près de 47 % d'eau.

Ce résultat peut s'expliquer par la difficulté à former un bouchon dynamique suffisamment dense pour écraser les cellules, ou encore parce que les cellules ne sont pas suffisamment dégradées et le jus intracellulaire est ainsi peu extrait.

Le deuxième optimum est obtenu pour les ratios L/S les plus élevés, ce qui indique qu'un essorage dans les contre-filets peut être obtenu, même lorsque la plante est très humide.

Le profil d'évolution avec deux optimums opposés indique qu'il existe des phénomènes différents entrant en jeu pour la déshydratation de la luzerne. Les hypothèses suivantes peuvent être émises :

- Lorsque la teneur en eau est faible, l'action mécanique de l'extrudeur reste faible. La plante est peu déstructurée, et le pressage final au niveau des contre-filets permet principalement l'expression de l'eau interstitielle.
- Lorsque la teneur en eau augmente, l'action mécanique de l'extrudeur est plus intense. Dans ce cas, la déstructuration de la plante est élevée. Le contenu intracellulaire peut être libéré. Mais si la quantité d'eau est trop faible, ces molécules lubrifient les fibres de cellulose et limitent l'efficacité du pressage. Ainsi, l'eau libérée reste enchâssée dans la matrice végétale.
- Quand la quantité d'eau introduite est suffisante, les fibres peuvent être lavées, des molécules sont extraites, et le pressage redevient efficace.

D'après les résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que, en augmentant encore les quantités d'eau dans la machine, l'effet de lessivage des fibres pourrait être amélioré, garantissant une meilleure déshydratation de la luzerne. Cependant, nous pouvons supposer qu'un optimum du ratio L/S serait alors déterminé, même s'il n'apparaît pas dans les limites définies pour notre plan d'expériences.

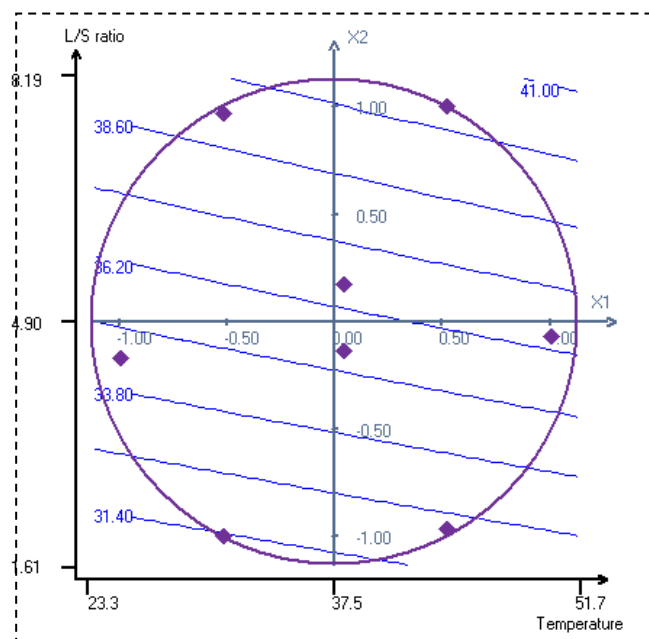


Figure III. 5 : Taux de récupération de matière sèche dans le filtrat en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 1

Les résultats de l'influence des conditions d'extraction sur le taux de récupération de matière sèche dans le filtrat (**Figure III. 5**) indiquent que l'ajout d'eau dans l'extrudeur n'augmente pas seulement la lixiviation de la luzerne, mais aussi la quantité de matière récupérée dans le jus exprimé.

En effet, le taux de récupération de matière sèche, qui se situe juste au dessus de 31 % lorsqu'on n'ajoute quasiment pas d'eau, s'élève à 41 % pour un rapport L/S de 8.2. La condition optimale (dans les limites fixées pour le plan d'expériences) pour l'extraction de matière sèche dans l'extrait vert est observée aux plus hautes températures, associées aux ratios L/S les plus importants. Ce résultat est conforme aux hypothèses précédentes. Lorsque le ratio L/S est élevé, l'énergie mécanique est mieux transmise à la plante. La luzerne, à l'intérieur de l'extrudeur, est plus déstructurée, permettant une meilleure extraction de matière sèche dans le filtrat. Aux plus faibles ratios L/S, quelle que soit la température appliquée, la transmission de l'énergie mécanique à la plante est moins efficace, et par conséquent le taux de récupération de la matière est moindre.

Lorsque la température augmente, la viscosité du milieu diminue, et ce d'autant plus quand l'extraction est efficace. Dans ces conditions, la compression de la plante est alors moins efficace car la matière est trop fluide. Ainsi, l'eau reste dans la plante et l'extrudat obtenu est plus humide. Aux plus faibles températures, l'action de cisaillement de la matière est atténuée, la plante étant ainsi moins déstructurée. Par conséquent, l'action mécanique

consiste principalement en un effet de compression de la matière, entraînant l'expression de l'eau interstitielle, diminuant la concentration des solutés dans le filtrat.

I.3.2 Extraction des protéines de luzerne

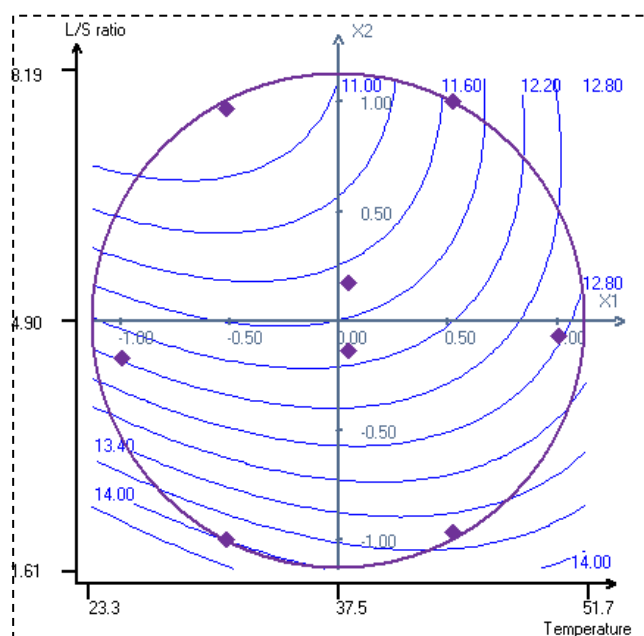


Figure III. 6 : Teneur en protéines de l'extrudat en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 1
(Teneur en protéines luzerne entière = 15.3 % de la MS)

L'efficacité de l'extraction des protéines peut être évaluée, soit par la caractérisation de la teneur en protéines du résidu, soit de la teneur de l'extrait. Sur la **Figure III. 6**, il apparaît que le résidu fibreux ayant la plus faible teneur en protéines est obtenu pour les ratios L/S les plus élevés, mais à température ambiante (ou faible chauffage) et non plus aux températures les plus élevées comme pour la matière sèche. Cette différence pourrait venir de la sensibilité des protéines à la déstructuration thermique. Lorsque la température d'extraction augmente, la coagulation des protéines augmente, et elles restent alors dans la matrice végétale.

Le rendement d'extraction des protéines dans l'extrait vert, c'est-à-dire le pourcentage des protéines introduites dans l'extrudeur récupérées dans le filtrat, est calculé et les résultats sont présentés sur la **Figure III. 7**.

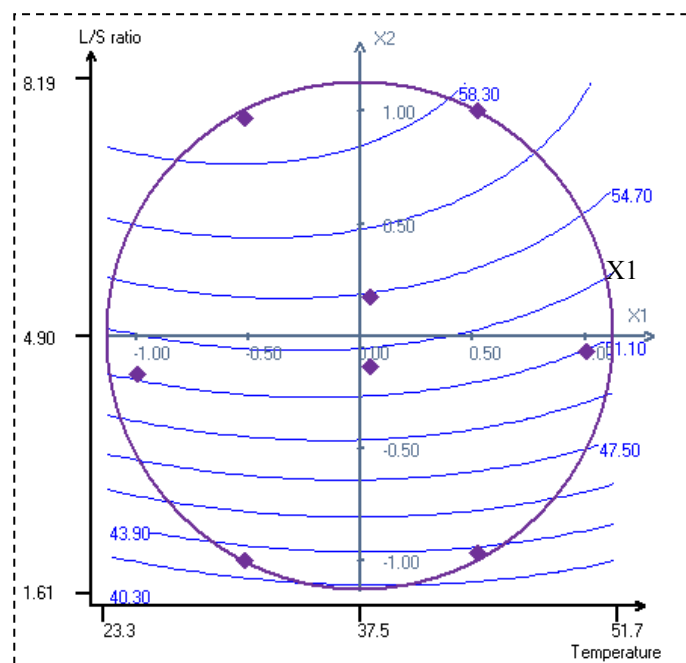


Figure III. 7 : Taux de récupération des protéines dans le filtrat en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 1

Le rendement d'extraction en protéines le plus élevé (58.3 % de la quantité totale de protéines introduites) est obtenu pour les ratios L/S les plus hauts. L'effet du lessivage des fibres est amélioré par l'addition de grandes quantités d'eau et résulte en l'extraction d'une plus grande quantité de protéines dans le filtrat. Pour les faibles rapports L/S, la luzerne est seulement pressée et donc l'eau récupérée est constituée principalement d'eau interstitielle libre, moins riche en protéines.

La température ne semble avoir que peu d'effet sur le rendement d'extraction des protéines, contrairement à ce qui a été observé concernant son influence sur la teneur en matière sèche du résidu.

Pour que le rendement de récupération des protéines dans l'extrait soit constant, alors que le rendement d'extraction varie, il faut supposer que la teneur en pied varie également. Lorsque la température d'extraction diminue, la teneur en pied diminue également, ce qui indique soit que la matière est moins déstructurée (donc moins de fragments de luzerne précipitent lors de la centrifugation), soit que le pressage est moins efficace, soit que ces débris restent plus dans la matière végétale.

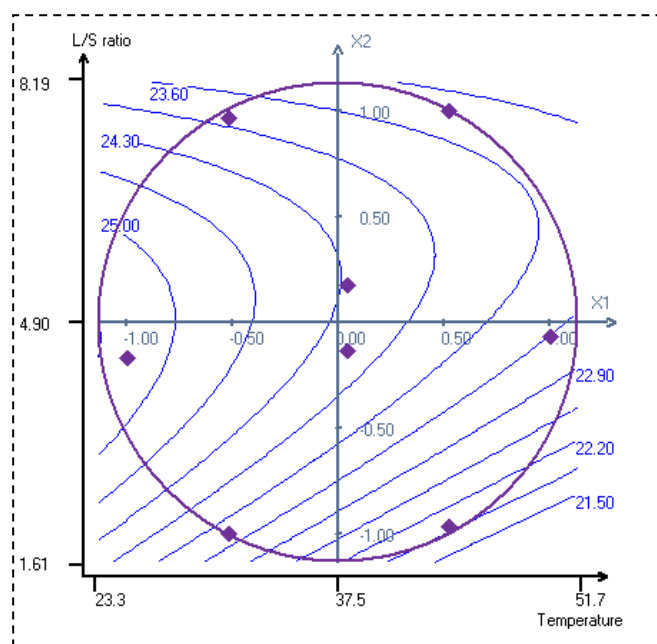


Figure III. 8 : Teneur en protéines du filtrat (% protéines/ MS) en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 1
(Teneur en protéines luzerne entière = 15.3 % de la MS)

En outre, il faut remarquer que l'analyse de la teneur en protéines de l'extrait vert (**Figure III. 8**) indique également que la plus haute pureté en protéines n'est pas obtenue lorsque le rendement d'extraction des protéines dans le filtrat est maximum. En effet, la teneur en protéines la plus élevée dans l'extrait vert est de 25 % de la MS, mais est obtenue pour les plus faibles températures et des ratios L/S moyens, alors que le meilleur rendement d'extraction des protéines dans le filtrat (58.3 %) est observé aux plus hauts ratios L/S (**Figure III. 7**). Cela montre que l'action mécanique n'est pas sélective, et conduit à l'extraction d'autres molécules ou structures telles que des fragments de cellules. Ce résultat confirme la présence de pied ou débris protéiques de parois ou membranes.

Avant d'être ultérieurement fractionné, le filtrat vert doit être clarifié, afin d'éliminer les particules solides en suspension qu'il contient, de manière à obtenir un jus brun clair. Pour cela, le filtrat est centrifugé à 4000 g pendant 20 min à 20 °C. La teneur en protéines du jus clarifié (appelé jus brun) a été étudiée, et le rendement d'extraction des protéines dans le jus clarifié a été calculé (**Tableau III. 5**).

Tableau III. 5 : Rendement d'extraction des protéines de la luzerne dans le jus clarifié (après centrifugation) pour le premier profil de vis

Numéro de l'essai	Température de consigne du fourreau (°C)	Ratio L/S réel	Rendement d'extraction des protéines dans le filtrat brut	Rendement d'extraction des protéines dans le jus clarifié	% de perte de protéines lors de la centrifugation
1	31	2.0	40.3	Pas de jus clarifié	--
2	44	2.1	46.4	Pas de jus clarifié	--
3	50	4.7	48.5	24.3	49.9 %
4	38	4.5	51.9	23.1	55.5 %
5	25	4.4	53.9	22.3	58.6 %
6	31	7.7	57.0	38.7	32.1 %
7	44	7.8	60.0	37.4	37.7 %
8	38	5.4	54.8	34.7	36.7 %

Pour les deux premiers essais, le filtrat obtenu était visqueux, plus pâteux que liquide et donc aucun jus clarifié n'a été séparé. Pour tous les autres essais, nous pouvons constater que la moitié au moins des protéines est récupérée après clarification. Cela signifie que la majeure partie des protéines extraites lors du procédé sont des protéines solubles, ou des protéines non liées aux fragments de plante, les protéines encore liées aux débris végétaux étant éliminés lors de la centrifugation. Le rendement maximum d'extraction des protéines obtenu pour les essais est de 38.7 % des protéines de luzerne introduites, pour un ratio L/S de 7.7, à 31 °C. Pour un ratio L/S identique, ces essais de centrifugation montrent des pertes qui augmentent quand la température d'extraction diminue. La perte lors de la centrifugation peut également dépendre de la quantité de pied présente dans l'extrait. En effet, ce pied génère un culot poreux emprisonnant du liquide contenant des protéines solubles.

1.4. Extrusion en conditions de cisaillement dominant

Les essais sont menés avec le profil 2. Comme pour le premier profil, les bilans matière sur chacun des essais (sur le liquide, le solide et les protéines) sont présentés dans le **Tableau III. 6**.

Tableau III. 6 : Bilans matière sur le second plan d'expériences mené sur l'extrudeur bi-vis BC 45 (profil 2)

	N° Essai	9	10	11	12	13	14	15	16
	S_s (rpm)	110	110	110	110	110	110	110	110
	Ratio L/S réel calculé	2.1	2.1	5.1	5.2	4.8	7.3	8.4	5.0
	θ_c (°C)	31	44	50	38	25	31	44	38
Bilan matière totale	Q_{EL} (kg.h ⁻¹)	9.85	9.25	9.82	9.70	10.71	11.21	9.46	10.27
	Q_{EE} (kg.h ⁻¹)	1.76	1.76	13.00	13.05	13.00	24.25	24.25	13.00
	Total ENTREE (kg.h⁻¹)	11.61	11.01	22.82	22.75	23.71	35.46	33.71	23.27
	Q_{SF} (kg.h ⁻¹)	0.99	1.69	15.29	14.34	12.94	25.69	28.80	17.26
	Q_{SE} (kg.h ⁻¹)	12.53	11.33	8.53	7.53	9.09	8.86	6.75	6.51
	Total SORTIE (kg.h⁻¹) % d'écart à l'entrée	13.52 +16.5	13.02 +18.2	23.82 +5.6	21.87 -3.9	22.03 -6.1	34.55 -2.8	35.55 +5.2	23.77 +1.9
Bilan sur la matière sèche	Q_{MSL} (kg.h⁻¹) : Entrée	3.74	3.51	3.82	3.68	4.16	4.25	3.59	3.90
	Q_{MSF} (kg.h ⁻¹)	0.16	0.25	1.21	0.97	0.88	1.49	1.42	1.10
	Q_{MSE} (kg.h ⁻¹)	4.20	3.89	3.09	2.51	3.29	3.32	2.55	2.17
	Total SORTIE (kg.h⁻¹) % d'écart à l'entrée	4.36 +16.5	4.14 +18.0	4.30 +12.7	3.48 -5.6	4.17 +0.3	4.81 +13.2	3.97 +10.8	3.27 -16.2
	Q_{PL} (kg.h⁻¹) : Entrée	0.57	0.53	0.58	0.56	0.63	0.65	0.55	0.59
Bilan sur les protéines	Q_{PF} (kg.h ⁻¹)	0.05	0.07	0.37	0.29	0.25	0.43	0.45	0.34
	Q_{PE} (kg.h ⁻¹)	0.71	0.66	0.44	0.38	0.43	0.42	0.31	0.35
	Total SORTIE (kg.h⁻¹) % d'écart à l'entrée	0.76 +33.1	0.73 +37.4	0.81 +38.8	0.67 +19.8	0.68 +8.3	0.85 +31.6	0.76 +38.7	0.69 +16.1

S_s : vitesse de rotation des vis ; θ_c : température de consigne du fourreau ; Q_{EL} : débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} : débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} : débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} : débit de sortie de l'extrudat ; Q_{MSL} : débit de MS de la luzerne ; Q_{MSF} : débit de MS dans le filtrat ; Q_{MSE} : débit de MS dans l'extrudat ; Q_{PL} : débit de protéines de la luzerne ; Q_{PF} : débit de protéines dans le filtrat ; Q_{PE} : débit de protéines dans l'extrudat.

Comme le problème de pompe a été résolu, les bilans globaux sont plus précis, mais les incertitudes restent assez élevées au niveau du bilan sur les protéines, ce qui limite la pertinence de certaines conclusions.

Tableau III. 7 : Résultats et paramètres du second plan d'expériences mené sur l'extrudeur bi-vis BC 45 (profil 2)

N° Essai	9	10	11	12	13	14	15	16
S_s (rpm)	110	110	110	110	110	110	110	110
Ratio L/S réel calculé	2.1	2.1	5.1	5.2	4.8	7.3	8.4	5.0
θ_c (°C)	31	44	50	38	25	31	44	38
Q_{EL} (kg.h ⁻¹)	9.9	9.3	9.8	9.7	10.7	11.2	9.5	10.3
Q_{EE} (kg.h ⁻¹)	1.8	1.8	13.0	13.1	13.0	24.3	24.3	13.0
Q_{SF} (kg.h ⁻¹)	1.0	1.7	15.3	14.3	12.9	25.7	28.8	17.3
Q_{SE} (kg.h ⁻¹)	12.5	11.3	8.5	7.5	9.1	8.9	6.8	6.5
Teneur en pied (% massique)	35.7	35.8	18.4	14.1	34.2	14.2	14.1	11.3
Teneur en MS filtrat (%)	15.7 ± 0.2	14.7 ± 0.0	7.7 ± 0.1	6.7 ± 0.0	6.7 ± 0.8	5.8 ± 0.0	4.9 ± 0.1	6.4 ± 0.0
Teneur en MS de l'extrudat (%)	33.5 ± 0.2	34.3 ± 0.2	35.4 ± 0.2	33.3 ± 0.7	35.3 ± 0.1	37.5 ± 0.8	37.8 ± 0.5	33.3 ± 0.8
RMS_F (%)	4.2	7.0	31.6	26.2	21.3	35.0	39.6	28.3
Teneur en protéines filtrat (%/MS)	30.3 ± 0.1	29.7 ± 0.1	30.8 ± 0.0	30.4 ± 0.3	28.7 ± 0.3	28.9 ± 0.6	31.4 ± 2.3	30.8 ± 0.2
Teneur en protéines du filtrat (g.L ⁻¹)	50.5	41.4	24.2	20.2	19.3	16.7	15.6	19.7
Teneur en protéines extrudat (%/MS)	16.9 ± 1.0	17.0 ± 0.7	14.1 ± 0.3	15.1 ± 0.5	13.2 ± 0.9	12.7 ± 0.1	12.3 ± 0.2	16.2 ± 1.1
RP_F (%)	8.4	13.5	63.9	53.7	40.0	65.7	81.3	56.6

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; Q_{EL} est le débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} est le débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} est le débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} est le débit de sortie de l'extrudat ; RMS_F , et RP_F sont respectivement le rendement de récupération de la matière sèche et le rendement d'extraction des protéines dans le filtrat brut.

L'analyse statistique du plan d'expériences est donnée en **Annexe**. Les écarts entre le modèle calculé et les valeurs expérimentales sont faibles, montrant que les hypothèses élaborées à partir des courbes d'iso-réponse semblent bien refléter la réalité.

Les essais montrent une très grande variation des rendements d'extraction, en matière sèche et en protéines. Néanmoins, ces valeurs sont parfois très élevées (essai 15 pour le rendement d'extraction des protéines) même si elles peuvent être liées à une forte incertitude.

Ces résultats ont toutefois été utilisés pour l'élaboration des courbes d'iso-réponse.

I.4.1 Evaluation de la déshydratation de la luzerne

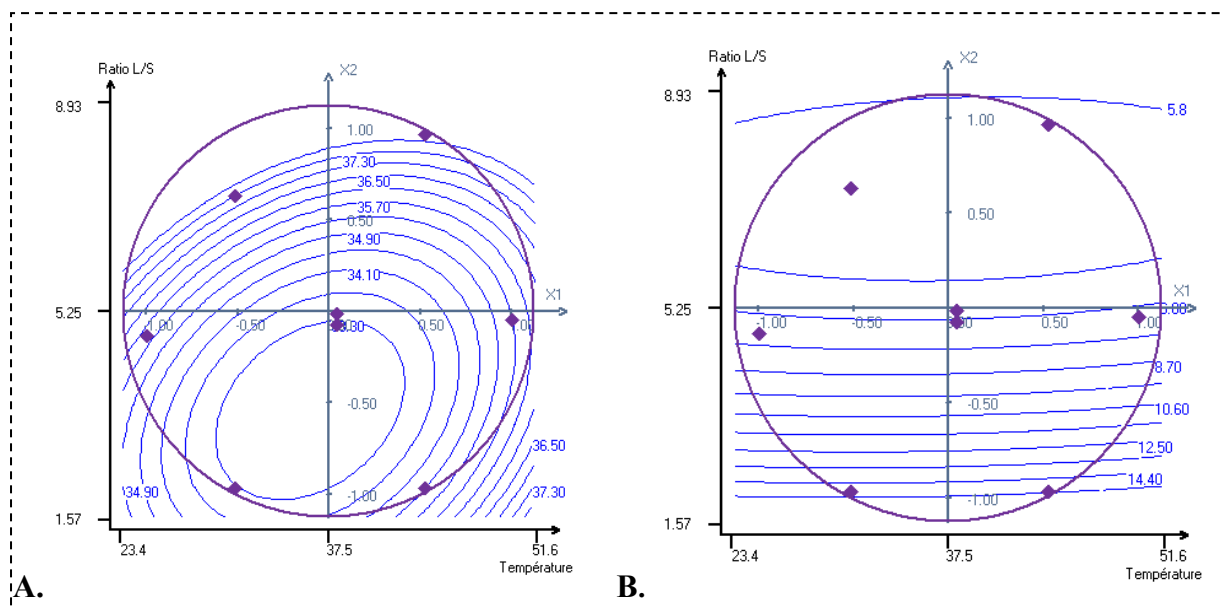


Figure III. 9 : Teneur en matière sèche des fractions, en fonction des paramètres d'extrusion, pour le profil 2

A. Teneur en matière sèche de l'extrudat (*MS luzerne avant extrusion = 37.9 %*)

B. Teneur en matière sèche du filtrat brut

Sur ce second profil de vis, il n'existe pas réellement de condition optimale pour la déshydratation de la luzerne, car nous constatons que la teneur en matière sèche du résidu reste faible, toujours en dessous de 40 % (**Figure III. 9.A**), pour une plante à 37.9 % de matière sèche avant traitement. Dans les limites de notre plan d'expériences, la teneur en matière sèche maximale est obtenue pour les plus forts ratios L/S. Pour les quantités d'eau introduites les plus faibles, la teneur en matière sèche du résidu fibreux est maximale pour les valeurs extrêmes de température définies dans le plan d'expériences : à la fois les plus fortes températures, et les plus faibles. En outre, à température constante, augmenter le ratio L/S de 1.6 à 5.0 n'a quasiment aucun effet sur la teneur en matière sèche de l'extrudat. Au-delà de 5.0, en revanche, l'augmentation du ratio L/S entraîne une amélioration de l'efficacité de la déshydratation, quelle que soit la température.

A partir de ces résultats, il est possible de conclure qu'à faible ratio L/S, deux mécanismes de nature différente interviennent dans l'expression de l'eau par extrusion. L'augmentation de la température, qui reste néanmoins trop faible pour être impliquée dans la destruction des cellules, induit principalement une diminution de la viscosité du mélange. Cette diminution favorise l'écoulement de l'eau dans la partie poreuse de la matière végétale.

En revanche, elle défavorise la transmission de l'énergie mécanique et donc l'efficacité de pressage. Lorsque le ratio L/S est suffisamment élevé, le lavage des fibres est plus important et permet un meilleur pressage.

Néanmoins, dès que la température augmente, il faut nettement accroître le ratio L/S pour compenser la perte d'efficacité. Il semble donc que l'action de l'extrusion pour ce profil de vis soit principalement axée sur le pressage, contrairement à ce qui avait été suggéré lors de l'élaboration du profil de vis (cisaillement), ce qui peut expliquer la faible déshydratation.

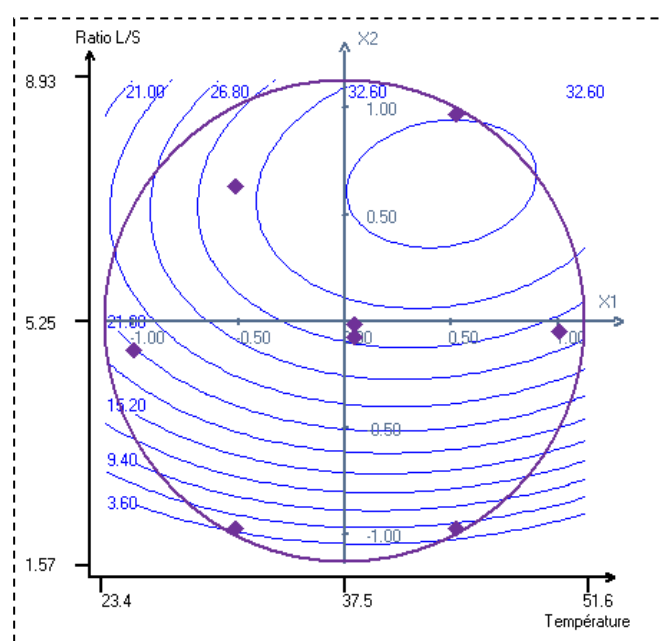


Figure III. 10 : Taux de récupération de la matière sèche dans le filtrat en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 2

Le taux de récupération de la matière sèche dans le filtrat (**Figure III. 10**), calculé à l'aide de la teneur en matière sèche du filtrat (**Figure III. 9.B**), présente un optimum clair autour de 40 °C et d'un ratio L/S solide de 7. Le taux de récupération de la matière sèche est faible et presque indépendant de la température aux faibles ratios L/S, mais l'influence de la température devient notable pour les ratios L/S supérieurs à 5. Au contraire, le ratio L/S a une influence significative sur le taux de récupération de matière sèche dans le filtrat aux plus faibles températures, alors qu'au dessus de 5, c'est la température qui semble avoir l'influence la plus significative.

Ces résultats confirment les hypothèses émises :

- A faible ratio L/S, l'action de l'extrudeur est principalement liée au pressage de l'eau interstitielle. Ainsi, même si l'efficacité de la déshydratation change avec la température, la quantité de matière sèche extraite reste la même.
- Augmenter le ratio L/S permet une meilleure transmission de l'énergie mécanique à la matière végétale et donc d'ouvrir les cellules et de récupérer le contenu intracellulaire.
- Lorsque le ratio L/S est suffisamment élevé, la température a une grande importance puisqu'elle conditionne l'efficacité de pressage, mais aussi la facilité d'écoulement du contenu cellulaire. Ce dernier paramètre semble avoir une grande importance sur la récupération de la matière sèche.

En effet, à fort ratio L/S, la déshydratation est aussi bonne à faible qu'à forte température. Néanmoins, c'est pour les températures élevées que la récupération de matière est la meilleure. Nous pouvons par conséquent supposer que les molécules extraites augmentent la viscosité du milieu, et limitent leur extraction.

L'addition d'eau permet d'augmenter le rendement d'extraction de la matière sèche, mais conduit à la dilution de l'extrait. Ainsi, le simple pressage conduit à l'obtention d'un extrait d'une teneur en matière sèche de près de 15 %. L'augmentation du ratio L/S diminue la concentration, car l'eau ajoutée dilue l'eau interstitielle. Dès que l'action mécanique devient suffisamment forte, cette diminution stagne à une valeur située autour de 6 %, jusqu'à ce que les plus grandes quantités d'eau ajoutée soient atteintes. Ainsi, l'eau ajoutée permet d'extraire une proportion constante de matière. Il est donc possible de supposer que l'efficacité d'extraction est limitée par la capacité de solubilisation des molécules extractibles.

Ces observations sur l'extrudat et le filtrat semblent montrer que les hauts ratios L/S améliorent l'expression du jus de luzerne (résidu fibreux moins humide en sortie d'extrudeur), et que la concentration en matière de l'eau exprimée est constante dans cet espace du domaine expérimental.

I.4.2 Efficacité de l'extraction des protéines

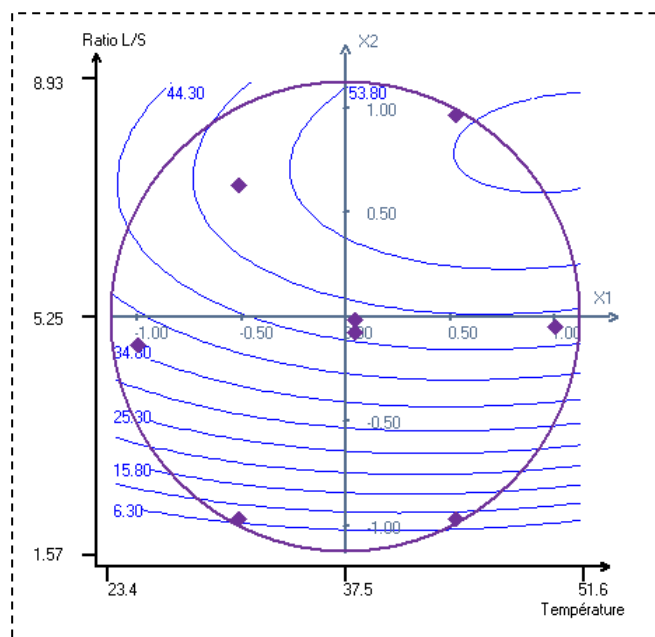


Figure III. 11 : Taux de récupération des protéines initiales dans le filtrat en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 2

Les meilleures conditions pour la déshydratation de luzerne, déterminées précédemment, ne sont pas concordantes avec les conditions opératoires menant au meilleur rendement d'extraction des protéines dans l'extrait vert. Le rendement maximum d'extraction des protéines observé dans les conditions opératoires (55 %) est obtenu pour les ratios L/S et les températures les plus élevés (**Figure III. 11**).

Aux plus faibles rapports L/S, il n'y a quasiment pas d'influence de la température sur l'efficacité de l'extraction protéique. En revanche, lorsque le ratio L/S est suffisamment élevé, la température devient un paramètre clé dans l'efficacité d'extraction. Il faut toutefois signaler que l'augmentation de la température au-delà de 40 °C, bien qu'améliorant le rendement d'extraction des protéines, pourrait induire la dénaturation de ces molécules et par conséquent modifier leurs propriétés fonctionnelles.

La quantification de la proportion de protéines dans le filtrat (par rapport à la matière sèche), montrée sur la **Figure III. 12**, met en évidence l'influence non négligeable de la température.

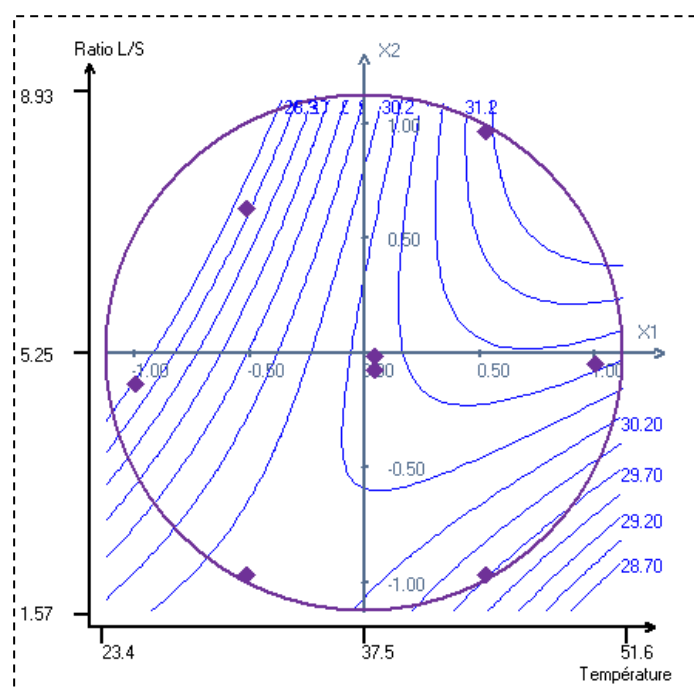


Figure III. 12 : Teneur en protéines du filtrat (% de protéines/MS) en fonction de la température d'extrusion et du ratio liquide/solide, pour le profil 2
(Teneur en protéines luzerne entière = 15.3 % de la MS)

La pureté en protéines s'accroît avec le ratio L/S, pour des températures au-delà de 37.5 °C, et augmente avec la température pour des ratios L/S supérieurs à 3.5. Ces observations, combinées avec les hypothèses élaborées concernant le rendement d'extraction des protéines dans l'extrait vert, mettent en évidence que la température agit plus sur la récupération de protéines que pour les autres molécules.

La **Figure III. 12** permet de souligner que la valeur la plus élevée du taux de protéines dans l'extrait vert s'élève à 31.4 % de la matière sèche, pour les plus hauts ratios et les plus fortes températures. Nous pouvons supposer que, en augmentant à la fois la quantité d'eau introduite et la température, une meilleure extraction des protéines pourrait être obtenue.

Dans le domaine de notre plan d'expériences, aucun optimum ne peut être défini.

Toutes ces remarques permettent d'élaborer les hypothèses suivantes :

- L'extraction des protéines est restreinte par leur limite de solubilité dans l'eau. Ces protéines peuvent former un gel qui reste enchâssé entre les fibres. L'augmentation du ratio L/S favorise alors la libération de protéines.
- L'augmentation de la température diminue la viscosité de ce gel, favorise la solubilisation des protéines et donc leur extraction.

- Le gel formé est défavorable au pressage dans le contre-filet et limite donc la déshydratation. L'augmentation conjointe du ratio L/S et de la température est alors favorable à la déshydratation.

La teneur en protéines dans le jus clarifié est ensuite investiguée afin de déterminer le rendement d'extraction des protéines dans le jus brun. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III. 8**.

Tableau III. 8 : Rendement d'extraction des protéines de la luzerne dans le jus clarifié (après centrifugation) pour le second profil de vis

Numéro de l'essai	Température de consigne du fourreau (°C)	Ratio L/S réel	Rendement d'extraction des protéines dans le filtrat brut	Rendement d'extraction des protéines dans le jus clarifié	% de protéines restant après la centrifugation
9	31	2.1	6.4	3.2	50.0 %
10	44	2.1	9.8	6.1	62.2 %
11	50	5.1	46.3	30.6	66.1 %
12	38	5.2	43.8	17.3	39.5 %
13	25	4.8	36.8	19.2	52.2 %
14	31	7.3	50.4	42.5	84.3 %
15	44	8.4	58.7	41.0	69.8 %
16	38	5.0	49.1	30.0	61.1 %

Les résultats montrent clairement que l'introduction de l'eau favorise la récupération des protéines, aussi bien dans l'extrait brut que dans l'extrait clarifié. Cette augmentation du rendement est principalement liée à la récupération de protéines solubles qui se retrouvent dans l'extrait clarifié. Ainsi, le rendement de récupération des protéines dans l'extrait clarifié augmente de 3.2 % pour un ratio L/S de 2.1 (à 31 °C) à 42.5 % pour un ratio L/S de 7.3 (à 31 °C). Dans les deux essais, la quantité de protéines insolubles reste constante : seule la quantité de protéines solubles augmente.

Ces résultats confirment les hypothèses émises, c'est-à-dire que l'extraction des protéines est limitée par leur solubilité et leur tendance à former un gel inhibant leur diffusion hors de la matrice végétale. Ainsi, l'augmentation de la température diminue la viscosité et favorise l'extraction des protéines solubles. Mais si la température augmente trop, l'efficacité de l'extraction est limitée par la coagulation des protéines.

1.5. Comparaison des deux profils de vis

L'influence du choix du profil de vis sur la qualité des extraits est clairement montrée par ces résultats. En effet, **avec le premier profil de vis, la teneur la plus élevée en protéines dans le jus est de 25 % (de la MS), alors que la valeur de 31.2 % (de la MS) est atteinte avec le second profil.** Le second profil de vis est constitué de plus d'éléments restrictifs, ayant une action de mélange et de cisaillement plus poussée sur la matière, détruisant la plante, permettant un meilleur lessivage des fibres et également une meilleure extraction des protéines de luzerne. Ces protéines peuvent être des constituants de la vacuole ou des parois des cellules végétales. En outre, il semblerait que l'efficacité de l'extraction des protéines augmente avec la température car le liquide exprimé est visqueux.

Cependant, lorsque nous considérons le contenu en matière sèche du résidu fibreux, nous remarquons qu'**avec le premier profil de vis, un maximum de 53.3 % de MS est obtenu. Avec le second profil, l'extrudat ne contient que 38.1 % de MS au maximum, montrant ainsi une déshydratation nettement moins efficace du second profil.** Avec ce profil, il semble que l'eau ait tendance à être absorbée par la plante, et reste piégée dans la matrice végétale, menant à un faible taux de déshydratation de la luzerne.

L'expression du jus des fibres, et par conséquent la déshydratation de la plante est meilleure lorsque que la luzerne est moins déstructurée, bien que le rendement d'extraction des protéines soit au contraire meilleur lorsque la matière est plus déstructurée et la déshydratation limitée.

L'énergie mécanique spécifique dépensée pour chacun des essais peut être analysée afin de comparer l'aspect énergétique des deux profils. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III. 9.**

Tableau III. 9 : Résultats énergétiques des deux plans d'expériences menés sur l'extrudeur bi-vis BC 45 (profils 1 et 2)

N° Essai	Ratio L/S réel calculé	θ_c (°C)	I (A)	EMS (W.h.kg ⁻¹)
1	2.0	31	46/49	337
2	2.1	44	49/53	438
3	4.7	50	39/45	298
4	4.5	38	37/42	268
5	4.4	25	38/42	264
6	7.7	31	40/45	325
7	7.8	44	45/48	358
8	5.4	38	38/40	343
9	2.1	31	20/25	184
10	2.1	44	26/20	157
11	5.1	50	20/23	172
12	5.2	38	23/24	195
13	4.8	25	23/24	172
14	7.3	31	24/26	179
15	8.4	44	24/26	213
16	5.0	38	24/25	172

θ_c est la température de consigne du fourreau ; I est l'intensité moyenne relevée sur l'armoire de pilotage ; EMS est l'énergie mécanique spécifique

Les valeurs énergétiques montrent une forte consommation quelles que soient les conditions, largement supérieure à celle obtenue industriellement. Ce résultat est normal car l'extrudeur fonctionne avec un faible débit d'alimentation. L'énergie consommée diminue avec la quantité d'eau introduite, puis elle augmente. Cette variation est à relier avec l'efficacité de pressage, qui s'améliore lorsque le lessivage est suffisant. Une différence notable est constatée entre les deux profils, le profil 2 étant le moins coûteux en énergie, ce qui s'explique par le fait qu'il est également celui qui déshydrate le moins bien la luzerne.

La technologie d'extrusion bi-vis peut être un nouveau moyen efficace d'extraire les protéines d'une matrice végétale, tout en effectuant un premier lavage des fibres cellulosiques, intéressant pour des traitements ultérieurs du résidu solide. Ici, sur l'exemple de la luzerne, plus de la moitié des protéines totales de la plante a pu être extraite dans le filtrat après extrusion.

La configuration de l'extrudeur bi-vis est un paramètre d'importance cruciale. Lorsque l'action mécanique exercée sur la plante est plus forte, le taux de récupération des protéines est meilleur, mais la rétention de liquide dans les fibres est plus importante. L'action des vis sur la matière doit être optimisée, de manière à pouvoir obtenir à la fois un bon rendement

d'extraction des protéines dans le filtrat, mais aussi un résidu après extrusion ayant la plus faible humidité possible. La température, pour les deux profils testés, n'a pas d'effet significatif sur la qualité des fractions. Le paramètre le plus influent est le ratio L/S. Cela signifie que, dans un souci d'économie d'énergie, l'extrusion pourrait être menée à température ambiante, sans toutefois que des différences trop importantes de rendement d'extraction des protéines soient observées, permettant l'élaboration d'un procédé de déshydratation plus durable.

II. INFLUENCE DE LA CONFIGURATION DE L'EXTRUDEUR BI-VIS SUR LA QUALITE DES FRACTIONS

L'extraction des protéines en extrudeur bi-vis a été étudiée sur un deuxième lot de luzerne (cf. **Chapitre II** pour sa composition détaillée), tenant compte des résultats précédents. De nouveaux profils de vis ont été évalués, à différents ratios L/S. Tous les essais décrits dans cette partie ont été effectués à une vitesse de rotation des vis de 110 tr.min^{-1} , à une température de consigne de 50°C , puisqu'il a été observé précédemment que, malgré une faible influence de la température, une température élevée favorisait l'extraction des. De plus hautes températures d'extraction n'ont pas été testées, afin d'éviter les phénomènes de coagulation des protéines, apparaissant autour de 65°C dans le cas de la RuBisCO (*Salvucci et al., 2001*).

Les filtrats obtenus sont centrifugés à 4000 g pendant 20 min à 20°C de manière à éliminer les particules en suspension et déterminer le pourcentage de pied de l'extrait.

II.1. Comparaison des deux lots de luzerne : influence de la qualité de la matière végétale

La teneur en matière sèche et en protéines des deux lots de luzerne utilisés pour les essais de traitement par extrusion bi-vis (essais décrits précédemment et ceux analysés dans cette partie) est détaillée dans le **Tableau III. 10**.

Tableau III. 10 : Composition de la luzerne traitée pour l'étude de l'influence des paramètres de l'extrusion sur la déshydratation et l'extraction des protéines

	Teneur en matière sèche (%)	Teneur en protéines brutes (% de la MS)
Luzerne utilisée pour essais 1 à 16	37.9 (± 0.8)	15.3 (± 1.2)
Luzerne utilisée pour essais 17 à 26	19.9 (± 0.5)	28.4 (± 1.5)

Le lot de luzerne utilisé pour les essais suivants avait une composition chimique différente. En effet, il s'agissait d'une luzerne plus jeune, plus riche en eau (80.1% d'humidité), mais deux fois plus riche en protéines. Décrire le procédé en termes de

rendements sur la matière sèche et les protéines permet de s'affranchir de la variabilité de la composition de la matière première.

II.2. Modification du profil de vis

Les informations obtenues lors de l'étude de l'influence de la température et du ratio L/S (**Paragraphe I.2.2**) nous ont conduits à définir un nouveau profil d'extrusion, avec pour objectif de tirer profit des avantages de chacun des deux profils de vis testés jusqu'à ce stade de l'étude. Le profil 3 (**Figure III. 13**) est donc une combinaison du profil 1, qui permettait une déshydratation plus efficace de la luzerne, et du profil 2, qui favorisait l'extraction des protéines.

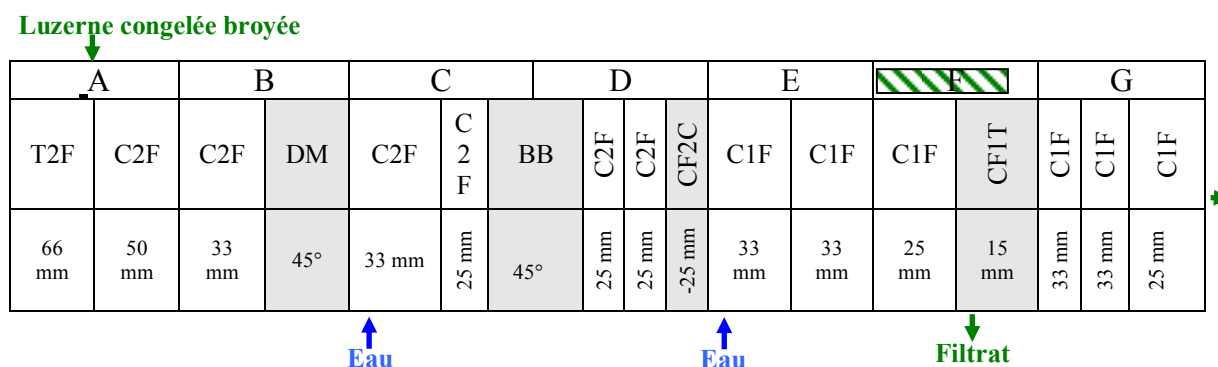


Figure III. 13 : Profil de vis n°3 mis en œuvre sur l'extrudeur bi-vis Clextral BC 45

Ce profil comporte des éléments déstructurant la matière en début de profil (disques malaxeurs monolobes), avant addition d'eau, puis une seconde zone d'éléments malaxeurs après l'addition de solvant, permettant une meilleure imprégnation de la matière végétale. Des éléments restrictifs sont placés juste avant le second point d'injection de liquide, de manière à empêcher un reflux de celui-ci. Les deux ajouts d'eau avaient pour objectif une première imprégnation de la matière et une solubilisation des protéines les plus accessibles, puis un second ajout d'eau permettant le lessivage des fibres.

Cependant, quel que soit le débit en eau introduit dans l'extrudeur, il a été impossible d'obtenir un filtrat et un résidu solide séparés en sortie de procédé. En effet, le liquide exprimé de la plante remontait vers la zone d'introduction, sans parvenir à passer la zone des éléments restrictifs, et cela même dans le cas où le débit d'introduction d'eau était nul. Une diminution de la vitesse de rotation des vis ne permettait pas d'obtenir un remplissage de la machine suffisant à la formation du bouchon dynamique et donc à la séparation des deux fractions. La luzerne introduite ayant une teneur en eau nettement plus élevée (80 %

d'humidité environ) que la luzerne du lot précédent (62 % d'humidité), il faudra prendre en compte que sa capacité d'absorption de l'eau ne sera pas la même.

Ainsi, en premier lieu, des essais d'extrusion de cette nouvelle matière avec un profil déjà employé ont été effectués, afin d'évaluer l'influence de la composition de la luzerne.

II.3. Influence du rapport liquide/solide sur la qualité des fractions

II.3.1 Répétition du Profil 2 : influence de la matière végétale

La première configuration de l'extrudeur bi-vis mise en œuvre est le profil 2 (**Figure III. 14**), déjà employé pour traiter le lot précédent de luzerne (cf. **Paragraphe I**). Le but de la réutilisation de ce profil était **d'étudier l'influence de la matière première elle-même sur la faisabilité des essais et sur la qualité des fractions obtenues, dans les mêmes conditions opératoires.**

Luzerne congelée broyée

A		B		C			D			E		F	G			
T2F	C2F	C2F	DM	C2F	BB	C2F	C1F	C1F	BB	C1F	C1F	C1F	CFIC	C1FT	C1FTC	C1F
66 mm	50 mm	33 mm	45°	25 mm	90°	33 mm	25 mm	25 mm	90°	33 mm	33 mm	33 mm	25 mm	15 mm	-15 mm	25 mm

↑ Eau

↓ Filtrat

Figure III. 14 : Profil de vis n°2 mis en œuvre sur l'extrudeur bi-vis BC 45

La luzerne reçue congelée est préalablement broyée dans un broyeur-composteur Viking puis est introduite dans l'extrudeur manuellement.

Tableau III. 11 : Bilans matière sur les essais menés avec le profil 2 sur l'extrudeur bi-vis BC 45

	N° Essai	17	18	19	20
	Ratio L/S	6.6	4.0	7.6	7.1
Bilan matière totale	Q_{EL} (kg.h ⁻¹)	27.7	11.8	11.8	14.5
	Q_{EE} (kg.h ⁻¹)	13.5	0.0	8.4	9.0
	Total ENTREE (kg.h⁻¹)	41.2	11.8	20.2	23.5
	Q_{SF} (kg.h ⁻¹)	29.4	5.4	14.7	16.9
	Q_{SE} (kg.h ⁻¹)	12.0	6.6	6.0	6.0
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)	41.4	12.0	20.7	22.9
	% d'écart à l'entrée	+0.5	+1.7	+2.5	-2.6
Bilan sur la matière sèche	Q_{MSL} (kg.h⁻¹) : Entrée	5.6	2.4	2.4	2.9
	Q_{MSF} (kg.h ⁻¹)	1.9	0.6	0.9	0.9
	Q_{MSE} (kg.h ⁻¹)	3.6	1.8	1.6	1.7
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)	5.5	2.4	2.5	2.6
	% d'écart à l'entrée	-1.8	0.0	+4.2	-10.4
Bilan sur les protéines	Q_{PL} (kg.h⁻¹) : Entrée	1.58	0.67	0.67	0.83
	Q_{PF} (kg.h ⁻¹)	0.56	0.18	0.24	0.23
	Q_{PE} (kg.h ⁻¹)	1.09	0.50	0.43	0.51
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)	1.65	0.68	0.67	0.74
	% d'écart à l'entrée	+4.4	+1.5	0.0	-10.8

Q_{EL} : débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} : débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} : débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} : débit de sortie de l'extrudat ; Q_{MSL} : débit de MS de la luzerne ; Q_{MSF} : débit de MS dans le filtrat ; Q_{MSE} : débit de MS dans l'extrudat ; Q_{PL} : débit de protéines de la luzerne ; Q_{PF} : débit de protéines dans le filtrat ; Q_{PE} : débit de protéines dans l'extrudat.

Les bilans matière réalisés sur ces essais sont beaucoup plus précis que ceux obtenus lors des essais précédents, indiquant une bonne maîtrise du procédé.

Le **Tableau III. 12** présente les résultats, pour les essais 17 à 20, sur la composition des différentes fractions.

Tableau III. 12 : Résultats et paramètres des essais d'extrusion menés sur le profil n°2 (MS luzerne entière = 19.9 %)

N° Essai	17	18	19	20
Ratio L/S	6.6	4.0	7.6	7.1
S_s (rpm)	110	110	110	110
θ_c (°C)	50	50	50	50
Teneur en pied (% massique)	14.1	20.9	12.3	5.3
Teneur en MS filtrat clarifié (%)	4.6 ± 0.2	7.9 ± 0.3	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.1
Teneur en MS de l'extrudat (%)	30.1 ± 1.1	27.0 ± 0.2	26.3 ± 1.2	27.6 ± 0.2
RMS _F (%)	33.3	23.4	36.2	29.0
RMS_C (%)	20.7	14.2	21.7	23.7
Teneur en protéines filtrat brut (g.L ⁻¹)	19.0	33.1	16.5	13.6
Teneur en protéines filtrat clarifié (%/MS)	35.3 ± 0.4	32.1 ± 1.8	34.0 ± 0.9	26.9 ± 1.1
Teneur en protéines filtrat clarifié (g.L ⁻¹)	16.1	25.2	13.6	11.6
Teneur en protéines extrudat (%/MS)	30.1 ± 0.2	28.2 ± 0.3	27.3 ± 0.4	30.8 ± 0.2
RP _F (%)	35.4	26.6	35.9	27.7
RP_C (%)	25.7	16.0	25.9	22.4
Teneur en MM filtrat clarifié (%/MS)	20.8 ± 0.2	28.6 ± 0.9	20.9 ± 0.2	23.2 ± 1.2
Teneur en MM extrudat (%/MS)	6.6 ± 1.2	6.0 ± 1.4	6.8 ± 0.9	5.9 ± 0.8
RMM _F (%)	79.2	53.3	79.6	60.2
RMM _C (%)	49.5	46.7	52.1	63.2
I (A)	22	10	10	12
EMS (W.h.kg ⁻¹)	60.8	68.0	67.9	63.5

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; Q_{EL} est le débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} est le débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} est le débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} est le débit de sortie de l'extrudat ; RMS_F, RP_F, RMM_F sont respectivement le rendement de récupération de la matière sèche, le rendement d'extraction des protéines et le rendement de récupération de la matière minérale dans le filtrat brut ; RMS_C, RP_C, RMM_C, sont respectivement le rendement de récupération de la matière sèche, le rendement d'extraction des protéines et le rendement de récupération de la matière minérale dans le filtrat clarifié ; I est l'intensité moyenne relevée sur l'armoire de pilotage ; EMS est l'énergie mécanique spécifique

L'augmentation du ratio L/S (essais 18 et 19, **Tableau III. 12**) permet d'améliorer le rendement de récupération de la matière sèche dans le filtrat. Conformément à ce qui a été déjà observé lors des essais précédents, l'introduction d'eau dans l'extrudeur permet une meilleure déstructuration de la matière dans le fourreau. Cependant, contrairement à nos précédentes conclusions, il ne semble pas ici que les fibres soient mieux essorées lorsqu'on introduit de l'eau (pas de différence de teneur en MS pour les extrudats, pour un même débit d'alimentation en matière, avec ou sans ajout d'eau (essais 18 et 19)). Nous pouvons penser que ceci est dû à la différence de qualité de la luzerne de départ. En effet, la plante utilisée pour ce groupe d'expérimentations est plus jeune, plus tendre (comprenant moins de fibres), et plus riche en eau. Dans ce cas, il est plus difficile de la presser, ce qui explique que l'EMS obtenue soit plus importante que pour la série d'essais 1 à 8.

L'augmentation du débit d'introduction en luzerne (entre les essais 17 et 19), à un ratio L/S proche de 7, ne permet pas d'améliorer le rendement de récupération de matière

sèche dans le filtrat (36.2 % pour un débit d'alimentation en luzerne de 11.8 kg.h⁻¹, contre 33.3 % de récupération pour un débit d'entrée en luzerne de 27.7 kg.h⁻¹). Il semble que la matière soit rendue visqueuse lors de l'addition d'eau, limitant l'efficacité du pressage.

Concernant les teneurs en protéines, l'augmentation du ratio L/S permet d'en récupérer plus dans le filtrat. Mais augmenter le débit d'alimentation en luzerne ne permet pas une meilleure extraction des protéines. On en perd environ 10 % lors de l'étape de centrifugation. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce sont les protéines non solubles et liées au débris de végétaux (protéines structurales) qui précipitent lors de la centrifugation.

A la fin de certains essais, la machine a été arrêtée brutalement, afin d'ouvrir le fourreau et de récolter la matière contenue dans chaque module. L'analyse de la répartition de la matière sèche et de l'humidité le long de l'axe de l'extrudeur est effectuée et représentée sur la **Figure III. 15**. Il faut souligner que lors de l'ouverture du fourreau, une quantité négligeable de liquide s'écoule, montrant que l'eau introduite dans la machine est absorbée ou au moins retenue instantanément par la plante.

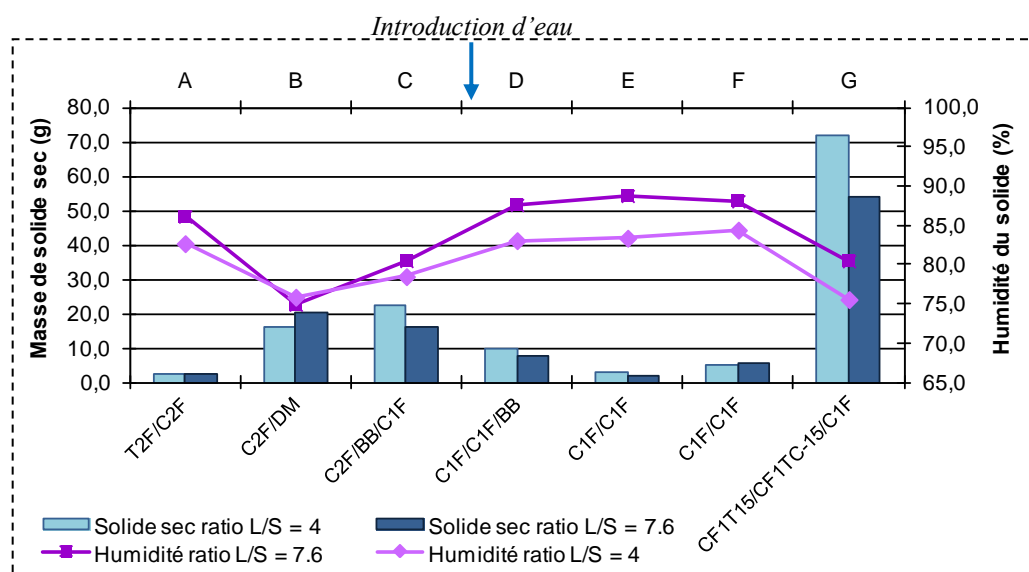


Figure III. 15 : Evolution de l'humidité du solide et de la masse de solide sec le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 2

(Masse de solide totale récoltée = 582.6 g (129.9 g de sec) pour le ratio L/S = 4 ;
Masse de solide totale récoltée = 585.3 g (108.1 g de sec) pour le ratio L/S = 7.6)

La matière en entrée d'extrudeur a une humidité supérieure à celle mesurée sur la plante congelée (autour de 85 % d'humidité sur les premières vis de l'extrudeur, contre 80.1 % d'humidité d'après la mesure gravimétrique des échantillons prélevés sur la luzerne entière). Il semble que la plante absorbe de l'eau lors de la phase de décongélation à + 4 °C

pendant une journée. Nous pouvons voir sur la **Figure III. 15** que la matière est pressée dans le dernier module, au niveau de l'élément de vis rainuré à pas direct. En début de profil, une diminution de l'humidité du solide est observée entre le premier et le second module. Cette baisse s'explique par la présence des disques malaxeurs, premiers éléments restrictifs du profil de vis, entraînant une accumulation de matière, ainsi que sa trituration : la plante subit un premier pressage. L'humidité remonte ensuite progressivement jusqu'à atteindre la valeur initiale, au niveau du module 4 contenant la deuxième série de disques malaxeurs bilobes. Il semblerait donc que les fibres de luzerne réabsorbent l'eau de la plante exprimée dans la première zone de contrainte, et absorbent également l'eau introduite dans le cas de l'essai 19 (ratio L/S = 7.6). Les mesures du taux de gonflement et d'absorption ont en effet montré que la luzerne, dans un milieu saturé en eau, est capable d'absorber 1.6 fois sa masse en eau, et gonfle d'un facteur de 1.95. Au niveau du module 4, la matière s'accumule et l'humidité de la matière atteint alors un palier jusqu'à la dernière zone, où le pressage est effectué contre le bouchon dynamique, permettant la séparation entre un filtrat et un extrudat.

Nous pouvons constater que la quantité de solide sec dans l'ensemble du fourreau est différente pour les deux essais : 129.9 g de solide sec sont récoltés dans l'essai sans ajout d'eau (essai 18), contre 108.1 g dans le cas de l'essai 19 (ratio L/S = 7.6). Ceci s'explique par le fait que l'eau introduite prend de la place dans le fourreau et limite l'accumulation de luzerne, diminuant ainsi la quantité de solide sec. En outre, lorsque nous nous intéressons au solide brut contenu dans la machine, en faisant la somme de toute la matière récoltée pour chacun des deux essais, on obtient 582.6 g de matière végétale pour un ratio L/S = 4, et 585.3 g de matière pour un ratio L/S = 7.6. Ainsi, ces deux valeurs sont quasiment similaires. Cela montre que le remplissage par la matière (luzerne + eau) du fourreau est sensiblement le même. Seule l'humidité de cette matière change lorsqu'elle absorbe l'eau. L'eau étant un fluide incompressible, elle favorise le pressage du résidu et donc la sortie d'eau contenue dans la matière végétale. Mais cet effet est contrebalancé par le fait que moins de luzerne peut s'accumuler dans le fourreau, et donc moins de jus provenant de la plante peut être exprimé.

En faisant le rapport de la masse totale de solide sec dans l'extrudeur sur la masse totale de solide brut, nous obtenons la valeur de la matière sèche moyenne de la matière à l'intérieur de la machine. Ainsi, la matière extrudée est à 22.3 % de MS pour l'essai 18 (ratio L/S = 4) et 18.5 % de MS pour l'essai 19 (ratio L/S = 7.6), ce qui est logique puisque l'eau

additionnée dans le cas de l'essai 19 fait baisser la teneur en matière sèche du solide. Lorsque nous effectuons la comparaison avec la teneur en matière sèche de l'extrudat (27.0 % pour ratio L/S = 4 et 26.3 % pour ratio L/S = 7.6), nous constatons que la diminution de teneur en matière sèche (et donc l'efficacité de l'élimination de l'eau) est plus importante pour le ratio L/S = 7.6, alors que pourtant la quantité de solide sec dans l'extrudeur est moindre. Ceci montre que le bouchon dynamique, plus humide, n'est pas pour autant moins efficace.

La densité apparente du solide dans la machine donne une image du remplissage en matière sèche du volume libre de chaque module de l'extrudeur. L'étude de la répartition de la densité apparente le long de l'axe (**Figure III. 16**) montre qu'en effet la matière est moins dense dans le dernier module pour l'essai effectué à ratio L/S élevé, et confirme ce qui a été observé sur la **Figure III. 15**.

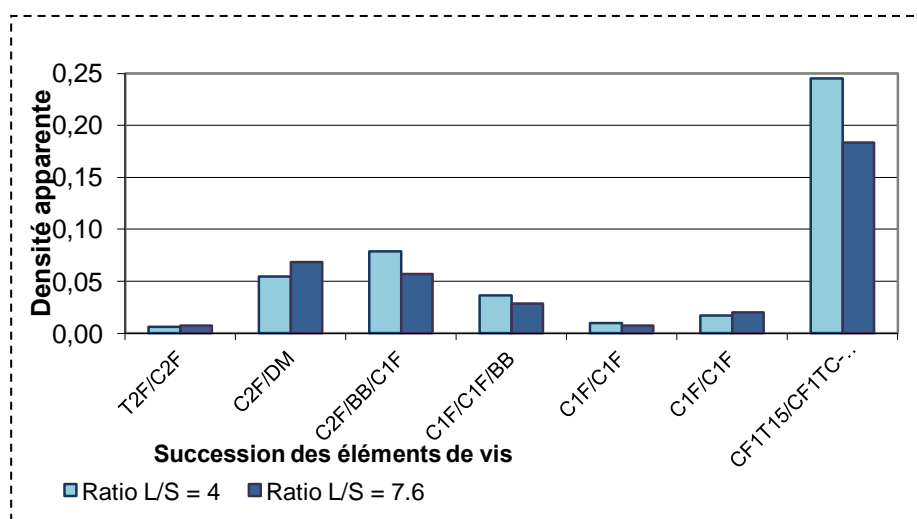


Figure III. 16 : Evolution de la densité apparente du solide le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 2

II.3.2 Contre-filets rapprochés du filtre : Profil 4

Les essais sur le profil 3 n'ayant pas été concluants, il a été décidé de tirer parti des observations réalisées sur les essais menés avec le profil 2, afin de mettre en place une configuration différente de profil de vis sur l'extrudeur bi-vis BC-46. Le profil 4 (**Figure III. 17**) est élaboré à partir du profil 2 décrit précédemment. La majeure partie du profil est identique, des modifications ayant été apportées à la configuration des deux derniers modules. En effet, l'élément de vis à pas inverse (C1FTC) et l'élément de vis ajouré (CF1T) sont rapprochés de la zone de filtre, la vis ajourée étant même placée au niveau du filtre. Ceci a

pour but de rapprocher la zone de pressage du filtre, de manière à limiter la réabsorption de liquide par la matière végétale après pressage dans le bouchon dynamique.

Luzerne congelée broyée

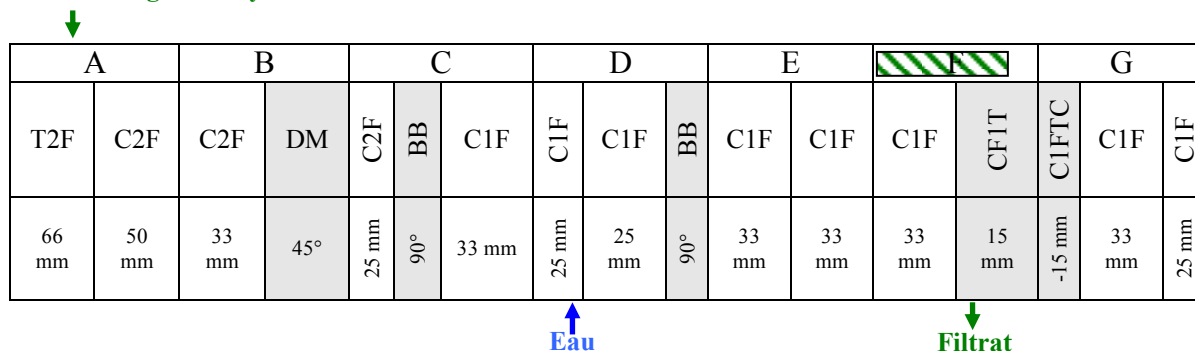


Figure III. 17 : Profil 4 utilisé sur l'extrudeur bi-vis BC 45

Tableau III. 13 : Bilans matière sur les essais menés avec le profil 4 sur l'extrudeur bi-vis BC 45

		N° Essai	21	22	23
		Ratio L/S	7.4	4.0	4.0
Bilan matière totale	Q_{EL} (kg.h ⁻¹)		12.3	15.3	32.9
	Q_{EE} (kg.h ⁻¹)		8.4	0.0	0.0
	Total ENTREE (kg.h⁻¹)		20.7	15.3	32.9
	Q_{SF} (kg.h ⁻¹)		16.5	9.9	20.7
	Q_{SE} (kg.h ⁻¹)		4.5	5.7	11.2
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)		21.0	15.7	31.9
	% d'écart à l'entrée		+1.4	+2.6	-3.0
Bilan sur la matière sèche	Q_{MSL} (kg.h⁻¹) : Entrée		2.5	3.1	6.6
	Q_{MSF} (kg.h ⁻¹)		0.9	0.9	2.2
	Q_{MSE} (kg.h ⁻¹)		1.4	2.0	4.1
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)		2.3	2.9	6.3
	% d'écart à l'entrée		-8.0	-6.5	-4.5
Bilan sur les protéines	Q_{PL} (kg.h⁻¹) : Entrée		0.70	0.87	1.88
	Q_{PF} (kg.h ⁻¹)		0.30	0.25	0.63
	Q_{PE} (kg.h ⁻¹)		0.41	0.58	1.18
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)		0.71	0.83	1.81
	% d'écart à l'entrée		+1.4	-4.6	-3.7

Q_{EL} : débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE} : débit d'introduction d'eau ; Q_{SF} : débit de sortie de filtrat ; Q_{SE} : débit de sortie de l'extrudat ; Q_{MSL} : débit de MS de la luzerne ; Q_{MSF} : débit de MS dans le filtrat ; Q_{MSE} : débit de MS dans l'extrudat ; Q_{PL} : débit de protéines de la luzerne ; Q_{PF} : débit de protéines dans le filtrat ; Q_{PE} : débit de protéines dans l'extrudat.

A nouveau, les bilans sont d'une bonne précision, les écarts entre l'entrée et la sortie étant inférieurs à 10 %, même concernant les protéines. Il est donc possible de calculer les rendements d'extraction des protéines. Les résultats sont présentés dans le **Tableau III. 14**.

Tableau III. 14 : Résultats et paramètres des essais d'extrusion menés sur le profil n°4
(MS luzerne de départ = 19.1 %)

N° Essai	21	22	23
Ratio L/S	7.4	4.0	4.0
S_s (rpm)	110	110	110
θ_c (°C)	50	50	50
Teneur en pied (% massique)	14.4	19.7	18.9
Teneur en MS filtrat clarifié (%)	3.5 ± 0.4	5.5 ± 0.2	7.8 ± 0.1
Teneur en MS de l'extrudat (%)	32.0 ± 1.2	34.2 ± 2.1	36.4 ± 0.8
RMS _F (%)	35.0	28.5	32.7
RMS_C (%)	20.6	15.8	20.6
Teneur en protéines filtrat brut (g.L ⁻¹)	18.2	24.9	30.6
Teneur en protéines filtrat clarifié (%/MS)	30.8 ± 0.2	27.4 ± 0.2	26.9 ± 0.1
Teneur en protéines filtrat clarifié (g.L ⁻¹)	10.7	15.2	21.1
Teneur en protéines extrudat (%/MS)	28.6 ± 0.2	29.7 ± 0.0	28.9 ± 0.4
RP _F (%)	42.6	28.4	33.6
RP_C (%)	22.3	15.2	19.5
Teneur en MM filtrat clarifié (%/MS)	25.5 ± 0.2	15.9 ± 0.0	14.2 ± 0.0
Teneur en MM extrudat (%/MS)	5.5 ± 0.5	6.7 ± 0.3	6.5 ± 0.2
RMM _F (%)	72.5	59.9	58.8
RMM _C (%)	60.4	28.8	33.7
I (A)	10	12	17
EMS (W.h.kg ⁻¹)	65.0	62.9	41.4

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; RMS_F, RP_F, RMM_F sont respectivement le rendement de récupération de la matière sèche, le rendement d'extraction des protéines et le rendement de récupération de la matière minérale dans le filtrat brut ; RMS_C, RP_C, RMM_C sont respectivement le rendement de récupération de la matière sèche, le rendement d'extraction des protéines et le rendement de récupération de la matière minérale dans le filtrat clarifié ; I est l'intensité moyenne relevée sur l'armoire de pilotage ; EMS est l'énergie mécanique spécifique

La différence entre les essais 22 et 23 repose sur l'augmentation du débit d'introduction en luzerne au maximum pouvant être atteint (bonne séparation L/S, à 110 tr.min⁻¹). L'influence du débit d'alimentation en plante et par conséquent l'influence du taux de remplissage de la machine sur l'extraction des protéines et l'expression de jus a pu être étudiée. Le débit a été doublé, à la même vitesse de rotation des vis et au même rapport eau/plante.

Aucune différence de séparation L/S n'est observée lorsqu'on double le débit d'alimentation en luzerne (63.6 % et 64.8 %). Par rapport au profil n°2 (ratios L/S similaires) (**Paragraphe II.3.1**), la séparation L/S est meilleure ici : 45 % pour le profil 2 lorsqu'il n'y a

pas d'ajout d'eau. Pour des ratios L/S autour de 7, à un débit d'alimentation comparable en luzerne, la séparation L/S est de 71 % pour le profil 2, et s'élève à 78 % pour le profil 4. Rapprocher la zone de formation du bouchon dynamique du filtre permet donc d'éliminer le liquide à travers le filtre, sans qu'il soit réabsorbé par les fibres de luzerne, selon l'objectif fixé au départ, ce qui améliore la séparation L/S.

Doubler le débit d'introduction de luzerne permet d'augmenter légèrement la récupération de matière sèche dans le filtrat (augmentation de 12.9 % entre l'essai 22 et l'essai 23). En ce qui concerne le taux de récupération de la matière sèche dans le jus clarifié, doubler le débit d'alimentation en luzerne permet une augmentation de 23.3 %, pour un même rapport eau/plante.

Le débit d'alimentation en matière n'a pas d'influence sur **la récupération de matière minérale dans le jus vert**. Mais lorsque le ratio L/S est augmenté, la quantité de matière minérale dissoute est plus grande. Ainsi, 80 % de la matière minérale est extraite dans le filtrat, et seulement 12 % de cette matière minérale se retrouve dans le résidu solide après centrifugation, si l'extraction est menée avec un rapport L/S élevé. En revanche, si l'extraction est conduite à faible ratio L/S, cette proportion augmente nettement. Il semble que la matière minérale lessivée lors de l'ajout d'eau soit solubilisée par cette eau introduite, ce qui expliquerait pourquoi la perte en matière minérale est moins conséquente lors de l'étape de centrifugation à ratio L/S autour de 7, plutôt qu'à ratio L/S égal à 4.

De même, le **rendement d'extraction des protéines** augmente avec l'ajout d'eau mais semble indépendant du débit de solide. Ainsi, de plus grandes quantités de luzerne peuvent être traitées dans l'extrudeur bi-vis sans que les rendements en protéines soient modifiés significativement. Le paramètre le plus important semble être l'ajout d'eau, lessivant les protéines. En revanche, à peu près la moitié de celles-ci sont éliminées lors de l'étape de clarification du jus par centrifugation. Il semble donc que ce profil de vis permette une meilleure extraction globale de protéines, mais que ces molécules soient plutôt des protéines insolubles, ou structurales, encore liées à des fractions précipitant lors de l'étape de centrifugation. Par rapport au profil 2, beaucoup plus de protéines sont perdues lors de la centrifugation. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que ces particules ne sont pas réabsorbées par la matrice végétale avant d'arriver sur le filtre.

Si l'objectif est la récupération de toutes les protéines, avant la centrifugation, il faudrait prévoir une étape de solubilisation des protéines encore fixées sur des résidus de parois végétales.

Les résultats de l'analyse de la répartition de la matière sèche et des l'humidité du solide le long de l'axe de l'extrudeur sont présentés sur la **Figure III. 18**.

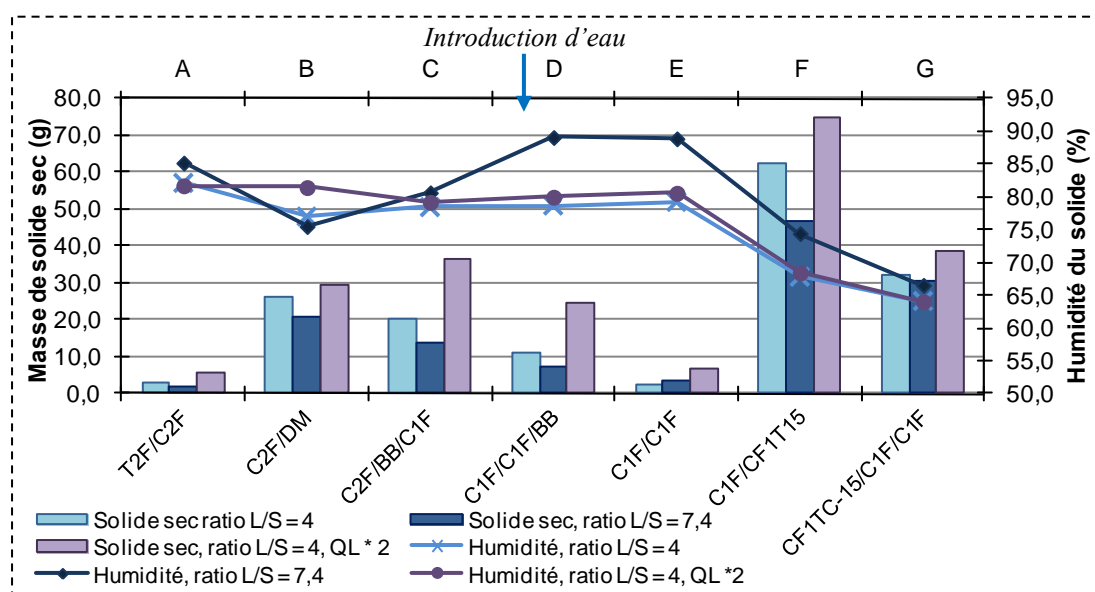


Figure III. 18 : Evolution de l'humidité du solide et de la masse de solide sec le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 4

(Masse de solide sec totale récoltée = 157.1 g pour le ratio L/S = 4 ; masse de solide sec totale récoltée = 124.8 g pour le ratio L/S = 7.4 ; Masse de solide sec totale récoltée = 216.1 g pour le ratio L/S = 4 avec débit d'alimentation en luzerne doublé)

L'évolution de l'humidité dépend des conditions de fonctionnement.

A rapport L/S de 7.4, le résultat est très similaire à celui obtenu avec le profil 2, c'est-à-dire diminution de l'humidité, puis augmentation pour atteindre un palier de 90 %, puis décroissance dans les contre-filets. Cette décroissance est néanmoins plus forte puisque la zone de compression est plus longue, alors qu'en revanche la zone de mélange est plus courte.

Lorsque l'extraction est menée sans eau extérieure introduite, la phase de mélange ne conduit pas à une réabsorption d'eau dans la plante. En entrée de contre-filet, la plante est moins humide, mais en sortie, l'humidité est pratiquement égale à celle de l'essai précédent.

Lorsque l'extraction est menée avec un rapport L/S de 7.4, avec un débit d'entrée de solide plus élevé (essai 21), l'humidité de la plante diminue plus progressivement que lors de l'essai précédent. Mais ensuite le comportement et l'humidité finale sont identiques.

Le phénomène d'absorption pourrait être d'autant plus fort que la déstructuration de la plante est élevée. A fort ratio L/S, la plante subit un cisaillement plus important, ce qui

conduit à une réabsorption conséquente d'eau. Mais cette eau peut facilement être récupérée si le pressage est efficace, c'est-à-dire lorsque le lessivage des fibres est suffisant.

La phase de mélange apparaît déterminante, car l'absorption de l'eau permet la solubilisation des protéines, qui peuvent alors sortir quand la plante est pressée. Néanmoins pour obtenir un pressage identique, il faudrait que la zone de pressage soit plus longue, ou la quantité d'eau plus importante. Il est possible que la teneur en protéines solubles soit plus élevée pour ce lot de luzerne, et nécessite donc plus d'eau pour que le lessivage soit efficace.

Pour ce profil, il est possible de constater que la matière est pressée au niveau de l'avant-dernier module, juste avant les éléments restrictifs présents dans le dernier module. Une diminution de l'humidité du solide est observée en début de profil, comme pour le profil 2. Toutefois, lorsque le débit d'introduction de luzerne est multiplié par deux, cette variation d'humidité disparaît (entre essais 22 et 23). Il semblerait donc que les cristaux de glace soient pris dans la masse lorsque la quantité de plante introduite est augmentée, sans se condenser au niveau de la zone d'introduction. Lorsque de l'eau est ajoutée dans l'extrudeur (ratio L/S = 7.4), la luzerne absorbe l'eau jusqu'au module 4 où la matière subit une détente avant d'être compressée dans le module 6, comme le montre la **Figure III. 19**.

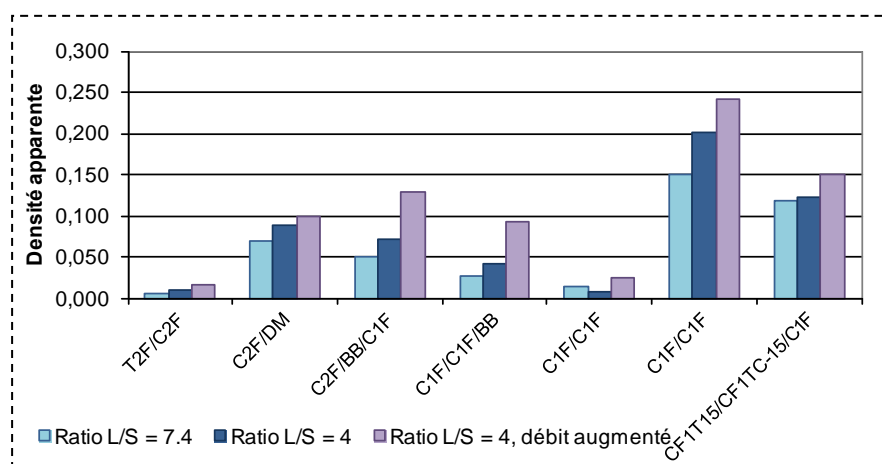


Figure III. 19 : Evolution de la densité apparente du solide le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 4

Afin d'améliorer la déshydratation, il a été envisagé de travailler avec deux zones de pressage. Ainsi, le profil 5 a été testé, comportant deux zones de filtration, avec par conséquent la formation de deux bouchons dynamiques permettant deux pressages successifs de la matière végétale.

II.3.3 Profil 5 : double zone de filtration

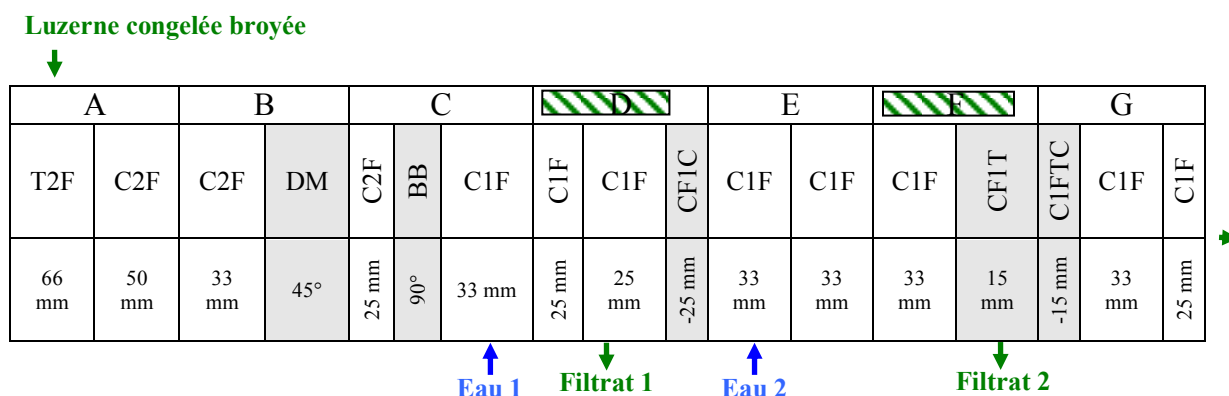


Figure III. 20 : Profil n°5 mis en œuvre lors des essais d'extrusion

Un deuxième module de filtration est installé sur l'extrudeur pour le profil 5 (**Figure III. 20**). Le début du profil n'est pas modifié par rapport aux précédents. Le premier point d'addition d'eau est situé après la première série d'éléments restrictifs, de manière à ce que la matière soit déjà déstructurée avant l'entrée d'eau, induisant par conséquent une meilleure imprégnation de la matière. En outre, la présence de ces disques malaxeurs représente une contrainte et permet d'éviter le reflux d'eau vers la zone d'alimentation. Un premier contre-filet est installé à la fin du module D, juste après le premier filtre, permettant la formation du premier bouchon dynamique, et ainsi le pressage et l'expression d'un jus s'écoulant à travers les pores du filtre.

Le premier filtre permet de récupérer du jus, par simple pressage lorsque l'eau n'est pas introduite dans le module D. Dans ce cas, après un premier pressage, de l'eau est ajoutée au niveau du module E. Une extraction des protéines à l'eau est ainsi permise et un deuxième pressage est effectué grâce au contre-filet C1FTC.

Dans le cas où de l'eau est ajoutée au premier point d'injection, deux extractions successives à l'eau sont effectuées, le but étant de savoir si un deuxième lessivage des fibres à l'eau permet ou non d'augmenter le rendement d'extraction des protéines dans le filtrat.

Deux essais (24 et 25) ont été réalisés en ajoutant l'eau uniquement au niveau de la deuxième entrée et un essai (26) a été mené avec deux additions d'eau.

Tableau III. 15 : Bilans matière sur les essais menés en double filtration (profil 5) sur l'extrudeur bi-vis BC 45

	N° Essai	24	25	26
	Ratio L/S	6.8	10.4	10.7
Bilan matière totale	Q_{EL} (kg.h ⁻¹)	15.1	14.2	14.3
	Q_{EE1} (kg.h ⁻¹)	0.0	0.0	1.7
	Q_{EE2} (kg.h ⁻¹)	8.6	18.3	17.5
	Total ENTREE (kg.h⁻¹)	23.7	32.5	33.5
	Q_{SF1} (kg.h ⁻¹)	6.7	5.8	7.6
	Q_{SF2} (kg.h ⁻¹)	12.3	22.4	21.6
	Q_{SE} (kg.h ⁻¹)	4.9	4.5	4.2
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)	23.9	32.7	33.4
<i>% d'écart à l'entrée</i>	+0.8	+0.6	-0.3	
Bilan sur la matière sèche	Q_{MSL} (kg.h⁻¹) : Entrée	3.0	2.9	2.9
	Q_{MSF1} (kg.h ⁻¹)	0.7	0.6	0.6
	Q_{MSF2} (kg.h ⁻¹)	0.7	0.8	0.7
	Q_{MSE} (kg.h ⁻¹)	1.6	1.5	1.5
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)	3.0	2.9	2.8
<i>% d'écart à l'entrée</i>	0.0	0.0	-3.4	
Bilan sur les protéines	Q_{PL} (kg.h⁻¹) : Entrée	0.86	0.81	0.82
	Q_{PF1} (kg.h ⁻¹)	0.22	0.17	0.18
	Q_{PF2} (kg.h ⁻¹)	0.22	0.24	0.21
	Q_{PE} (kg.h ⁻¹)	0.46	0.41	0.41
	Total SORTIE (kg.h⁻¹)	0.90	0.82	0.80
<i>% d'écart à l'entrée</i>	+4.7	+1.2	-2.4	

Q_{EL} : débit d'alimentation en luzerne ; Q_{EE1} : débit d'introduction d'eau au premier point d'injection ; Q_{EE2} : débit d'introduction d'eau au second point d'injection ; Q_{SF1} : débit de sortie du premier filtrat ; Q_{SF2} : débit de sortie du second filtrat ; Q_{SE} : débit de sortie de l'extrudat ; Q_{MSL} : débit de MS de la luzerne ; Q_{MSF1} : débit de MS dans le premier filtrat ; Q_{MSF2} : débit de MS dans le second filtrat ; Q_{MSE} : débit de MS dans l'extrudat ; Q_{PL} : débit de protéines de la luzerne ; Q_{PF1} : débit de protéines dans le premier filtrat ; Q_{PF2} : débit de protéines dans le second filtrat ; Q_{PE} : débit de protéines dans l'extrudat.

Les bilans pour ces essais sont à nouveaux précis, ce qui permettra une analyse plus fine de l'évolution des différents rendements.

Les rendements au second étage sont calculés par rapport à la matière première initiale, et non par rapport à ce qu'il reste à l'issue de la première filtration.

Entre l'essai 24 et l'essai 25 (Tableau III. 16), seul le ratio L/S a été augmenté, passant de 6.8 à 10.4. L'intérêt de ce profil étant la double filtration et l'ajout d'eau dans la machine après la première zone de filtration, il a été décidé de ne pas tester cette configuration sans ajout d'eau extérieure. Pour l'essai 26, le ratio de 10.7 est atteint en ajoutant avant la première zone de filtration un faible débit d'eau (1.7 kg.h⁻¹), puis un débit d'eau plus élevé (17.6 kg.h⁻¹) juste derrière la première zone de filtration, de manière à permettre un lessivage de fibres déjà pressées.

Tableau III. 16 : Résultats sur la matière sèche et paramètres des essais d'extrusion menés sur le profil n°5

N° Essai	24	25	26
Ratio L/S	6.8	10.4	10.7
S_s (rpm)	110	110	110
θ_c (°C)	50	50	50
Teneur en pied (% massique) filtrat 1	18.2	17.8	12.5
Teneur en pied (% massique) filtrat 2	11.8	10.4	10.8
Teneur en MS filtrat 1 clarifié (%)	10.6 ± 0.0	10.0 ± 0.2	8.1 ± 0.2
Teneur en MS filtrat 2 clarifié (%)	5.7 ± 0.0	3.5 ± 0.2	3.0 ± 0.2
Teneur en MS de l'extrudat (%)	32.8 ± 0.2	34.2 ± 0.1	36.4 ± 0.7
RMS _{F1} (%)	23.3	20.2	21.5
RMS _{F2} (%)	22.9	27.6	22.8
RMS_{C1} (%)	14.5	12.8	14.8
RMS_{C2} (%)	13.0	17.9	12.4
Total RMS_C (%)	27.5	30.6	27.1
I (A)	13	12	13
EMS (W.h.kg ⁻¹)	68.8	67.8	73.0

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; RMS_F est le rendement de récupération de la matière sèche dans les filtrats bruts ; RMS_C est le rendement de récupération de la matière sèche dans les filtrats clarifiés ; I est l'intensité moyenne relevée sur l'armoire de pilotage ; EMS est l'énergie mécanique spécifique

Pour ce profil, le pourcentage de séparation liquide/solide à un ratio L/S de 7 environ est le même que pour les deux profils précédents (environ 71 %).

II.3.3.1 Déshydratation de la luzerne

Le rendement de récupération de matière sèche dans le filtrat est compris entre 27 et 30 %, avec une valeur pratiquement égale pour les deux étages, ce qui est supérieur aux résultats observés avec le profil 2. La teneur en MS de l'extrudat est comprise entre 32 et 36 %.

En augmentant la teneur en eau dans l'extrudeur, le rendement de récupération de matière sèche dans le filtrat n'est pas augmenté pour ce profil (**Tableau III. 17**). Il convient de penser que la viscosité de la matière diminue au delà d'une certaine teneur en eau et que finalement le pressage de la matière est moins efficace. Mais l'intérêt de l'augmentation du ratio L/S était de savoir s'il est possible de mieux exprimer la matière au niveau de la seconde zone de filtration. Cependant, la double filtration ne semble pas avoir d'effet sur la récupération de matière sèche. L'augmentation du ratio L/S permet d'améliorer légèrement la déshydratation du résidu solide et la quantité de matière sèche récupérée. Ce gain est réalisé au niveau du second étage, car le rendement est plus faible au premier étage.

Si de l'eau est introduite au niveau du premier étage, le rendement de récupération de matière est augmenté (essais 25 et 26). Mais dans le cas de ces essais, le rendement du second étage est diminué. Cette baisse peut être attribuée à la réduction du débit d'eau pour l'essai 26 afin de maintenir le ratio L/S constant.

Les résultats obtenus dans les essais précédents indiquent que ce débit d'eau, dans la deuxième zone d'introduction, est trop faible pour assurer un bon lessivage des fibres.

Ce profil permet d'obtenir un rendement de récupération élevé. Cependant, une grande partie de cette matière est perdue lors de la centrifugation. Il semble donc que la déstructuration de la plante soit très importante et conduise à la production de beaucoup de débris.

II.3.3.2 Extraction de la matière minérale

Tableau III. 17 : Résultats sur l'extraction de la matière minérale pour les essais d'extrusion menés sur le profil n°5

N° Essai	24	25	26
Ratio L/S	6.8	10.4	10.7
S_s (rpm)	110	110	110
θ_c (°C)	50	50	50
Teneur en pied (% massique) filtrat 1	18.2	17.8	12.5
Teneur en pied (% massique) filtrat 2	11.8	10.4	10.8
Teneur en MM filtrat 1 clarifié (%/MS)	21.5 ± 0.2	20.1 ± 0.0	26.3 ± 0.2
Teneur en MM filtrat 2 clarifié (%/MS)	13.1 ± 0.1	16.4 ± 0.4	18.6 ± 0.2
Teneur en MM extrudat (%/MS)	5.3 ± 0.2	4.8 ± 0.3	4.5 ± 0.1
RMM _{F1} (%)	42.6	42.6	52.3
RMM _{F2} (%)	26.8	45.2	40.1
RMM _{C1} (%)	35.8	29.5	44.6
RMM _{C2} (%)	19.6	33.7	26.4

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; RMM_F est le rendement de récupération de la matière minérale dans les filtrats bruts ; RMM_C est le rendement de récupération de la matière minérale dans les filtrats clarifiés.

La somme de la matière minérale récupérée dans chacun des deux filtrats représente presque la totalité de la matière minérale initiale (**Tableau III. 17**). La répartition des rendements de récupération de matière minérale est d'environ moitié-moitié entre les deux filtrats. Il semble manquer d'eau pour solubiliser les sels au niveau du second étage, ce qui expliquerait le rendement de 26 % obtenu pour l'essai 24.

Lorsque l'eau est ajoutée avec un débit plus élevé (essai 25), le rendement d'extraction de la matière minérale monte à 45 %. Ce résultat indique que la matière minérale n'a pas été extraite car la quantité d'eau introduite était insuffisante pour la dissoudre.

Lorsque l'introduction d'eau est menée en deux temps, il apparaît que les sels extraits ne sont pas les mêmes. La première extraction permet la récupération dans le filtrat de sels solubles, qui sont pratiquement complètement éliminés après centrifugation. Ceux obtenus après la seconde extraction semblent plus liés à la matière végétale, et sont perdus pour 50 % dans le culot. L'action mécanique est donc différente entre les essais 25 et 26. Néanmoins, cette différence n'apparaît pas au niveau des protéines.

II.3.3.3 Rendement d'extraction des protéines

Tableau III. 18 : Résultats d'extraction des protéines sur les essais d'extrusion menés sur le profil n°5

N° Essai	24	25	26
Ratio L/S	6.8	10.4	10.7
S_s (rpm)	110	110	110
θ_c (°C)	50	50	50
Teneur en pied (% massique) filtrat 1	18.2	17.8	12.5
Teneur en pied (% massique) filtrat 2	11.8	10.4	10.8
Teneur en protéines filtrat brut 1 (g.L ⁻¹)	32.8	30.1	23.6
<i>Teneur en protéines filtrat clarifié 1 (%/MS)</i>	<i>28.6 ± 0.5</i>	<i>29.0 ± 2.0</i>	<i>25.2 ± 0.1</i>
Teneur en protéines filtrat clarifié 1 (g.L ⁻¹)	22.9	22.3	16.0
Teneur en protéines filtrat brut 2 (g.L ⁻¹)	17.7	10.6	9.7
<i>Teneur en protéines filtrat clarifié 2 (%/MS)</i>	<i>28.4 ± 3.2</i>	<i>25.2 ± 0.9</i>	<i>32.7 ± 2.3</i>
Teneur en protéines filtrat clarifié 2 (g.L ⁻¹)	10.3	6.4	6.0
Teneur en protéines extrudat (%/MS)	28.9 ± 3.5	26.5 ± 2.2	26.6 ± 3.3
RP _{F1} (%)	25.5	21.5	21.9
RP _{F2} (%)	25.2	29.3	25.7
RP_{C1} (%)	14.6	13.1	13.1
RP_{C2} (%)	13.0	15.8	14.3
Total RP_C (%)	27.6	28.9	27.3

S_s est la vitesse de rotation des vis ; θ_c est la température de consigne du fourreau ; RP_F est le rendement d'extraction des protéines dans les filtrats bruts ; RP_C est le rendement d'extraction des protéines dans les filtrats clarifiés.

La double filtration permet l'extraction de la moitié des protéines totales de la plante (**Tableau III. 18**).

A faible ratio L/S et avec une seule entrée d'eau (essai 24), le rendement de récupération des protéines dans le filtrat (filtrat 1 + filtrat 2) est de 50 % des protéines totales. Chaque étage permet la récupération de la même quantité de protéines. Ainsi, le second étage

présente-t-il un rendement d'extraction légèrement supérieur s'il est calculé par rapport aux protéines résiduelles.

Ce rendement d'extraction est réduit de moitié après centrifugation, car une grande partie des protéines se retrouve dans le culot, en proportion égale pour les deux extractions.

Lorsque le ratio L/S est augmenté (essai 25), toujours avec une seule entrée d'eau, l'efficacité d'extraction est plus faible au premier étage, et plus élevée au second étage. Cette diminution peut être liée à une baisse de l'efficacité du premier bouchon dynamique. En revanche, le traitement mécanique semble plus intense, et conduit à l'extraction d'une plus grande quantité de protéines, qui restent dans le culot lors de la centrifugation.

Si le ratio L/S reste élevé, identique à celui utilisé pour l'essai 25, mais que l'introduction d'eau est réalisée en deux temps (essai 26), pratiquement aucune différence n'est observée, le rendement d'extraction des protéines au deuxième étage étant néanmoins légèrement plus faible. Il apparaît donc que la quantité d'eau présente dans la plante est suffisante pour qu'une extraction des protéines ait lieu au niveau du premier étage. En revanche, au second étage, la quantité d'eau ajoutée doit être au minimum égale à celle ajoutée lors de l'essai 25. Comme la matière est déstructurée, il faut beaucoup d'eau pour laver les fibres avant le pressage.

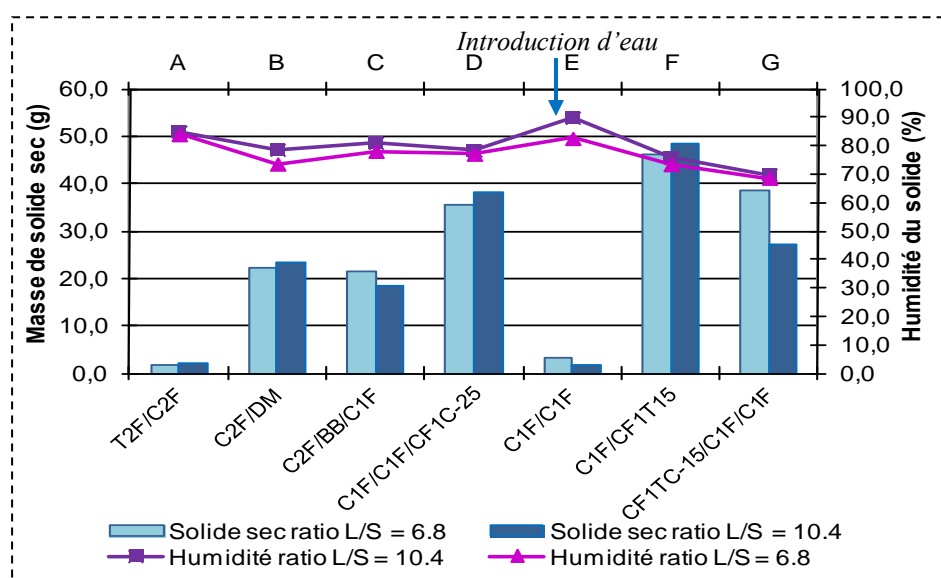


Figure III. 21: Evolution de l'humidité du solide et de la masse de solide sec le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 5, en simple addition d'eau

(Masse de solide totale récoltée = 665.5 g (masse de sec : 169.2 g) pour le ratio L/S = 6.8 ; masse de solide totale récoltée = 705.0 g (159.4 g de sec) pour le ratio L/S = 10.4)

Après la première filtration, au niveau du module D, la matière subit une détente dans le module E puis est à nouveau comprimée dans le module F (Figure III. 21). La perte de

liquide dans le premier filtre est contrebalancée par l'ajout d'eau juste après le module de filtration, ce qui explique l'allure de l'évolution de l'humidité du solide sur la **Figure III. 21**, avec une humidité qui continue à s'accroître jusqu'au deuxième module de filtration situé en sixième position. Ainsi, avec ce profil de vis, la zone d'absorption est beaucoup plus grande, ce qui favorise la solubilisation des protéines.

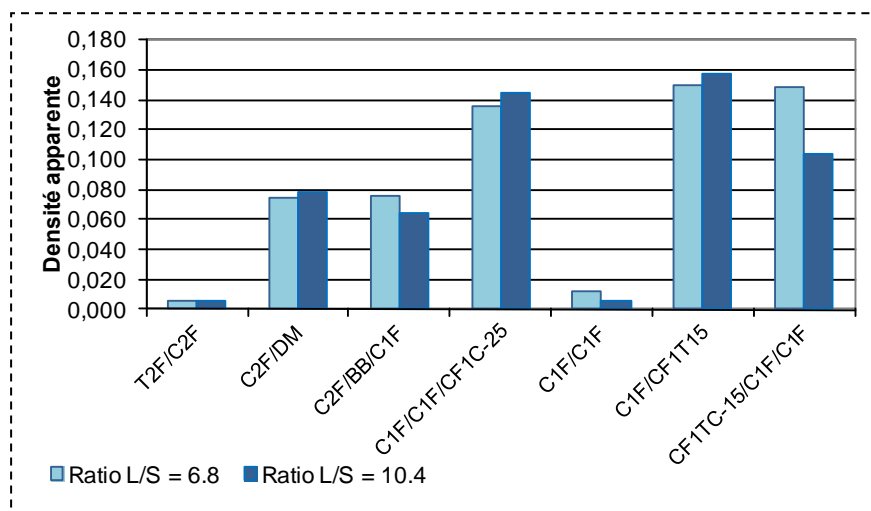


Figure III. 22 : Evolution de l'humidité de la densité apparente du solide sec le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 5, avec simple addition d'eau

Un essai (essai 26) a été mené avec une double addition d'eau, la première étant effectuée au niveau du module C, et la seconde entrée d'eau étant située au même endroit que pour les autres essais sur ce profil. Le solide des sections D et E a été prélevé dans un seul échantillon.

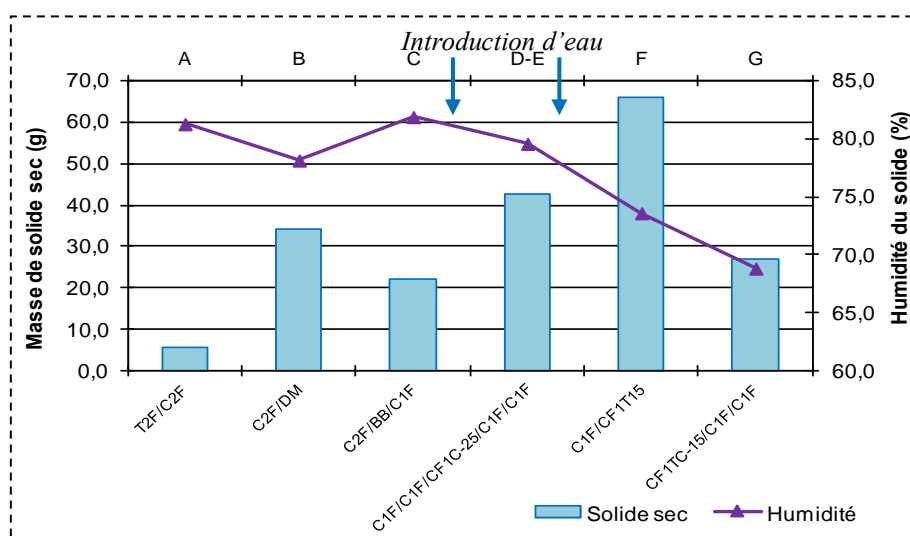


Figure III. 23 : Evolution de l'humidité du solide et de la masse de solide sec le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 5 avec double addition d'eau (ratio L/S = 10.7)
(Masse de solide sec totale = 852.9 (197.4 g de sec))

Nous pouvons constater sur la **Figure III. 23** que l'évolution de la masse de solide sec dans l'extrudeur le long de l'axe suit la même tendance qu'en simple addition d'eau. Il en va de même pour l'humidité du solide. Ainsi, ajouter une entrée d'eau, avant la première filtration, n'a pas d'influence significative sur le fonctionnement de la machine et son remplissage, pas plus que sur la qualité des fractions obtenues après extrusion.

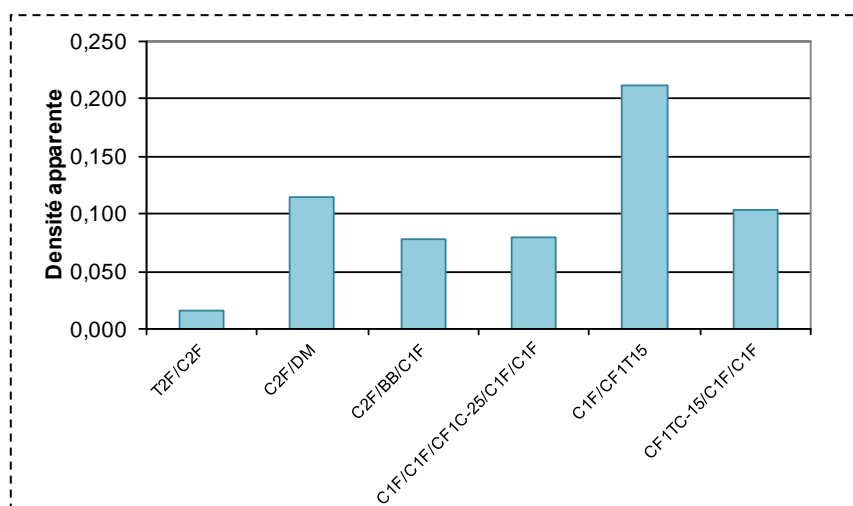


Figure III. 24 : Evolution de l'humidité du solide et de la masse de solide sec le long de l'axe de l'extrudeur pour le profil 5, ratio L/S = 10.3

(Masse de solide sec totale récoltée = 169.2 g pour le ratio L/S = 6.8 ; masse de solide sec totale récoltée = 159.4 g pour le ratio L/S = 10.4)

II.4. Influence de la configuration de profil de vis

L'ensemble des résultats obtenus pour une même campagne d'extrusion (essais 17 à 26) ont été compilés afin d'étudier l'influence du profil de vis sur les paramètres mesurés : **Figure III. 25** et **Figure III. 26**.

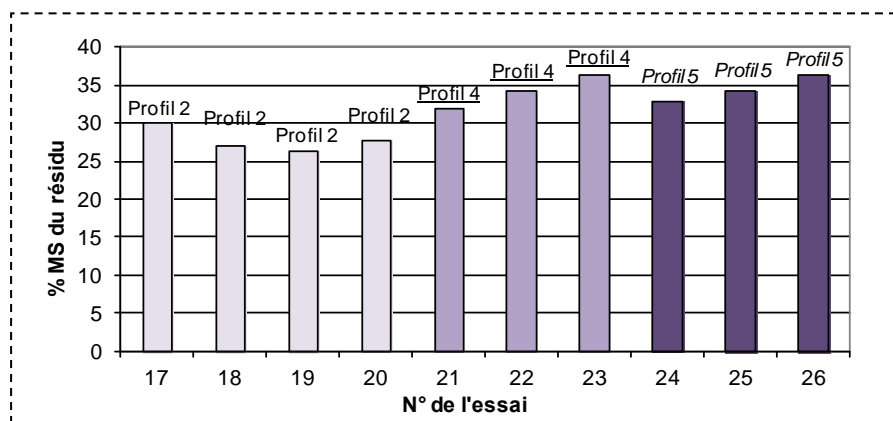


Figure III. 25 : Teneur en matière sèche de l'extrudat pour chacun des essais

Parmi les profils évalués, il apparaît que ce sont les profils 4 et 5 (essais 23 et 26) qui permettent la meilleure déshydratation de la luzerne, avec une teneur en eau résiduelle de 55 %. Les résultats montrent que tous les profils de vis utilisés conduisent à une déshydratation uniquement partielle de la luzerne.

Les résultats montrent en outre que l'extrusion est en revanche un outil intéressant pour l'extraction des protéines. Néanmoins, même si les rendements d'extraction sont élevés, le rendement en protéines récupérées dans l'extrait après centrifugation n'est plus que d'environ 20 à 30 % (Figure III. 26). Après centrifugation, les rendements de récupération des protéines dans le surnageant varient peu d'un essai à l'autre. L'essai donnant le meilleur rendement d'extraction est l'essai 24, avec le profil 5 (32 %), mais très proche de l'essai 25, également avec le profil 5. Toutefois, l'essai 20, mené avec le profil 2, malgré un rendement d'extraction des protéines faible, conduit à un rendement de récupération après centrifugation de près de 24 %.

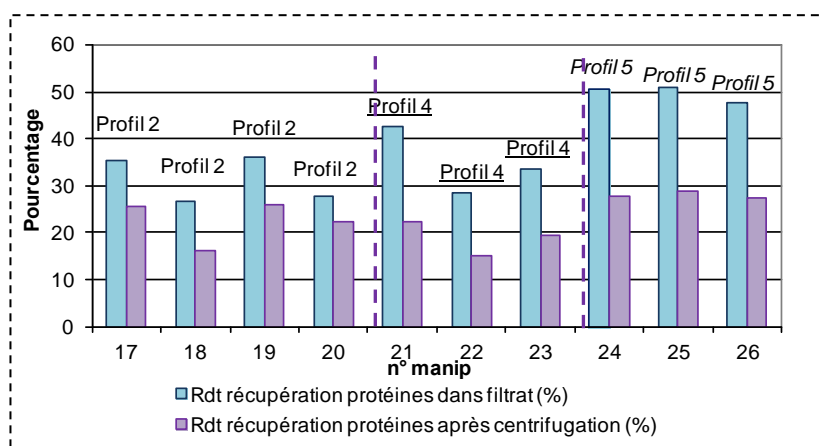


Figure III. 26 : Rendement de récupération des protéines dans le filtrat et dans le jus clarifié par centrifugation (Centrifugation à 4000 g, 20 min, 20 °C)

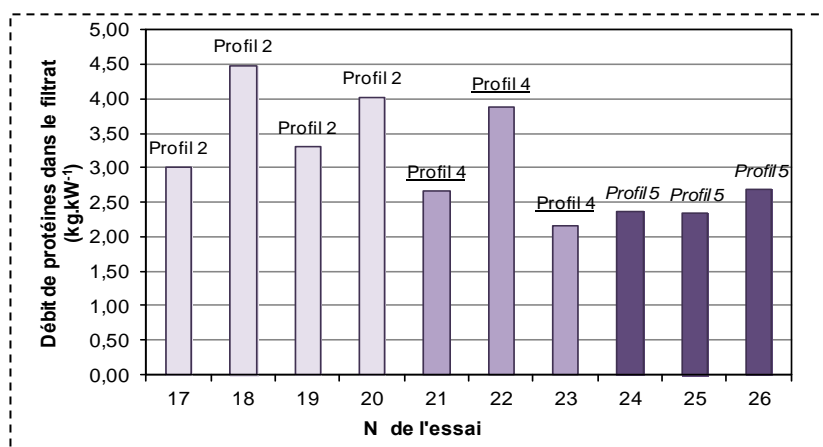


Figure III. 27 : Débit de protéines dans le filtrat brut en fonction de l'énergie mécanique dépensée

La **Figure III. 27** montre que le profil 5, pourtant le plus favorable pour l'extraction de protéines dans le filtrat (**Figure III. 26**), est celui le moins intéressant d'un point de vue énergétique.

Ainsi ces différents graphes permettent de constater qu'il semble y avoir des différences entre profils de vis, même s'il est difficile de déterminer des tendances précises.

Il est possible, sur les différents paramètres mesurés (teneur en matière sèche de l'extrudat, rendement d'extraction des protéines,...) de quantifier statistiquement l'effet du facteur « profil de vis ». Ainsi, l'analyse de la variance constitue le moyen statistique le plus simple à mettre en œuvre pour déterminer s'il existe ou non des différences significatives entre les 3 profils testés, considérant un paramètre donné. En effet, l'analyse de la variance recouvre un ensemble de techniques de tests et d'estimation destinées à apprécier l'effet de variables qualitatives (ici, le profil de vis choisi) sur une variable numérique. Dans le cas le plus simple, cela revient à la comparaison de plusieurs moyennes d'échantillons gaussiens (*Dagnelie, 1998*).

Des analyses de la variance à un facteur (ANOVA) sont réalisées à l'aide du logiciel Excel, pour chaque paramètre, afin de tester l'hypothèse nulle (il n'y a pas d'effet du profil de vis sur le paramètre considéré). Le principe du test est le suivant : si les différences entre les profils sont grandes par rapport aux écarts entre les valeurs obtenues pour un même profil, alors on conclura à un effet différentiel en fonction du profil de vis.

Le résultat statistique du test, noté F se rapproche de 1 lorsque l'hypothèse nulle est valide. Plus on s'éloigne de l'hypothèse nulle, plus l'impact du profil de vis est significatif, et plus la valeur F augmente. La valeur limite entre rejet et acceptation de l'hypothèse est calculée à partir de la loi statistique du test F sous l'hypothèse nulle. F suit une loi de Fisher, ayant 2 degrés de liberté au numérateur dans notre cas (3 niveaux du facteur profil de vis : profil 2, profil 4 et profil 5) et 7 degrés de libertés au dénominateur (10 essais – 3 facteurs) : **$F_{3;7} = 4.74$ à $\alpha = 5\%$ de significativité** (valeur lue dans la table de la loi de Fisher).

Le logiciel Excel nous permet d'obtenir la valeur de F expérimentale pour nos résultats. Cette valeur est comparée avec le F de Fisher donné par les tables.

Si $F_{exp} > 4.74$, alors on rejette l'hypothèse nulle : il y a un impact significatif du choix du profil de vis sur le paramètre testé.

Si $F_{exp} < 4.74$, alors il n'y a pas d'influence significative du profil de vis sur le paramètre.

Les différents paramètres testés et la significativité sont donnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau III. 19 : Résultats des tests d'analyse de la variance

	F_{exp} calculé sous Excel	Significativité de l'influence du profil de vis ($\alpha = 5\%$) $F_{Fisher} = 4.74$	Significativité de l'influence du profil de vis ($\alpha = 7.5\%$) $F_{Fisher} = 3.84$
Teneur en MS de l'extrudat (%)	14.79	Oui	Oui
Rendement d'extraction des protéines dans le filtrat (%)	11.77	Oui	Oui
Débit de sortie des protéines dans le filtrat ($kg \cdot h^{-1}$)	0.49	Non	Non
Teneur en protéines du filtrat (%/MS)	0.33	Non	Non
% élimination lors de la centrifugation	9.17	Non	Non
Rendement d'extraction des protéines dans le jus brun	4.69	Non	Oui

Facteur testé : profil de vis (3 niveaux : profil 2, profil 4 et profil 5)

Ces données statistiques montrent qu'il existe bien une influence du profil de vis sur la déshydratation de la luzerne, à travers la teneur en matière sèche de l'extrudat, et sur le rendement de récupération des protéines dans le filtrat. La **Figure III. 25** permet de constater que ce sont les profils 4 et 5 qui permettent l'obtention du résidu le moins humide. En outre, le profil 5 est celui pour lequel l'extraction des protéines est la meilleure (**Figure III. 26**).

Mais si c'est l'extraction des protéines dans le jus brun qui est suivie, après centrifugation, il n'y a plus de différence significative entre les profils à 5 %. Ceci montre l'impact de la centrifugation sur la perte en protéines. Toutefois, si la significativité retenue est de 7.5 %, l'impact du choix du profil est significatif. Le profil 5 est bien le meilleur pour l'extraction des protéines, malgré la centrifugation.

Cependant, lorsque le paramètre considéré est la teneur en protéines du filtrat, ou le débit de protéines dans le filtrat, aucune influence du choix du profil de vis n'est déterminée. En effet, la variabilité des résultats pour un même profil, du fait de l'application de plusieurs ratios L/S, de plusieurs débits d'alimentation en luzerne, est telle qu'elle prend le pas sur la variabilité des résultats d'un profil à l'autre.

Le profil 5, avec deux étapes de filtration, est celui le plus favorable au traitement de la luzerne, car il permet d'obtenir à la fois les meilleurs résultats sur l'extraction des protéines de la plante, et un résidu solide le moins humide.

III. CONCLUSIONS

Le traitement de la luzerne en extrudeur bi-vis permet un fractionnement thermo-mécanique de celle-ci, en combinant trois opérations successives, dans un même appareil : broyage de la plante, extraction L/S et séparation L/S entre un filtrat chargé en protéines, et un résidu solide fibreux.

L'élaboration du profil de vis, en choisissant les différents éléments le composant, permet de définir la longueur de chacune des parties : insertion de disques malaxeurs monolobes et bilobes pour le broyage et le mélange de la plante avec l'eau, éléments restrictifs pour former le bouchon dynamique et permettre le pressage, position plus ou moins proche du filtre pour limiter ou non la réabsorption de liquide par la plante.

L'objectif de ces travaux, outre la faisabilité de l'opération, était de produire un extrait vert de luzerne, le plus riche possible en protéines, tout en permettant une déshydratation de la plante. Toutefois, les conditions optimales, dans les limites de nos essais, pour la déshydratation (tout du moins l'obtention du résidu solide le moins humide possible) et pour la récupération de protéines dans le filtrat ne sont pas forcément concomitantes. Il faut alors trouver le compromis idéal entre jus chargé en protéines et résidu moins humide.

En outre, des considérations énergétiques sont à prendre en compte. En effet, l'énergie mécanique spécifique nécessaire au traitement de la plante est élevée dans le cas de nos essais. Ceci s'explique par le fait que l'introduction manuelle de la luzerne, matière humide et collante, ne peut être réalisée qu'à un débit limité (30 kg de luzerne par heure au maximum), ce qui empêche le remplissage maximal de la machine.

L'extrusion bi-vis s'avère être une option intéressante pour le traitement de la luzerne, dans le cadre du bioraffinage de la plante entière, en particulier pour l'extraction des protéines. En effet, une simple extrusion-pressage ne permet pas une déshydratation de la plante suffisante pour que le résidu solide puisse être directement utilisé en nutrition animale. Cependant, l'extrusion pourrait constituer une première étape de déshydratation, permettant de récupérer le plus de protéines possible, tout en assurant une pré-déshydratation. Une autre option à envisager pourrait être une déshydratation préalable de la luzerne, ce qui permettrait de passer outre le frein que représente l'introduction manuelle dans l'extrudeur bi-vis, à

condition que l'extrudat obtenu en sortie de procédé ait une teneur en matière sèche correspondante aux standards attendus dans la filière de nutrition animale (90 % de MS), et que le bilan énergétique des deux étapes ne dépasse pas celui obtenu dans l'industrie, pour une déshydratation dans un tambour rotatif, suivie par un pressage classique.



CHAPITRE IV

FRACTIONNEMENT DES PROTEINES PAR INTERACTIONS HYDROPHOBES

SOMMAIRE

I.	EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE DANS UN SOLVANT HYDROPHOBE.....	- 177 -
I.1.	Etude des extractions sur solution synthétique	- 178 -
I.1.1	Sérum albumine bovine.....	- 178 -
I.1.2	Lysozyme	- 180 -
I.2.	Etude de l'extraction liquide-liquide sur le jus centrifugé	- 182 -
I.3.	Conclusions.....	- 183 -
II.	SEPARATION DES PROTEINES PAR FIXATION SUR RESINE.....	- 184 -
II.1.	Etude de la fixation des protéines du jus centrifugés sur les résines.....	- 184 -
II.2.	Etudes cinétiques expérimentales	- 186 -
II.2.1	Sérum albumine bovine (BSA).....	- 186 -
II.2.1.1	Evolution au cours du temps	- 186 -
II.2.1.2	Influence de la concentration sur l'équilibre de fixation.....	- 187 -
II.2.2	Lysozyme	- 188 -
II.2.2.1	Evolution au cours du temps de l'équilibre de fixation	- 188 -
II.2.2.2	Influence de la concentration sur l'équilibre de fixation.....	- 189 -
II.2.3	Conclusions	- 191 -
II.3.	Isotherme de sorption.....	- 191 -
II.4.	Conclusions.....	- 196 -
III.	SEPARATION DES PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE.....	- 197 -
III.1.	Cinétique de transfert	- 197 -
III.1.1	Description	- 197 -
III.1.1.1	Diffusion dans le film autour de la résine	- 198 -
III.1.1.2	Diffusion dans la résine.....	- 199 -
III.1.2	Calcul des coefficients de diffusion	- 199 -
III.2.	Cinétiques de sorption.....	- 202 -
III.2.1	Modèles cinétiques de sorption.....	- 202 -
III.2.1	Détermination expérimentale.....	- 203 -
III.3.	Cinétique d'écoulement.....	- 205 -
III.3.1	Théorie de l'équilibre	- 205 -
III.3.2	Réacteur colonne : extraction des protéines de l'extrait centrifugé de luzerne.....	- 208 -
III.3.2.1	Résine Amberlite IRA 900	- 209 -
III.3.2.2	Résine Amberlite XAD4	- 211 -
IV.	CONCLUSIONS	- 212 -

Un des objectifs de cette thèse était non pas de concentrer et de purifier toutes les protéines du jus, mais d'isoler en particulier les protéines hydrophobes, dites protéines vertes. En effet, l'extraction des protéines hydrophiles, dites « blanches », grâce à un procédé de chromatographie était l'objet de la thèse de S. Kerfai, dans le cadre du projet PRODULUZ. C'est pourquoi nous ne nous focaliserons pas ici sur la purification de la Rubisco, protéine majoritaire de la luzerne.

L'étude du fractionnement des protéines s'est centrée sur l'utilisation des interactions hydrophobes lors d'une étape de séparation chromatographique. Plusieurs voies ont été envisagées et évaluées au cours de la thèse. Les résultats sont présentés dans ce chapitre.

Les procédés chromatographiques utilisant les interactions hydrophobes sont généralement décrits sous le nom de chromatographie de partage. Néanmoins, d'autres mécanismes peuvent être associés à la séparation des protéines par interactions hydrophobes, comme les mécanismes d'exclusion stérique ou les mécanismes d'échange d'ions. En effet, les résines peuvent être utilisées en phase « normale », de l'eau constituant le solvant d'hydratation, ou en phase « inverse » avec un solvant hydrophobe remplaçant l'eau. Dans un premier temps, les travaux se sont donc concentrés sur la sélection d'un solvant hydrophobe.

I. EXTRACTION LIQUIDE-LIQUIDE DANS UN SOLVANT HYDROPHOBE

L'extraction liquide-liquide est un procédé consistant à séparer des molécules d'intérêt contenues dans un solvant par addition d'un autre solvant, non miscible. Les molécules se répartissent alors entre les deux solvants, selon leur affinité décrite par un coefficient de partage. Une étape de décantation est ensuite nécessaire, afin de séparer les deux phases :

- **une phase aqueuse** appauvrie en molécules d'intérêt, appelée **raffinat**,
- **une phase organique** contenant les protéines récupérées, appelée **extrait**.

Dans notre cas, les molécules d'intérêt sont les protéines hydrophobes présentes dans la phase aqueuse. Plusieurs solvants pouvaient être envisagés, comme l'hexane ou l'acétone, mais dans l'optique de la thèse, un solvant respectueux de l'environnement a été testé : l'huile végétale de tournesol, possédant un profil en acides gras proche de celui de l'extrait de luzerne. Dans un premier temps, l'efficacité des différents solvants a été évaluée sur des solutions synthétiques contenant une protéine, soit de la sérum albumine bovine (bovine

serum albumin, BSA), soit du lysozyme. L'étude a ensuite été étendue aux extraits de protéines de luzerne ainsi qu'au jus centrifugé de luzerne. L'objectif de cette partie était d'évaluer la faisabilité de la séparation entre les protéines hydrophobes et les protéines hydrophiles selon leur différence d'affinité pour le solvant, et surtout d'évaluer l'efficacité de l'huile comme solvant extracteur par rapport à des solvants dont l'efficacité a déjà été démontrée, comme l'hexane.

1.1. Etude des extractions sur solution synthétique

Comme il n'a pas été possible d'identifier des protéines hydrophobes commerciales disponibles facilement en quantité suffisante, deux protéines ayant des propriétés différentes ont été retenues, la BSA et le lysozyme. La BSA a été sélectionnée car c'est une protéine soluble dans l'eau qui se fixe sur de nombreux supports. Le lysozyme est une protéine globulaire, présentant des propriétés de surface hydrophobes, 41% de celle-ci serait en effet non polaire (*Ladisch, 2001*). Des essais d'extraction ont donc été menés sur des solutions synthétiques contenant une de ces protéines.

Les extractions liquide-liquide ont été réalisées avec des concentrations croissantes en protéine, mais en conservant un rapport solvant/diluant constant de 0.33. Le coefficient de partage, K , a été calculé selon la formule :

$$K = \frac{\text{Concentration}_{\text{extrait}}}{\text{Concentration}_{\text{raffinat}}}$$

I.1.1 Sérum albumine bovine

La Bovine Serum Albumine (BSA) est une protéine de 66.5 kDa, extraite industriellement du sérum de bovin, très largement employée en biologie du fait de son faible coût, de sa stabilité et de son absence d'effet dans de nombreuses réactions biochimiques. Son point isolélectrique est de 4.7.

Les résultats obtenus avec comme solvant extracteur de l'hexane et de l'huile de tournesol sont présentés sur la **Figure IV. 1** et la **Figure IV. 2**.

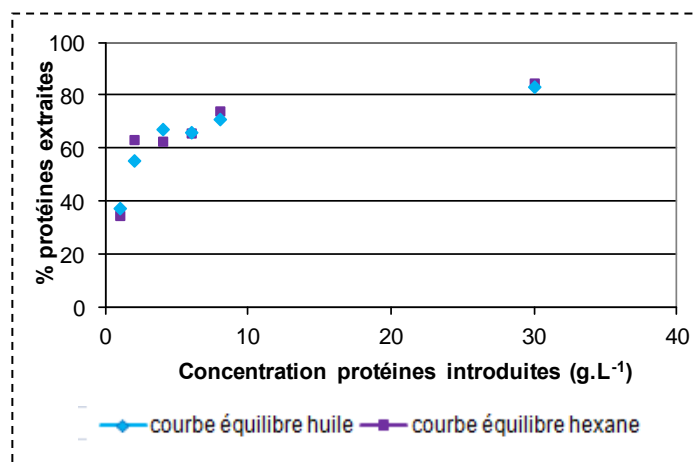


Figure IV. 1 : Efficacité de l'extraction de la BSA par l'hexane et l'huile
(Gamme de concentration en BSA variant de 1 à 30 g.L⁻¹ (pourcentage solvant = 25 %))

L'extraction de la BSA est efficace, que ce soit dans l'hexane ou dans l'huile de tournesol : un maximum de 80 % de protéines extraites est atteint à 30 g.L⁻¹ de protéines introduites. La BSA est d'autant mieux extraite que sa concentration en solution est importante. En outre, d'autres expériences (non présentées) ayant fait varier la proportion de solvant ont montré il n'y a pas d'influence significative de la quantité de solvant sur l'efficacité de l'extraction.

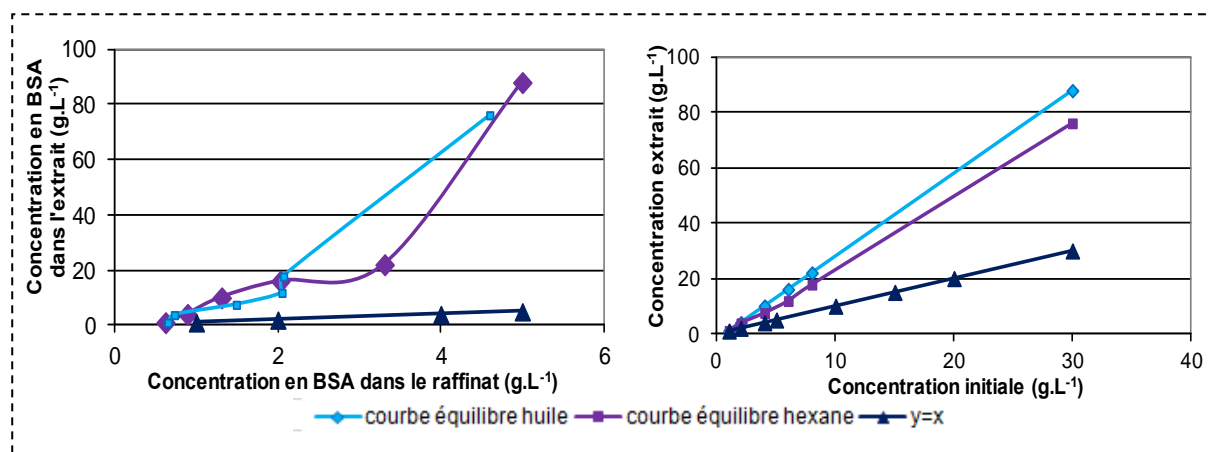


Figure IV. 2 : Equilibre de partage de la BSA dans l'huile et l'hexane
(Concentration introduite en BSA de 1 à 30 g.L⁻¹)

Les résultats indiquent que les protéines présentent une plus forte affinité pour ces deux solvants que pour l'eau. Ainsi, les courbes d'évolution de la concentration dans l'extrait sont pour les deux solvants nettement au dessus de la droite $y = x$.

L'efficacité d'extraction de l'huile de tournesol apparaît tout à fait comparable à celle de l'hexane, bien que l'évolution en fonction de la concentration en protéine soit légèrement

différente. Elle est linéaire avec l'hexane, et donc le coefficient de partage est constant dans la gamme de concentration évaluée. En revanche, avec l'huile, comme l'évolution n'est pas linéaire, il semble que l'affinité des protéines pour l'huile de tournesol varie en fonction de leur concentration.

I.1.2 Lysozyme

Le lysozyme est une protéine globulaire, de 14.3 kDa, extraite du blanc d'œuf de poule. C'est une enzyme ayant pour propriété de rompre la paroi polysaccharidique de certaines bactéries, lui conférant ainsi un pouvoir bactéricide, protégeant de certaines infections. Son point isoélectrique est de 10.7.

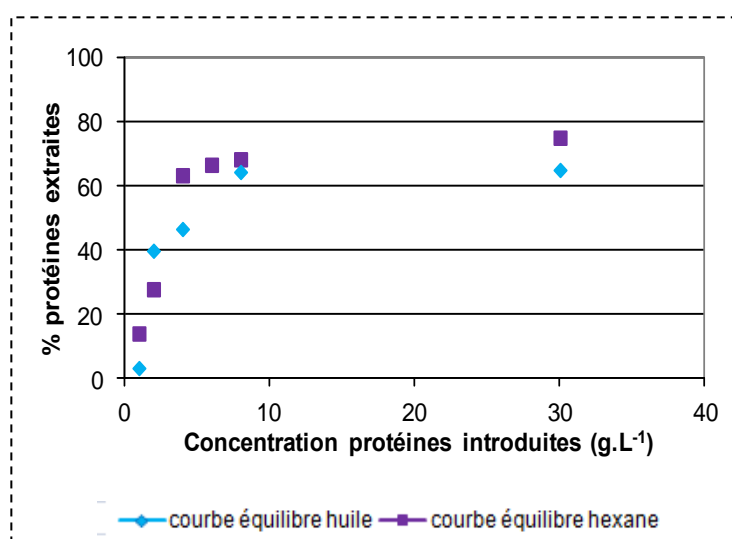


Figure IV. 3 : Efficacité de l'extraction du lysozyme par l'hexane et l'huile
(Gamme de concentration en lysozyme variant de 1 à 30 g.L⁻¹ (pourcentage solvant = 25 %))

La superposition est quasiment parfaite entre les courbes d'extraction à l'hexane et à l'huile de tournesol (**Figure IV. 3**), ce qui confirme le choix de l'huile de tournesol comme solvant pouvant remplacer efficacement l'hexane. Le palier du maximum d'extraction (autour de 70 % des protéines extraites) est atteint plus tôt pour l'hexane que pour l'huile. Il n'y a pas d'influence de la quantité de solvant sur l'efficacité de l'extraction (résultats non exposés).

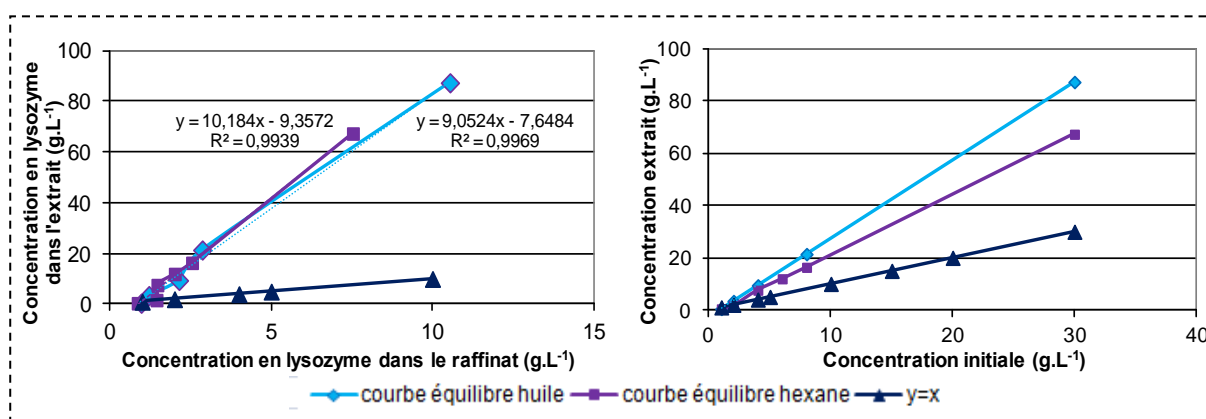


Figure IV. 4 : Equilibre de partage du lysozyme dans l'huile et l'hexane
(Concentration introduite en lysozyme de 1 à 30 g.L⁻¹)

Les résultats indiquent que, tout comme la BSA, le lysozyme présente une plus forte affinité pour l'hexane et l'huile que pour l'eau. Ceci est montré par l'évolution des droites de concentrations dans l'extrait nettement au-dessus de la droite $y = x$.

L'efficacité d'extraction de l'huile de tournesol apparaît tout à fait comparable à celle de l'hexane. L'évolution est linéaire (**Figure IV. 4**). Les équations des droites de régression linéaires sont indiquées sur le graphique. Les coefficients de partage dans l'huile ou l'hexane sont très proches.

Tableau IV. 1 : Coefficients de partage pour le lysozyme et la BSA, dans l'huile de tournesol et dans l'hexane

	Coefficient de partage	
	BSA	Lysozyme
Huile	17.6	8.3
Hexane	16.6	8.9

Coefficients calculés pour une concentration initiale en protéines de 30 g.L⁻¹

Les résultats montrent les coefficients de partage respectifs (**Tableau IV. 1**) pour les deux protéines, dans l'eau et dans l'huile. L'hexane et l'huile présentent une différence d'affinité entre les deux protéines. Cette technique peut donc être envisagée pour séparer deux protéines ayant des propriétés d'hydrophobicité différentes.

1.2. Etude de l'extraction liquide-liquide sur le jus centrifugé

Lorsque les essais sont menés sur le jus centrifugé, une émulsion apparaît à l'interface des deux phases après agitation. Cette émulsion disparaît partiellement durant la décantation, mais une couche d'épaisseur variable persiste. Ce problème est lié à la présence de molécules tensioactives dans l'extrait, telles que la saponine.

La teneur en protéines dans le jus centrifugé après extraction a été déterminée par la méthode de Kjeldahl. Dans l'huile comme dans l'hexane, l'efficacité de l'extraction des protéines dans le solvant est comparable et diminue lorsque la proportion de solvant dans le mélange augmente.

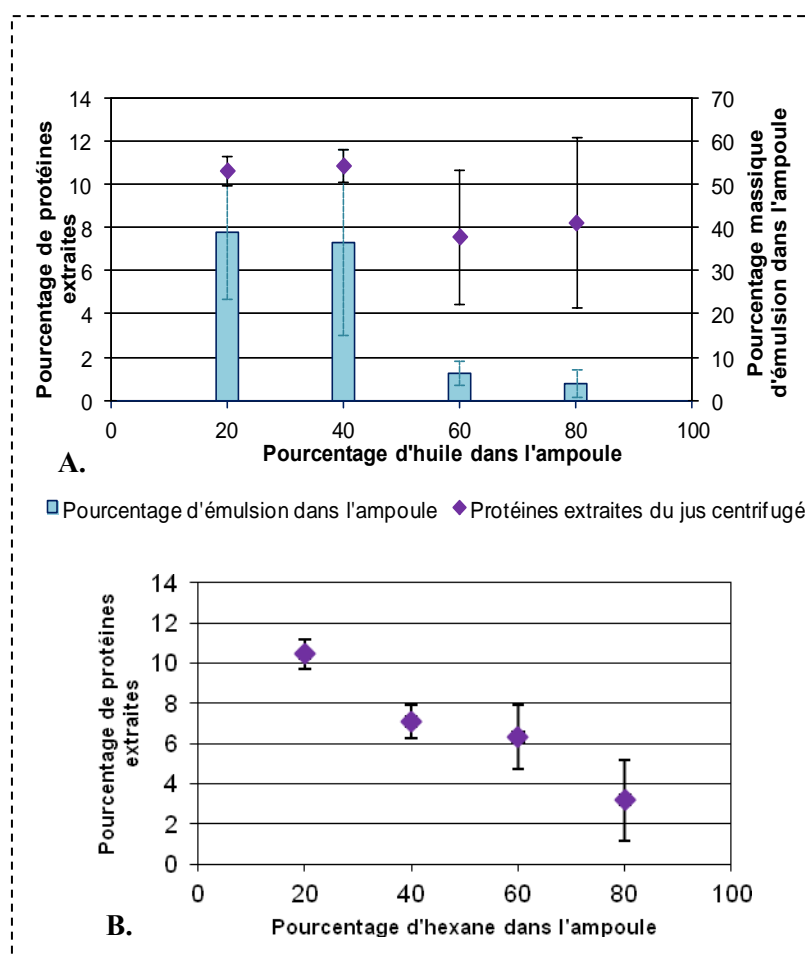


Figure IV. 5 : Extraction des protéines du jus de luzerne centrifugé

A. Dans l'huile

B. Dans l'hexane

(n = 3 essais, mesure de la teneur en protéines en triplicat pour chaque essai sur l'huile, duplicat sur l'hexane ; teneur en protéines du jus centrifugé avant extraction : 31.9 % (MS))

Les analyses menées sur le raffinat montrent une diminution de la teneur en protéines de près de 10 %. Cette valeur correspond à la teneur en protéines hydrophobes, mais leur caractérisation dans la phase organique ou dans l'émulsion n'a pas été réalisée.

La **Figure IV. 5.B.** montre que la quantité d'émulsion formée est entre 7 et 8 fois plus importante pour les quantités les plus faibles de solvant, En outre, l'écart-type sur la masse d'émulsion est très conséquent pour ces mêmes pourcentages de solvant, alors que la répétition de la mesure de la teneur en protéines dans le jus après extraction est meilleure pour ces points que pour les expériences présentant moins de formation d'émulsion. Ainsi, une part d'incertitude non négligeable persiste sur l'extraction de ce milieu complexe dans l'huile de tournesol.

1.3. Conclusions

Les résultats d'extraction liquide/liquide montrent que l'huile de tournesol est aussi efficace que les solvants chimiques pour l'extraction des protéines. Il est également possible d'utiliser de l'huile végétale pour la concentration des protéines, d'un facteur 16 dans le cas de la BSA. Ce procédé apparaît sélectif puisqu'il permet de réaliser en même temps une séparation partielle entre la BSA et le lysozyme, ces deux protéines présentant des coefficients de partage très différents.

Néanmoins, ce procédé montre ses limites lorsqu'il est appliqué à des extraits végétaux complexes, contenant des molécules tensioactives et formant une émulsion. Ainsi, le support chromatographique pourrait être une alternative intéressante.

II. SEPARATION DES PROTEINES PAR FIXATION SUR RESINE

Deux types de résines ont été envisagés au cours de l'étude : **une résine échangeuse d'anions fortement basique** (IRA 900) et **une résine adsorbante** (XAD4). Les deux résines ont été conditionnées selon deux schémas (**Chapitre V, Paragraphe V.2.**), le premier conduisant à une résine hydrophile (phase normale), le second conduisant à une résine hydrophobe (phase inverse). Ce deuxième mode de traitement a été développé de manière à pouvoir conduire des réactions catalytiques supportées en phase hydrophobe (*Bellemare, 2003*). Il n'a toutefois jamais été validé au niveau de la séparation.

Ce conditionnement comprend une phase d'imbibition de la résine dans de l'eau, puis, dans le cas de la résine conditionnée de manière hydrophobe, une phase d'imprégnation dans l'huile de tournesol, après séchage de l'eau résiduelle par solvant. De cette façon, il est envisagé qu'une couche d'huile se dépose autour des billes de résine, ainsi qu'à l'intérieur des pores.

Des essais préalables de fixation des protéines du jus centrifugé ont été menés dans un premier temps avec chacune des deux résines, pour les deux conditionnements différents. Dans un second temps, des essais ont été mis en œuvre avec les deux protéines modèles, lysozyme et BSA, sur une seule résine (IRA 900) selon les deux procédures de conditionnement, en réacteur agité, afin de définir la cinétique et le mode de fixation.

II.1. Etude de la fixation des protéines du jus centrifugés sur les résines

Des essais sur l'extrait de luzerne centrifugé ont été menés sur XAD4 et IRA 900, afin de mieux comprendre les mécanismes de fixation. Les résultats sont présentés dans le **Tableau IV. 2.**

Tableau IV. 2 : Efficacité de l'extraction des protéines du jus de luzerne centrifugé par traitement sur résines

	Mode de conditionnement	Résine IRA 900	Résine XAD4
EAU	Imbibée dans l'eau	8.6 ± 0.2	8.4 ± 0.4
	Imbibée dans l'eau + séchée 50 °C	5.1 ± 1.5	3.3 ± 0.5
	Imbibée dans l'eau + séchée par solvant	3.2 ± 0.5	2.2 ± 1.3
HUILE	Imbibée dans l'eau + imbibée dans l'huile	14.9 ± 0.1	10.4 ± 0.9
	Imbibée dans l'eau + séchée 50 °C + imbibée dans l'huile	11.8 ± 1.1	9.4 ± 1.7
	Imbibée dans l'eau + séchée par solvant + imbibée dans l'huile	13.4 ± 1.3	11.4 ± 2.1

Valeurs présentées : capacité de fixation de la résine ($\text{mg protéines.g}^{-1}$ de résine) (différence entre teneur en protéines du témoin et teneur en protéines du jus après traitement sur résine). Deux essais ont été effectués pour chaque type de conditionnement. La mesure de la teneur en protéines a été menée en duplicat pour chaque expérience. Teneur en protéines du jus centrifugé avant traitement : 34.6 % (MS)

Les essais de conditionnement de la résine montrent que le séchage conduit à une réduction de l'efficacité de fixation. Le séchage induisant la plus forte réduction d'efficacité a été considéré comme le plus efficace pour éliminer l'eau résiduelle, et donc pour favoriser la mise en place d'une couche d'huile autour des billes de résine. Lors de nos essais, le protocole incluant l'introduction d'un solvant (de l'éther), est celui la meilleure déshydratation, puisque la résine perd près de 60 % de sa capacité. C'est donc lui qui a été retenu.

Le conditionnement de la résine dans l'huile permet dans tous les cas une augmentation de la capacité de fixation de la résine, de près de 40 % dans certains cas. Une hypothèse serait que l'huile induit une répulsion entre les polymères, et augmente l'accessibilité aux protéines. Le protocole de conditionnement dans l'huile, sans séchage préalable n'a pas été retenu, car même s'il donne les meilleurs résultats, il est difficile d'identifier sous quelle forme se trouve la résine.

Dans tous les cas, la résine IRA 900 présente une meilleure efficacité de fixation des protéines que la résine XAD4. C'est donc cette première résine qui a été choisie pour l'étude des cinétiques de fixation.

Les modes de conditionnement retenus pour la suite de l'étude sont l'imbibition dans l'eau puis la filtration sur Büchner (résine conditionnée dans l'eau), étapes auxquelles s'ajoutent **un séchage par solvants** (éthanol puis éther) et **une imprégnation dans l'huile** suivie d'une nouvelle filtration pour la résine conditionnée dans l'huile.

II.2. Etudes cinétiques expérimentales

II.2.1 Sérum albumine bovine (BSA)

II.2.1.1 Evolution au cours du temps

Les résultats obtenus avec la résine IRA 900 (**Figure IV. 6 A et B**) montrent que la quantité de protéines fixées augmente au cours du temps pour se stabiliser après 4 h de mise en contact pour une concentration introduite de 1 g.L^{-1} et plus de 8 h lorsque la concentration est de 20 g.L^{-1} lorsque la résine est conditionnée dans l'eau. En revanche, lorsque la résine est conditionnée dans l'huile, l'équilibre est atteint après 8h de contact pour les deux concentrations.

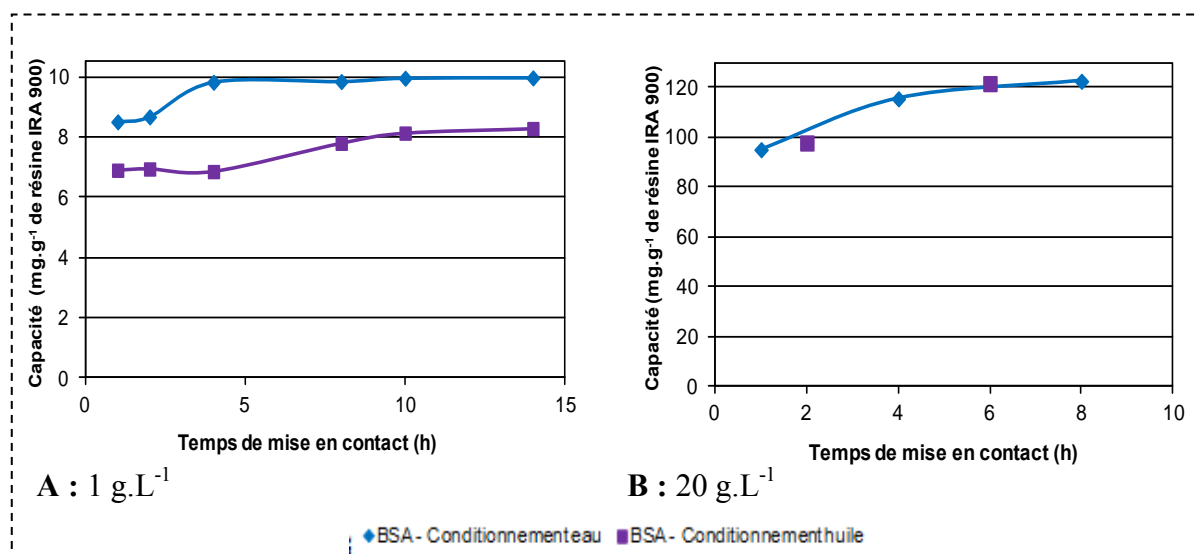


Figure IV. 6 : Cinétique de fixation de la BSA pour la résine Amberlite IRA 900 conditionnée dans l'eau ou dans l'huile

A : Concentration initiale solution BSA = 1 g.L^{-1}

B : Concentration initiale solution BSA = 20 g.L^{-1}

Au bout d'une demi-heure, 85 % de la capacité maximale de fixation de la BSA sont déjà atteints pour les deux types de conditionnement. La fixation des protéines sur la résine IRA 900 est donc très rapide, et combinés à l'effet de l'influence de la concentration, ces résultats semblent indiquer que le mécanisme limitant la fixation est le transfert de matière.

II.2.1.2 Influence de la concentration sur l'équilibre de fixation

L'influence de la concentration a été étudiée afin de comprendre le mécanisme de fixation des protéines sur la résine, et d'évaluer si une différence existe entre les deux modes de conditionnement de la résine. La gamme de concentration étudiée est comprise entre 0.1 g.L^{-1} et 100 g.L^{-1} .

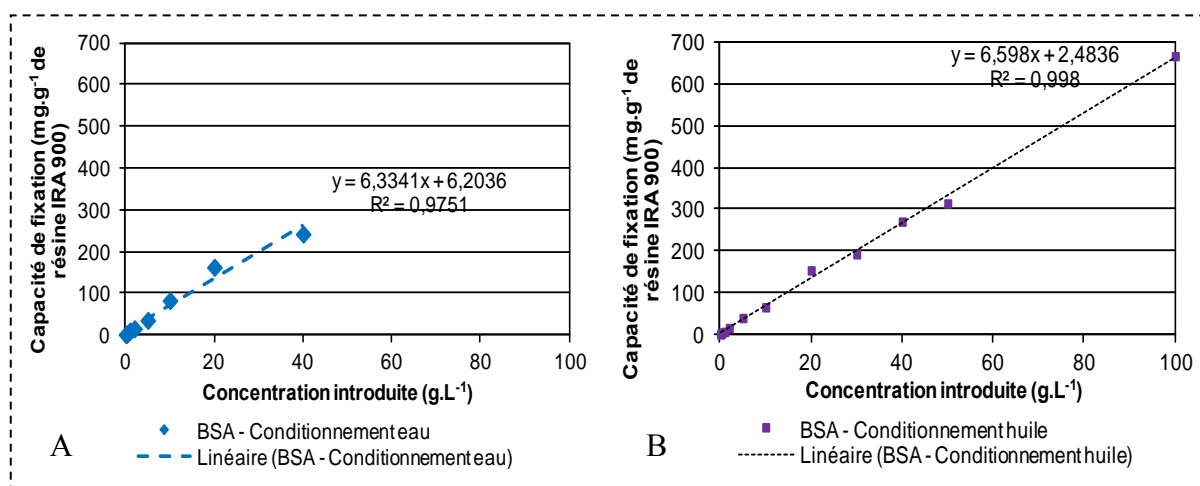


Figure IV. 7 : Isothermes de fixation de la BSA sur la résine Amberlite IRA 900 (équilibre atteint au bout de 6 heures)

- A.** Conditionnement de la résine dans l'eau
B. Conditionnement de la résine dans l'huile

La capacité de la résine augmente nettement avec la concentration en BSA sans atteindre de limite dans la gamme de concentration étudiée (**Figure IV. 7 A et B**). Cette évolution est identique pour les deux types de conditionnement. La quantité de protéines fixée dépend de l'équilibre thermodynamique s'établissant entre la résine et la solution (**Figure IV. 8**).

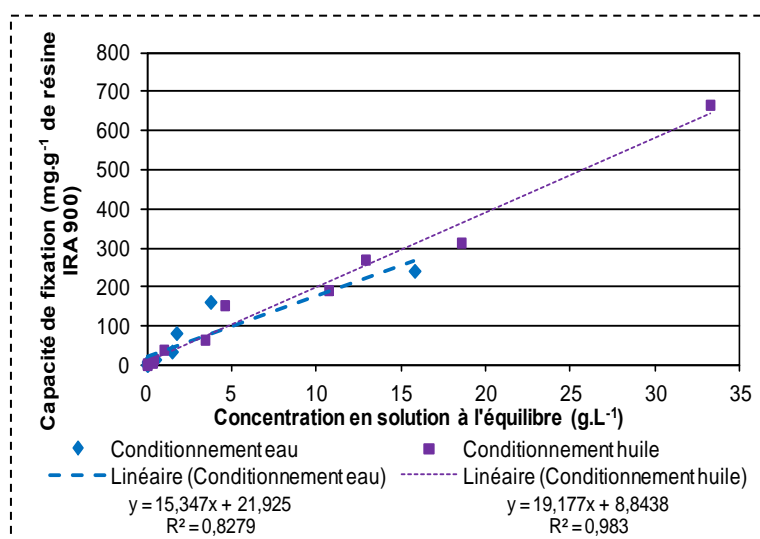


Figure IV. 8 : Isothermes de fixation de la BSA sur la résine Amberlite IRA en fonction de la concentration à l'équilibre

L'évolution de la concentration fixée sur la résine en fonction de la concentration résiduelle en protéine dans la solution est constante, selon un coefficient de partage

$K = \frac{C_{\text{résine}}}{C_{\text{équilibre}}} = 0.02$. Ce coefficient ne doit pas être considéré comme le coefficient de partage

en extraction liquide, mais indique principalement que la fixation est bien liée à un équilibre thermodynamique restant constant.

Les valeurs du coefficient de partage sont presque identiques pour les deux types de conditionnement, ce qui semble montrer donc que le traitement d'hydrophobation des grains de résine ne modifie l'affinité des protéines pour le support, et donc la capacité de fixation de la BSA.

II.2.2 Lysozyme

II.2.2.1 Evolution au cours du temps de l'équilibre de fixation

Les résultats obtenus avec la résine IRA 900 (**Figure IV. 9**) montrent que la fixation est possible, même si elle reste faible dans les conditions présentées. Ainsi, pour une concentration initiale de 1 g.L⁻¹, l'équilibre est atteint au bout de 4 h de mise en contact, à une concentration de 1.5 mg.g⁻¹ de résine conditionnée dans l'eau.

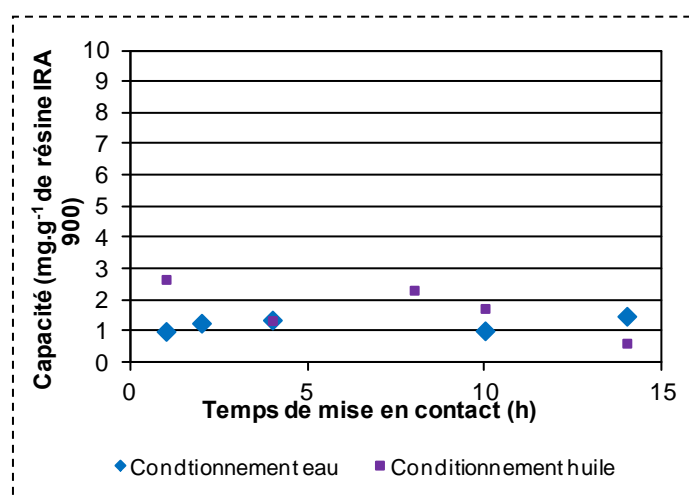


Figure IV. 9 : Cinétique de fixation du lysozyme pour la résine Amberlite IRA 900 conditionnée dans l'eau ou dans l'huile
(Concentration solution lysozyme introduite = 1 g.L⁻¹)

Lorsque les protéines sont mises en contact avec la résine conditionnée dans l'huile, le comportement est très différent. La quantité de protéines fixée atteint une valeur maximale dans les premiers temps, puis elle diminue progressivement au cours du temps. Toutefois, les capacités de fixation sont inférieures à 3 mg de protéine par gramme de résine, par conséquent les variations observées ne sont que faibles. En outre, nous pouvons constater que la résine fixe moins bien le lysozyme que les protéines de l'extrait centrifugé (**Tableau IV. 2**).

II.2.2.2 Influence de la concentration sur l'équilibre de fixation

L'influence de la concentration a été étudiée afin de comprendre le mécanisme de fixation sur la résine et d'évaluer s'il y a une différence entre les deux modes de conditionnement. Ces essais ont été menés uniquement avec la résine IRA 900.

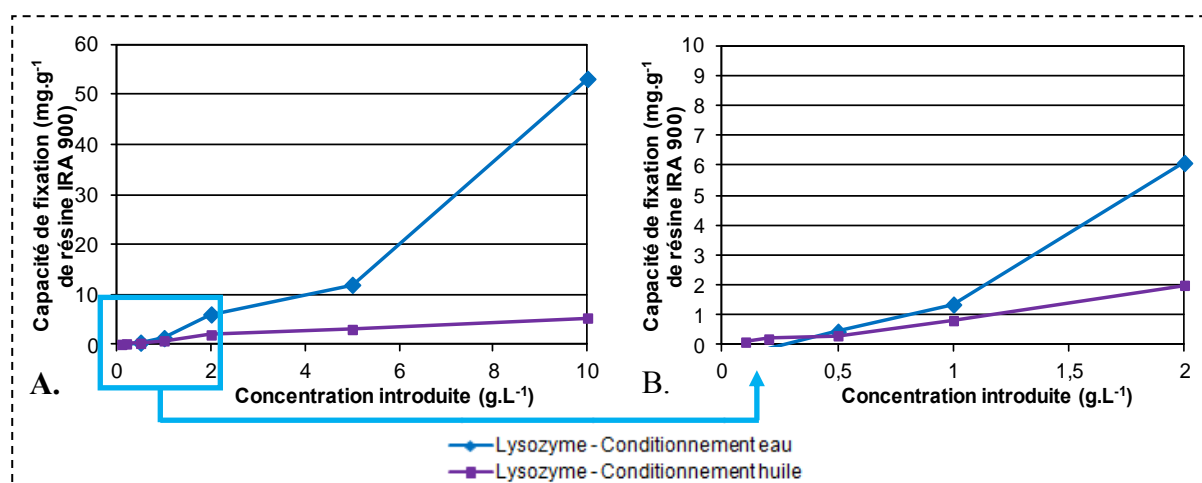


Figure IV. 10 : Isothermes de fixation du lysozyme sur la résine Amberlite IRA 900

(équilibre atteint au bout de 5 heures)

A. Pour toute la gamme de concentration

B. Zoom sur les faibles concentrations

La quantité de protéines fixées augmente avec la concentration initiale de la solution (Figure IV. 10 A et B). Cette augmentation est néanmoins beaucoup plus forte avec la résine conditionnée dans l'eau qu'avec celle conditionnée dans l'huile. Cependant, même si cette différence est nette, elle est observée sur des quantités de protéines fixées qui sont faibles, au maximum de 50 mg.g⁻¹ de résine conditionnée. La quantité de protéines fixées dépend de l'équilibre thermodynamique s'établissant entre la résine et la solution.

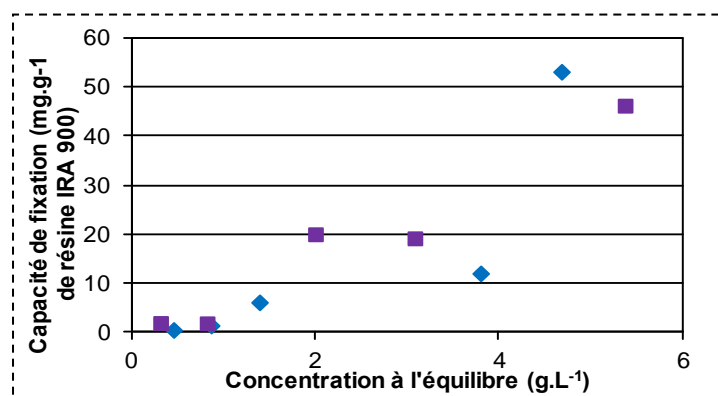


Figure IV. 11 : Isothermes de fixation du lysozyme sur la résine Amberlite IRA 900, en fonction de la concentration à l'équilibre

(Equilibre atteint au bout de 5 heures, gamme de concentration : de 0.1 à 10 g.L⁻¹)

L'évolution de la concentration fixée sur la résine en fonction de la concentration résiduelle en protéines dans la solution est constante, selon un coefficient de partage

$K = \frac{C_{résine}}{C_{équilibre}} = 0,01$. Il n'y a pas de différence significative entre les conditionnements car les

quantités de protéines fixées restent faibles, mais semble que le conditionnement dans l'huile

de tournesol diminue légèrement l'efficacité de la résine, mais pas de manière réellement significative.

II.2.3 Conclusions

Les résultats obtenus lors de ces essais montrent que la résine IRA 900 permet la fixation des protéines (**Figure IV. 12**), fixation différente pour les deux protéines modèles étudiées.

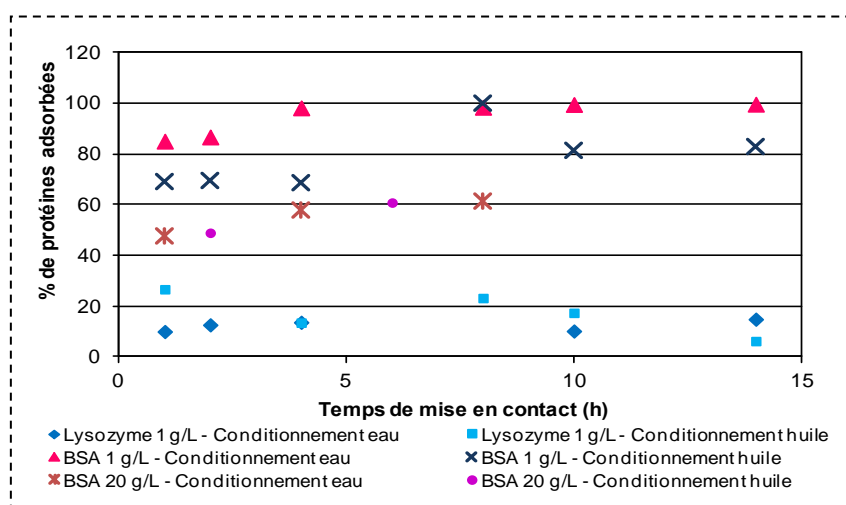


Figure IV. 12 : Cinétiques de fixation des protéines modèles sur résine IRA 900, pourcentage de protéines adsorbées

La résine permet la fixation de la BSA avec une efficacité deux fois plus élevée que pour le lysozyme, que le conditionnement ait été réalisé avec de l'eau comme avec de l'huile.

Le conditionnement dans l'huile ne semble pas être efficace, puisqu'il ne modifie pas les propriétés apparentes de la résine. Afin de valider cette hypothèse et de définir les conditions de mise en œuvre de la chromatographie, les mécanismes de fixation ont été étudiés.

II.3. Isotherme de sorption

Les mécanismes de fixation sur la résine peuvent être de trois types :

- **Echange d'ions** des protéines avec le contre-ion fixé sur la résine
- **Adsorption** sur des sites non ionisés, sans échange avec le contre-ion fixé sur la résine

- **Echange liquide-liquide** entre la phase lipidique saturante de la résine et la phase aqueuse.

Les mécanismes de fixation par échange d'ions ou adsorption peuvent être décrits par des isothermes de sorption. La distribution du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire est donnée à l'équilibre par la relation suivante (*Sherwood et al., 1975*) :

$$K = \frac{(C_0 - C_{eq})q_{eq}}{(q_m - q_{eq})C_{eq}}$$

Avec :

K : paramètre reflétant la distribution du soluté entre la phase mobile et la phase stationnaire

C_0 : concentration initiale du soluté dans la phase mobile (fluide hors des particules) ($g.L^{-1}$)

C_{eq} : concentration en soluté dans la phase mobile quand l'équilibre a été atteint ($g.L^{-1}$)

q_m : concentration maximale qui peut être fixée ($g.g^{-1}$ de résine)

q_{eq} : concentration en soluté ($g.g^{-1}$ de résine) dans la phase stationnaire en équilibre avec la phase mobile de concentration C_{eq}

Deux modèles de cinétiques ont été étudiés :

- Le **modèle de Langmuir**

Le modèle de Langmuir a été développé en supposant que le solide étudié est un matériau homogène, c'est-à-dire qu'il possède des sites d'adsorption d'énergie équivalente, qui fixent une seule molécule de soluté. Dans ce cas, la quantité de protéines fixées se calcule par :

$$Q = K_L C, \text{ qui se linéarise par : } \frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_0 K_L C_e} + \frac{1}{q_0}$$

- Le **modèle de Freundlich**

Dans le cas du modèle de Freundlich, la surface du solide est supposée hétérogène, c'est-à-dire que les sites de fixation ont des énergies différentes et peuvent fixer jusqu'à n moles de soluté. La loi d'équilibre suit alors une relation de type Freundlich, donc l'équation définit le coefficient de distribution K_F .

$$Q = K_F C^n, \text{ qui se linéarise par : } \log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e$$

Les paramètres de ces deux modèles sont calculés à partir du tracé des courbes $1/q_e = f(1/C_e)$ et $\log q_e = f(\log C_e)$ (**Figure IV. 13**), obtenues à l'aide des valeurs obtenues expérimentalement. Les valeurs des paramètres calculés, ainsi que des coefficients de corrélation sont présentées dans le **Tableau IV. 3**.

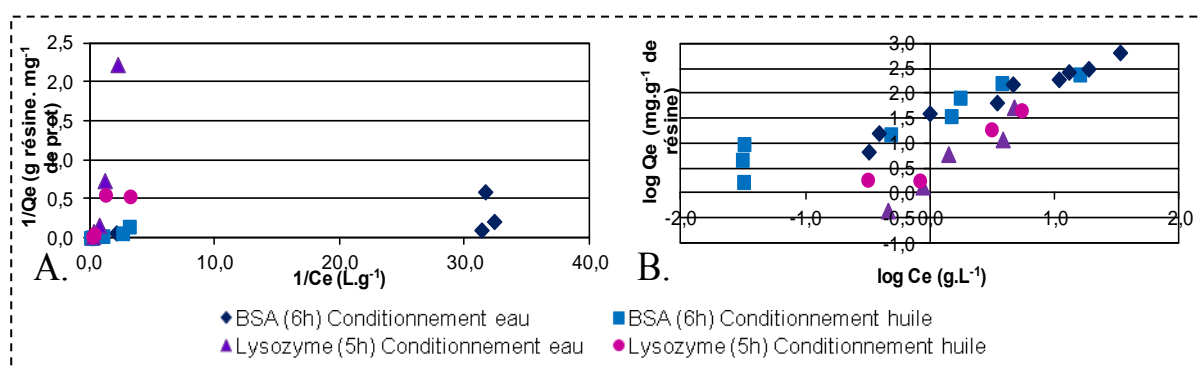


Figure IV. 13 : Détermination graphique de la loi d'équilibre d'échange des protéines modèles (BSA et Lysozyme) sur la résine Amberlite IRA 900.

A. Isotherme de Langmuir
B. Isotherme de Freundlich

A partir de ces courbes sont calculés les paramètres des modèles.

Tableau IV. 3 : Paramètres de Langmuir et de Freundlich

	<i>Langmuir</i>				<i>Freundlich</i>			
	Q_0 (g.kg ⁻¹ résine)	K_L (L.mol ⁻¹)	R_L^2 (%)	Δq (%)	K_F (L.kg ⁻¹ résine)	n	R_F^2 (%)	Δq (%)
BSA Conditionnement eau	613.5	0.18	52.5	142.4	29.01	1.15	96.5	58.5
BSA Conditionnement huile	<i>-76.9</i>	<i>-0.35</i>	87.4	280.4	41.24	1.47	89.2	78.3
Lysozyme Conditionnement eau	<i>-2.75</i>	<i>-0.33</i>	94.9	121.7	2.06	0.55	93.5	67.0
Lysozyme Conditionnement huile	12.05	0.49	63.6	79.8	4.76	0.82	90.0	66.9

Valeurs obtenues à partir des résultats expérimentaux du traitement de solutions modèles de BSA et Lysozyme sur la résine Amberlite IRA 900, conditionnée dans l'eau ou dans l'huile.

Les valeurs en italique, négatives, sont aberrantes et attestent de l'inéquation au modèle.

Il apparaît que le modèle de Freundlich décrit mieux que le modèle de Langmuir les lois d'équilibres régissant la fixation de la BSA et du lysozyme sur la résine Amberlite IRA 900, qu'elle soit conditionnée dans l'eau ou dans l'huile. Les coefficients de corrélation linéaire ont des valeurs supérieures à 90 % avec ce modèle, ce qui n'est pas le cas pour le modèle de Langmuir. Dans le cas du conditionnement dans l'huile, les valeurs du coefficient de corrélation sont moins élevées, ce qui indique que le mécanisme de fixation n'est plus tout à fait le même, ou que la présence d'huile perturbe la fixation.

La déviation standard (Δq) entre les capacités de fixation données par les modèles et celles obtenues expérimentalement a également été calculée, selon la formule suivante :

$$\text{Equation IV. 1 : } \Delta q (\%) = 100 \times \sqrt{\frac{\sum [(q_t^{\text{exp}} - q_t^{\text{calc}}) / q_t^{\text{exp}}]^2}{N - 1}}$$

q_t^{exp} est la capacité de fixation obtenue expérimentalement (en mg.g^{-1} de résine)

q_t^{calc} est la capacité de fixation calculée par le modèle (en mg.g^{-1} de résine)

N est le nombre de valeurs expérimentales utilisées pour le calcul du modèle

Les valeurs obtenues pour la déviation standard par rapport aux modèles sont très importantes. Plus la concentration en protéines augmente, plus l'écart entre la valeur réelle mesurée de la capacité de fixation de la résine et la valeur théorique calculée augmente.

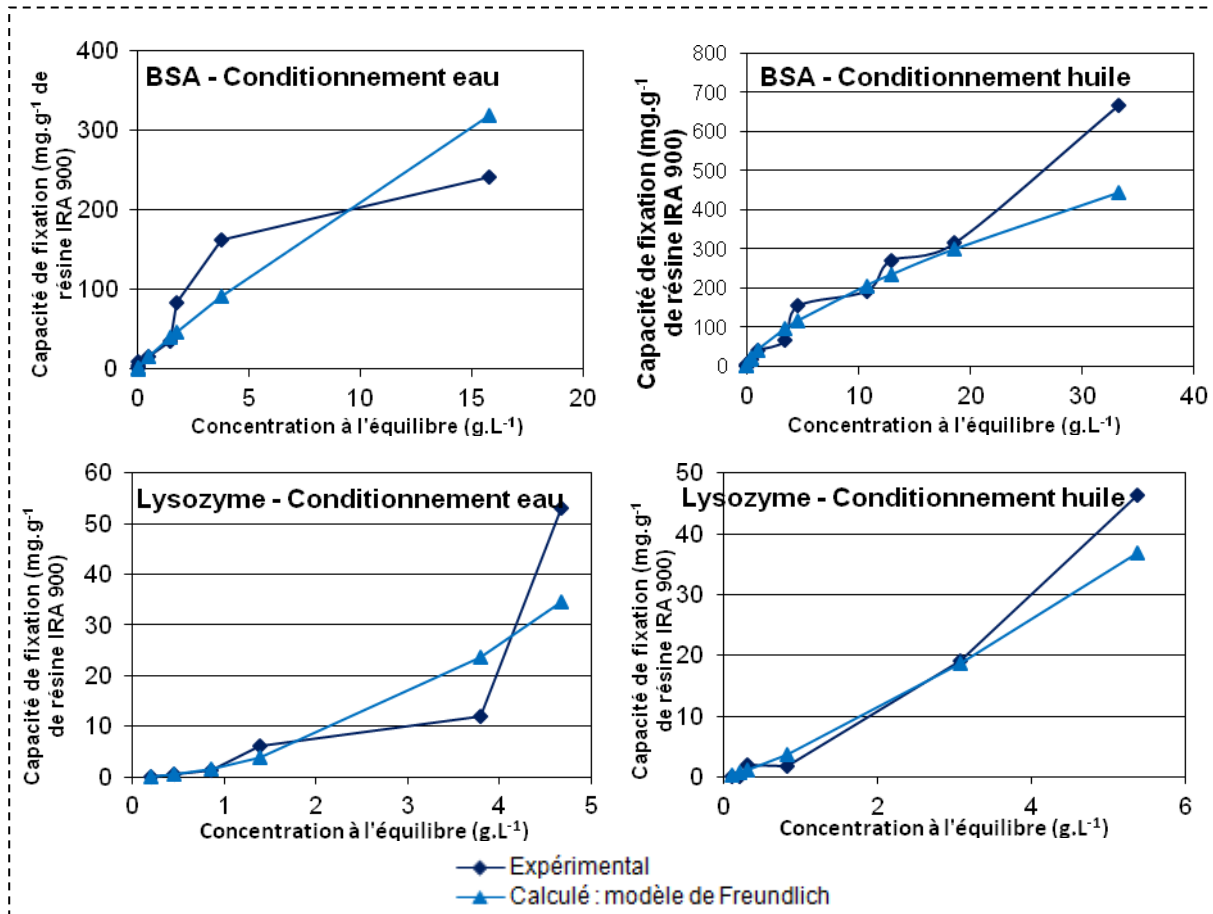


Figure IV. 14 : Comparaison des capacités de fixation de la résine Amberlite IRA 900 expérimentales et prédites par les modèles de Langmuir et Freundlich

Les coefficients obtenus sont différents entre les deux protéines, montrant un comportement différent des deux protéines (ou en tout cas de leur fixation). Les coefficients de partage sont différents, les valeurs de n obtenues sont également très différentes.

Le modèle s'adapte aux valeurs expérimentales, mais prédit mal l'évolution aux fortes concentrations. Les valeurs de la déviation sont néanmoins moins élevées pour le modèle de Freundlich, et ce, quelle que soit la protéine considérée ou le mode de conditionnement de la résine mis en œuvre.

Comme le modèle s'adapte mal aux fortes concentrations, le concept de la double couche d'adsorption peut être envisagé. Dans ce cas, les molécules s'adsorbent sur deux sites d'adsorption différents mais dépendants. Les molécules s'adsorbent par conséquent sur un nombre fixé de sites parfaitement définis, qui sont les ligands de l'échangeur. Lorsque ces premiers sites sont saturés, et pour des solutions concentrées, les molécules continuent à s'adsorber mais sur de nouveaux sites formés par les protéines déjà adsorbées et l'ensemble des ions présents (Chenou, 1993). Ainsi, des interactions entre les protéines adsorbées et celles en solutions entreraient en jeu, entraînant un changement de conformation des protéines.

Afin de vérifier cette théorie, il convient d'utiliser la représentation de Scatchard (Chenou, 1993). Cette représentation est utilisée afin d'obtenir une indication macroscopique concernant le type de coopération régissant la fixation d'une protéine. Lorsque le tracé de $Q_e/C_e = f(C_e)$ est une droite, l'isotherme suit le modèle de Langmuir. En revanche, si le tracé est hyperbolique, cela indique l'existence d'un effet de coopération positive entre les molécules, indiquant que l'adsorption des protéines n'est pas monocouche. La représentation graphique est présentée sur la **Figure IV. 15**.

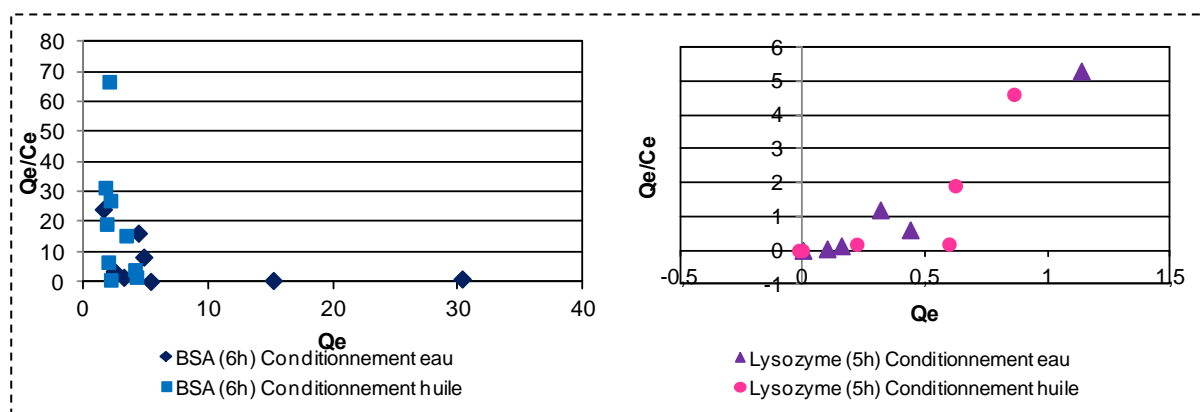


Figure IV. 15 : Représentations de Scatchard pour les isothermes d'adsorption de la BSA et du lysozyme sur la résine IRA 900

Des hyperboles apparaissent pour la BSA sur la résine conditionnée dans l'eau ainsi que pour le lysozyme dans le cas du conditionnement dans l'huile.

Il semblerait qu'il y ait une coopération entre les molécules, favorisant la formation d'interactions non spécifiques telles que des liaisons protéine/protéine, donnant naissance à l'apparition d'une double couche. Toutefois, le nombre de points expérimentaux dans le cas du lysozyme n'est pas suffisant pour la représentation de ce modèle.

II.4. Conclusions

L'objectif de cette étude était d'évaluer la faisabilité de l'utilisation des interactions hydrophobes pour la séparation des protéines de luzerne, en particulier la séparation des protéines hydrophiles et des protéines hydrophobes. Deux modes ont été envisagés : le mode fixation et le mode chromatographique.

Le mode fixation correspond à la saturation de la résine en protéines, puis à la séparation de ces protéines par le choix d'un éluant approprié. Deux fonctionnements étaient possibles :

- Fixation des protéines sur une résine conditionnée dans l'huile et élution à l'aide d'un éluant hydrophile
- Fixation des protéines sur une résine conditionnée dans de l'eau et élution avec un éluant hydrophobe : l'huile de tournesol

Les essais d'extraction liquide-liquide ont montré que l'huile végétale présentait une affinité équivalente pour les protéines, que ce soit pour les protéines utilisées comme modèles (lysozyme et BSA) ou pour les protéines de l'extrait de luzerne, similaire à celle de l'hexane et pouvait être envisagée comme éluant intéressant.

Les essais de fixation des protéines sur résine conditionnée dans l'eau ont montré qu'il était possible de fixer les protéines sur la résine IRA 900, mais il n'a pas été possible de définir si le mécanisme de fixation était de l'échange d'ions ou de l'adsorption. Les résultats obtenus avec la résine dans l'huile montrent des tendances très similaires aux résultats obtenus avec la résine conditionnée dans l'eau, semblant indiquer que le protocole de conditionnement ne modifie que très peu les propriétés de la résine.

D'après ces résultats, il semble que le mode chromatographique soit plus adapté à la séparation des protéines, en utilisant les interactions hydrophobes.

III. SEPARATION DES PROTEINES PAR CHROMATOGRAPHIE

A partir des données expérimentales obtenues dans le paragraphe précédent, il a pu être montré que le modèle de Freundlich permettait de décrire la fixation de la BSA et du lysozyme sur la résine Amberlite IRA 900. D'autres paramètres peuvent être calculés à partir des données expérimentales, de manière à décrire et modéliser au mieux le système.

III.1. Cinétique de transfert

III.1.1 Description

Trois étapes successives sont impliquées dans le procédé d'adsorption de solutés sur un matériau poreux tel que la résine :

- **Diffusion dans le film** : la solution d'alimentation est considérée comme ayant une concentration globale constante, car les protéines disponibles sous leur forme chargée sont présentes en excès. La protéine, devant se fixer sur le solide, doit traverser la couche limite par diffusion. Cette étape est appelée transfert externe. La vitesse de diffusion, indépendante de la nature de la résine, est proportionnelle à la concentration de la solution en soluté. L'épaisseur du film stagnant (δ) a également une influence sur la vitesse de diffusion et se définit comme l'inverse de la vitesse d'écoulement de la solution
- **Diffusion dans les pores de la résine** : La phase solide constituée par la résine est ici un milieu poreux. Les pores ou les espaces interstitiels, très étroits, ne permettent pas au fluide de circuler par convection. Ainsi, le soluté migre jusqu'au site d'échange par diffusion dans le liquide présent dans les pores. C'est le transfert interne
- **Adsorption du soluté à l'intérieur des pores** : Dans le cas de l'échange d'ions, il y a réaction chimique entre la protéine chargée et le contre-ion, lorsque le soluté atteint le site actif. Le contre-ion, à son tour, diffuse à travers le liquide interstitiel, puis à travers la couche limite. Dans le cas de la fixation par adsorption, il n'y a pas d'échange de contre-ion, donc pas de transport de celui-ci vers l'extérieur

Il est important de noter que les étapes de transfert externe et interne ne mettent pas en jeu l'interaction physico-chimique du soluté avec le solide, ce sont des étapes purement

physiques (*Rengaraj et Moon, 2002*). Dans la plupart des cas, l'échange d'ions est considéré comme un phénomène purement diffusif, car la réaction chimique d'échange est très rapide comparée aux phénomènes de diffusion.

Le passage des molécules à travers l'interface séparant le grain de la solution est généralement suffisamment rapide pour ne pas intervenir dans la vitesse d'échange (*Trémillon, 1965*). En revanche, la réaction de fixation ne peut pas toujours être négligée.

III.1.1.1 Diffusion dans le film autour de la résine

La solution est supposée homogène, sauf dans le film de liquide stagnant autour de la résine. A ce niveau, l'agitation ne se propage pas, et le transport de soluté échangé avec la résine s'effectue uniquement par diffusion.

Si ce film possède une épaisseur constante (δ) et que le gradient de concentration est

$$\text{constant : } \frac{dC_r}{dt} = \frac{3D}{r_0 \delta} (C_s - C'_s)$$

Avec C_s et C'_s , respectivement la concentration en soluté à l'instant t et la concentration en soluté à l'équilibre. C_r est la concentration dans la résine à l'instant t .

Ce modèle est décrit comme le modèle de Nernst

En supposant que la solution à l'interface est instantanément en équilibre avec solution dans la résine, on peut exprimer C_r en fonction de C'_s . Si la résine reste uniforme, il est possible d'écrire :

$$\begin{cases} t_{1/2} = 1.5 \frac{r_0 \delta}{D} \frac{V_s}{V_r} \\ t_{0.99} = \frac{0.23 r_0 \delta}{D} \frac{q_e}{C_0} \end{cases}$$

Avec V_s et V_r respectivement le volume de solution et de résine (mL).

Avec :

r_0 est le rayon d'une bille de résine (égal à 0.06 cm)

δ est l'épaisseur du film (égal à 10^{-3} cm d'après *Chabani et al., 2006*)

q_e est la quantité de protéines adsorbées (mg.g^{-1} de résine)

C_0 est la concentration initiale de la solution (mg.L^{-1})

$t_{1/2}$ est le temps de demi-réaction (s), correspondant au temps nécessaire pour que la moitié des sites de la résine soient occupés

$t_{0.99}$ est le temps nécessaire pour que 99 % des sites de la résine soient occupés (s)

D représente la diffusion dans le film autour de la résine ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)

III.1.1.2 Diffusion dans la résine

Dans le cas d'un soluté qui diffuse seul à l'intérieur d'un grain de résine, supposé homogène et sphérique de rayon r_0 , il est possible d'écrire :

$$\frac{\partial C_r}{\partial t} = D_p \left[\frac{\partial C_r}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_r}{\partial r} \right]$$

Avec :

C_r : concentration en soluté dans la résine (g.L^{-1} de résine)

r : variable spatiale, égale à 0 au centre de la bille (cm)

D_p : constante de diffusion du soluté dans le pore ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$)

A partir de cette équation, il est possible de définir :

$$\begin{cases} t_{1/2} = 0.03 \frac{r_0^2}{D_p} \\ t_{0.99} = 2.5 \frac{r_0^2}{D_p} \end{cases} \text{ avec } D_p = \frac{D}{2.5}$$

La diffusivité du soluté dans le pore (D_p) est plus faible que dans la solution libre. *Athalye et al.*, (1992) ont utilisé 2.5 car il permettait la simulation de leurs résultats.

III.1.2 Calcul des coefficients de diffusion

La détermination des coefficients de diffusion dans le film et dans la résine permet de déterminer si un des deux phénomènes constitue l'étape limitante du procédé d'adsorption sur la résine. La diffusion externe est limitée la fixation lorsque la valeur de D est comprise entre 10^{-8} et $10^{-6} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$, alors que la diffusion interne limite la vitesse de fixation lorsque la valeur de D_p , le coefficient de diffusion dans les pores de la résine, est compris entre 10^{-11} et $10^{-13} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ (*Chabani et al.*, 2006).

Le $t_{1/2}$ et $t_{0.99}$ des cinétiques de fixation sont déterminés graphiquement, et les valeurs obtenues sont présentées dans le **Tableau IV. 4**.

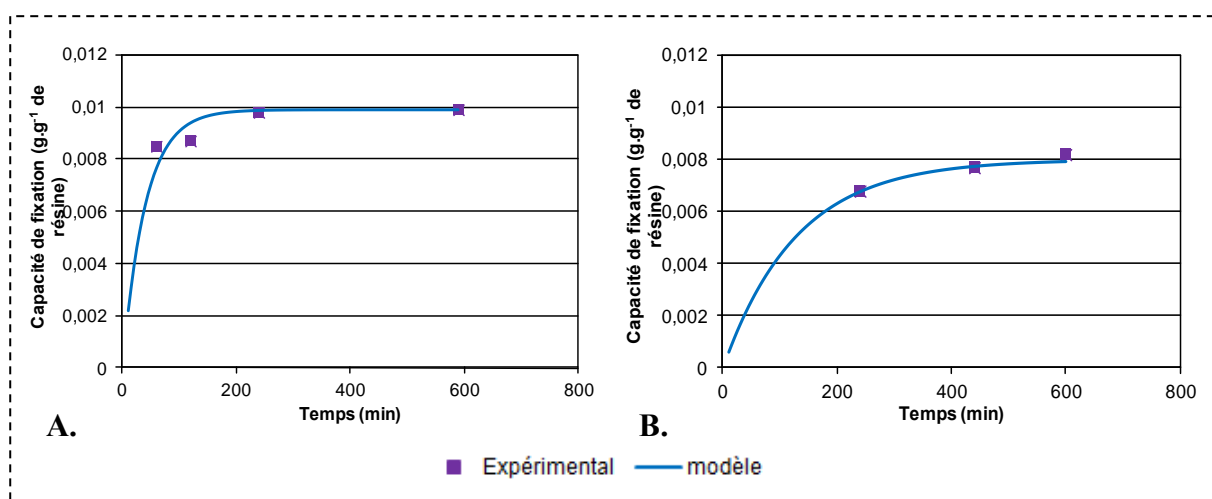
Tableau IV. 4 : Valeurs des coefficients de diffusion dans les pores et dans le film

	BSA				Lysozyme			
	$D_{1/2}$	$D_{0,99}$	$D_{P; 1/2}$	$D_{P; 0,99}$	$D_{1/2}$	$D_{0,99}$	$D_{P; 1/2}$	$D_{P; 0,99}$
Eau ¹	$5. 10^{-8}$	$9.5 10^{-12}$	$3 10^{-7}$	$6 10^{-7}$	$2.5 10^{-9}$	$1.4 10^{-11}$	3.10^{-8}	$6 10^{-7}$
Huile	$5. 10^{-8}$	$3 10^{-12}$	$3 10^{-7}$	$2.5 10^{-7}$	$3. 10^{-8}$	$4.4.10^{-9}$	$3.6. 10^{-8}$	$1.3.10^{-7}$
Eau ²	$5. 10^{-8}$	$9.5 10^{-12}$	$6 10^{-7}$	$2.5 10^{-7}$				

Les diffusivités ont été calculées à partir des données pour : ¹ la BSA à 1 g.L^{-1} et ² la BSA à 20 g.L^{-1} , et pour le lysozyme à 1 g.L^{-1}

D'après ces résultats, il apparaît que la diffusion dans le film formé autour de la bille de résine soit le facteur limitant de l'adsorption de la BSA et lysozyme sur la résine Amberlite IRA 900, et cela que la résine ait été conditionnée préalablement dans l'eau ou dans l'huile car les valeurs de diffusivité sont de l'ordre de $10^{-8} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$. La diffusivité du lysozyme est plus faible que celle de la BSA, mais surtout la diffusivité évolue au cours du temps, comme si la force motrice n'était pas la même entre la phase initiale et la phase finale de la cinétique. Ce résultat pourrait ainsi confirmer que le mécanisme de fixation change au cours du temps.

Afin de valider cette hypothèse, le modèle de diffusion externe a été utilisé pour calculer l'évolution de la concentration de protéine fixée. La diffusivité a été calculée afin de minimiser l'écart entre le modèle et les résultats expérimentaux. Les résultats sont présentés dans les **Figure IV. 16 A. et B.**

**Figure IV. 16 : Comparaison entre le modèle et les valeurs expérimentales pour la BSA (1 g.L^{-1})**

- A.** Résine conditionnée dans l'eau
B. Résine conditionnée dans l'huile

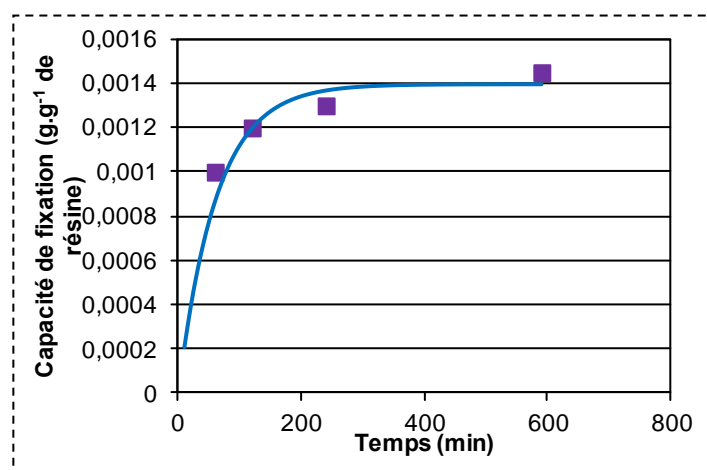


Figure IV. 17 : Comparaison entre le modèle et les valeurs expérimentales obtenues pour le lysozyme 1 g.L⁻¹ avec la résine conditionnée dans l'eau

Les résultats du modèle permettent une bonne simulation des résultats expérimentaux, dans les trois conditions, ce qui confirme que la diffusion externe est bien le phénomène qui limite la fixation des protéines sur la résine. Les valeurs de diffusivité utilisées dans chaque condition sont présentées dans le **Tableau IV. 5**.

Tableau IV. 5 : Comparaison des diffusivités calculées par le modèle et obtenues à l'aide de la formule de Tyn et Gusek

	Diffusivité BSA (cm ² .s ⁻¹)		Diffusivité Lysozyme (cm ² . s ⁻¹)	
	Eau	Huile	Eau	Huile
Modèle	6 10 ⁻⁹	2.5 10 ⁻⁹	5 10 ⁻⁹	2.5 10 ⁻⁹
Tyn et Gusek	5.5 10 ⁻⁷	7.5 10 ⁻⁸	8.4 10 ⁻⁷	1.1 10 ⁻⁶

Les valeurs du modèle sont celle obtenues à partir des solutions à 1 g.L⁻¹.

Ces valeurs de diffusivité peuvent être comparées à des valeurs calculées à partir de corrélations expérimentales. *Tyn et Gusek*, (1990) ont étudié le coefficient de diffusion de 86 protéines différentes, et ont proposé la corrélation suivante :

$$D_{AB} = 5.78.10^{-8} \frac{T}{\mu_0 R_g} \text{ avec } \begin{cases} R_g \text{ est le rayon de sphère équivalente (\AA)} \\ T \text{ est la température (K)} \\ \mu_0 \text{ est la viscosité de l'eau (cp)} \end{cases}$$

Les valeurs calculées à partir de cette corrélation, présentées dans le **Tableau IV. 5**, ont été calculées pour un rayon de BSA de 30.6 Å, du lysozyme de 16 Å, une viscosité dynamique à 20 °C de l'eau de 1 cp et de l'huile de 7.4 cp.

La comparaison indique que la diffusion dans la résine serait plus lente lors de nos essais, que ce qui est décrit dans la littérature. Il faut donc considérer que la diffusion est limitée par un autre phénomène, que nous n'avons pas identifié.

III.2. Cinétiques de sorption

Lors de l'écoulement du fluide, il est important de pouvoir décrire à quelle vitesse se déroulent les réactions d'échange, ainsi que de connaître la constante de vitesse de la réaction de sorption.

III.2.1 Modèles cinétiques de sorption

Certains modèles qui s'intéressent à la réaction chimique de sorption peuvent être fondés sur la capacité de fixation du solide (*Lagergren, 1898; Ho et McKay, 1999b*). D'autres se réfèrent aux concentrations du soluté en solution (*Bhattacharya et Venkobachar, 1984*). Ce type de modèle n'est toutefois applicable que lorsque la réaction de fixation est réversible, c'est-à-dire lorsque le soluté fixé sur le solide peut se désorber facilement.

Parmi eux, ce sont le modèle cinétique du pseudo-premier ordre de Lagergren et du pseudo-second ordre (*Lagergren, 1898, Ho et McKay, 1999b*) qui sont les plus couramment rencontrés dans la littérature.

Le modèle du pseudo-premier ordre de Lagergren est basé sur la capacité d'adsorption du solide :

$$\frac{dq_t}{dt} = k_1(q_e - q_t)$$

Avec :

q_e : capacité d'échange à l'équilibre (en mg.g^{-1} de résine)

q_t : capacité d'échange à l'instant t (en mg.g^{-1} de résine)

k_1 : constante de vitesse de la réaction de pseudo premier ordre (en min^{-1})

L'intégration de cette équation aux conditions limites, de $t = 0$ à $t = t$ et de $q_t = 0$ à $q_t = q_t$, donne une nouvelle équation linéarisable :

$$\log\left(\frac{q_e}{q_e - q_t}\right) = \frac{k_1}{2.303} t$$

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{k_1}{2.303} t$$

Le modèle cinétique du pseudo-second ordre, quant à lui, dépend plus largement de la réaction de sorption des solutés sur la phase solide.

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2(q_e - q_t)^2$$

Avec : k_2 , constante de vitesse de la réaction de pseudo second ordre ($\text{g.mg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)

L'intégration de cette équation aux conditions limites, de $t = 0$ à $t = t$ et de $q_t = 0$ à $q_t = q_t$, donne une équation qui est par la suite linéarisée.

$$\frac{1}{(q_e - q_t)} = \frac{1}{q_e} + k_2 t$$

Linéarisation :

$$\text{Etape 1 : } \frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$

$$\text{Etape 2 : } h = k_2 q_e^2$$

$$\text{Etape 3 : } \frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_e} t$$

Ainsi, la détermination de l'ordre de la réaction de sorption des protéines sur la résine est réalisée graphiquement, en traçant le $\log(q_e - q_t)$ en fonction du temps, pour une cinétique du pseudo-premier ordre, et de $\frac{t}{q_t}$ en fonction du temps, pour le pseudo-second ordre.

L'identification de l'ordre de la réaction permettra d'émettre des hypothèses quant à la réaction de sorption des protéines sur les résines étudiées.

III.2.1 Détermination expérimentale

Les deux modèles ont été évalués avec les résultats expérimentaux obtenus lors de la fixation en réacteur agité. Les courbes obtenues montrent que le modèle de Ho et Mac Kay est celui qui permet le mieux de décrire les résultats (**Figure IV. 18** et **Figure IV. 19**).

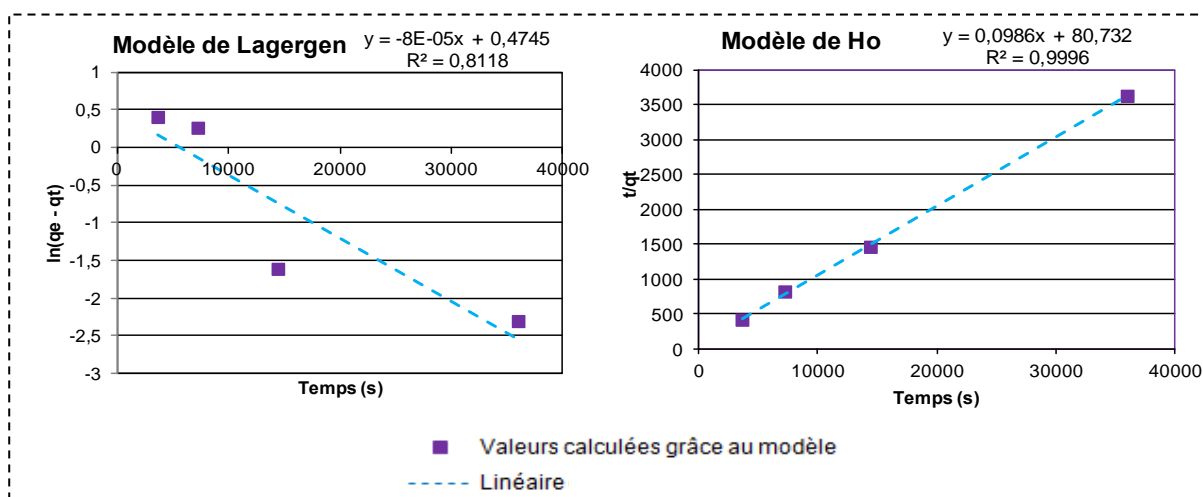


Figure IV. 18 : Détermination des paramètres des modèles de Lagergen et Ho par représentation graphique
(BSA à 1 g.L^{-1} , résine conditionnée dans l'eau)

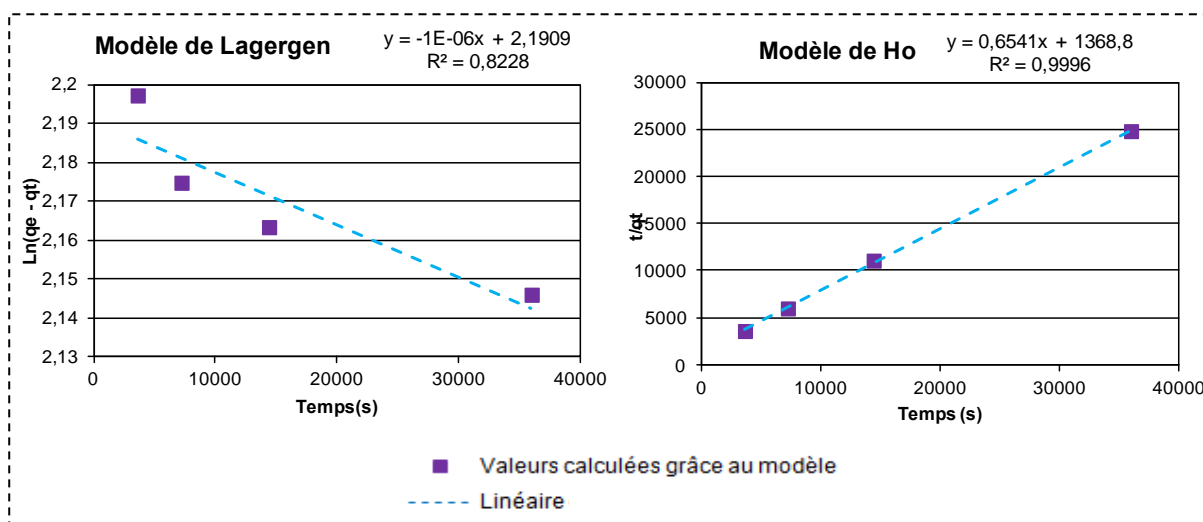


Figure IV. 19 : Détermination des paramètres des modèles de Lagergen et Ho par représentation graphique
(Lysozyme à 1 g.L^{-1} , résine conditionnée dans l'eau)

Dans tous les cas, le modèle de Ho et Mac-Kay permet d'obtenir une droite de régression linéaire ayant un coefficient de corrélation élevé, alors qu'il est de moins de 0,9 avec la corrélation de Lagergen. Ainsi, le modèle de Ho et Mack-Kay pourra être utilisé pour calculer la constante de vitesse de fixation des protéines sur le support.

III.3. Cinétique d'écoulement

III.3.1 Théorie de l'équilibre

La chromatographie répond à un phénomène de propagation d'onde de concentration. L'approche la plus utilisée pour décrire ce phénomène est l'écriture des équations de conservation de la matière.

Pour cela, les hypothèses suivantes sont établies :

- Écoulement piston, pas de dispersion hydrodynamique
- Équilibre réalisé en tout point et à tout instant

Si un bilan matière est établi sur un petit élément d'une colonne de chromatographie, traversée par un fluide dont le lit est de porosité ε constante, l'équation de conservation de matière sur une tranche de lit d'épaisseur dz et de surface S pendant un temps dt s'écrit :

$$\varepsilon_b \left(\frac{\partial C_m}{\partial t} + u_i \frac{\partial C_m}{\partial z} - D \frac{\partial^2 C_m}{\partial z^2} \right) = -(1 - \varepsilon_b) \frac{\partial C_s}{\partial t}$$

Avec :

C_s : concentration en soluté dans la phase stationnaire (dont le liquide dans les pores, en $g.L^{-1}$)

C_m : concentration dans la phase mobile (en $g.L^{-1}$)

u_i : vitesse interstitielle (en $cm.s^{-1}$)

D : coefficient de dispersion axial, qui tient compte de la diffusion et du mélange lié à l'écoulement autour des particules

ε_b : volume de vide interstitiel (en cm^3)

z : coordonnée axiale, à partir de l'entrée, (en cm)

Généralement cette équation est utilisée pour décrire la vitesse de sortie d'un composé. Mais comme cette vitesse dépend de la concentration de la molécule, la modélisation consiste à calculer la vitesse de déplacement d'un front de concentration défini.

Le transport du soluté dans une particule poreuse et sphérique s'écrit de la manière suivante :

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = \frac{D_p}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_p}{\partial r} \right) - f(C_p, C_{surf})$$

Avec :

C_p : concentration locale du soluté dans les pores (en $g.L^{-1}$)

D_p : diffusivité effective du soluté à l'intérieur des pores, (en $cm^2.s^{-1}$)

C_{surf} : concentration locale du soluté adsorbé dans la phase stationnaire à la surface des pores (en $g.L^{-1}$)

$f(C_p; C_{surf})$: fonction qui représente la vitesse locale de sorption dans la phase stationnaire

Les concentrations locales du soluté sont calculées par unité de volume, incluant à la fois la matrice solide et l'espace poreux intra-particulaire.

La cinétique d'adsorption est supposée linéaire et de la forme : $f(C_p; C_{surf}) = k_a (C_p - \frac{C_{surf}}{K_d})$

Avec :

k_a : constante de vitesse d'adsorption (en s^{-1})

K_d : coefficient de distribution, égal au rapport soluté adsorbé sur soluté non adsorbé.

Dans notre cas, où on suppose que la distribution est liée à l'affinité entre les deux solvants, ce coefficient est approximé au coefficient de partage huile/eau.

$$\text{Par intégration, on obtient } C_s = \frac{3}{4\pi R^3} \int_0^R (C_p + C_{surf}) 4\pi r^2 dr$$

Le lien entre la concentration du soluté dans la phase mobile à l'entrée des pores et dans la particule est donné par la relation : $-D_p \frac{\partial C_p}{\partial r} = k_c (\frac{1}{\epsilon_p} C_p - C_m)$, à $r = R$.

Les conditions initiales de la concentration en soluté sont :

$$C_m(z, t = 0) = \frac{m_0}{A_0 \epsilon_b} \delta(z) \text{ et } C_s(z, t = 0) = 0$$

Avec :

C_m : concentration en soluté de la phase mobile (en $g.L^{-1}$)

m_0 : masse de soluté déposé injecté comme pulse (en mg)

A_0 : section de la colonne (en cm^2)

$A_0 \epsilon_b$: section ouverte de la colonne (en cm^2)

Ces conditions représentent le cas d'une chromatographie différentielle où une injection courte est appliquée sur une colonne sans soluté. L'impulsion est représentée selon une fonction Dirac de $\delta(z)$.

$$\lim_{z \rightarrow \infty} C_m = \lim_{z \rightarrow \infty} C_s = 0 \text{ (infini ou grand)}$$

La solution des équations définies jusqu'ici est une fonction Gaussienne :

$$C_m(z, t) = \frac{m_0 x}{A_0 \epsilon_b \sqrt{2\pi H z_0}} \exp\left[-\frac{(z - z_0)^2}{2H z_0}\right]$$

Avec :

z : coordonnées axiale (en cm)

z_0 : position moyenne d'un pic de soluté au temps t (en cm)

u_i : vitesse interstitielle du fluide (en $cm.s^{-1}$)

x : fraction du soluté initial dans la phase mobile pour les temps longs, c'est-à-dire le rapport du soluté dans la phase mobile, par rapport à la quantité de soluté introduite (sans dimension)

H : hauteur étage théorique (en cm)

La fraction de soluté dans la phase mobile est calculée à partir de la fraction de vide extra-particulaire (ϵ_b), intraparticulaire (ϵ_p^*) et le coefficient de distribution K_d .

$$x = \frac{\epsilon_b}{\epsilon_b + (1 - \epsilon_b)\epsilon_p^*(1 + K_d)}$$

$$\epsilon_p^* = \frac{V_{R,i} - V_{R,0}}{V_{col} - V_{R,0}}$$

avec :

$V_{R,i}$: volume de rétention du composé considéré (en cm^3)

$V_{R,0}$: volume de rétention d'un composé exclu (en cm^3)

V_{col} : volume de colonne vide (en cm^3)

Etant donné que ϵ_p^* dépend de l'espèce considérée, puisqu'elle représente la fraction volumique de la phase stationnaire accessible à cette espèce, les caractéristiques d'exclusion stérique sont incluses. Les phénomènes d'adsorption sont considérés au niveau de K_d .

Les calculs ont été menés pour des molécules et des conditions expérimentales décrites dans le **Tableau IV. 6**.

Tableau IV. 6 : Données utilisées pour simuler les profils d'élution présentés Figure IV. 20

Caractéristiques	Données
Diamètre colonne (cm)	5
Longueur de colonne (cm)	30
Fraction de vide	0.38
Rétention volumique dextran (mL)	224
Débit de phase mobile ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	4.2
Masse de protéine introduite (mg)	25
HEPT	0.1

Les résultats montrent que la séparation de deux protéines de même masse molaire (et donc d'exclusion stérique équivalente), implique que le rapport des coefficients de partage soit supérieur à 20. Le calcul a été mené pour un volume de rétention de 250 mL.

Si le calcul est mené avec un volume de rétention de 250 mL pour la première protéine et de 280 mL pour la deuxième protéine (Cette différence simule la différence d'exclusion stérique liée à la taille), il ne faut plus alors qu'un rapport de coefficient de partage de 2.

Avec les coefficients obtenus pour la BSA et le lysozyme en extraction liquide/liquide, la séparation n'est pas possible, dans les conditions de simulation. Une représentation graphique est donnée sur la **Figure IV. 20**.

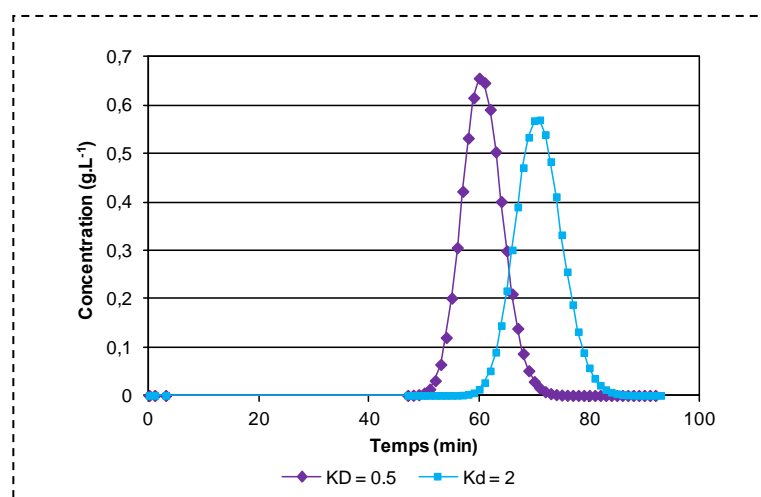


Figure IV. 20 : Représentation de l'élution de la BSA et du lysozome par modélisation
(KD et Kd sont les coefficients de partage de chacune des protéines. Coefficients permettant une bonne séparation)

Ce modèle reste néanmoins très simpliste et doit encore être amélioré au niveau du rapport entre volume de phase mobile et volume de phase déposée sur la résine. Dans ce modèle, ce volume est considéré comme étant égal au volume des pores, alors qu'il faudrait également considérer une partie du volume entourant les billes de résine.

Toutefois, le modèle démontre ainsi qu'il est possible de séparer les protéines par chromatographie de partage avec de l'huile. Des essais de séparation ont donc été conduits avec de l'extrait de luzerne.

III.3.2 Réacteur colonne : extraction des protéines de l'extrait centrifugé de luzerne

Plusieurs essais d'extraction des protéines de l'extrait de luzerne sur colonne ont été menés. Les extraits de luzerne utilisés ont été préalablement centrifugés et ultrafiltrés.

Les deux résines, IRA 900 et XAD4, conditionnées dans l'eau, ont été testées, car dans ce cas, la colonne est utilisée comme support de solvant et ne doit pas obligatoirement interagir avec les protéines. En cas d'interaction, cela peut favoriser la séparation, mais rendre l'élution beaucoup plus longue.

L'échantillon d'extrait de luzerne a été injecté en haut de colonne, puis élué grâce à de l'huile de tournesol. Afin de visualiser la sortie des protéines, il a été décidé de suivre l'évolution de l'absorbance des fractions récoltées, par spectrophotométrie, par rapport au témoin d'huile de tournesol brute. Toutefois, il n'a pas été possible de mettre en évidence des différences significatives de l'absorbance des échantillons, et donc de voir apparaître des pics

d'élution des protéines. Par conséquent, l'extraction des protéines contenues dans les fractions a été réalisée à l'hexane, de manière à pouvoir les injecter en HPLC-UV (huile et acétonitrile non miscibles). Cependant, la faible quantité de protéines éluées dans chaque fraction a rendu cette expérience impossible.

Nous avons donc uniquement suivi la composition protéique des toutes premières fractions récoltées en début de colonne (ne contenant pas d'huile, correspondant à l'échantillon injecté après son passage le long de la colonne), et en fin d'expérience, lors d'une élution avec NaCl (0.5 puis 1 mol.L⁻¹) afin de déterminer s'il restait des protéines sur la colonne.

III.3.2.1 Résine Amberlite IRA 900

Les principaux pics détectés au début de la fixation sur colonne sont comparés avec les 7 pics présents dans le chromatogramme du rétentat (solution injectée en haut de colonne). Sont également présentés les pics détectés lors de l'élution au NaCl. L'aire des pics est également indiquée dans le **Tableau IV. 7**, de manière à donner une représentation relative des concentrations entre les différents pics.

Tableau IV. 7 : Représentation des fractions récoltées après passage du rétentat sur colonne IRA900, élution à l'huile de tournesol puis NaCl

N° du pic Temps de rétention (min)	Fraction récoltée Volume d'élution							
	1 4 mL	2 8 mL	3 12 mL	4 16 mL	5 20 mL	6 24 mL	24 Elution NaCl 0.5 mol.L ⁻¹	25 Elution NaCl 1 mol.L ⁻¹
1 1.8	X 4.1	X 1.1	X 2.4	X 39.2	X 73.3	X 28.9	X 2.8	X 0.8
2 4.8	X 3.6			X 2.2		X 5.2	X 16.6	X 10.6
3 6.4								
4 6.7				X 1.2				
5 7.8			X 2.3		X 10.6	X 0.9	X 0.7	
6 8.8				X 2.0	X 1.6		X 0.9	
7 9.3								

X signifie qu'un pic correspondant au temps de rétention est détecté

Les valeurs présentées dans le tableau représentent l'aire des pics identifiés par HPLC-UV (en mAU*min)

La fraction protéique correspondant au pic 1 est la moins bien fixée, car elle ressort immédiatement de la colonne dès le début de l'expérience. Elle est présente en grande quantité dans le rétentat, car l'aire des pics observés est nettement plus importante que pour les autres protéines. En outre, elle est encore présente à la fin, lors de l'élution au NaCl, ce qui montre qu'elle est quand même retenue sur la colonne.

L'élution au NaCl ne permet pas de faire sortir des concentrations importantes de protéines, sauf pour le pic 1, signifiant qu'elles ont été en majorité éluées par l'huile de tournesol, ou ne peuvent être éluées par le NaCl. Enfin, si les pics 1 et 3 semblent être retrouvés dans chaque fraction récoltée, il n'en est pas de même pour le pic 4 (sortie uniquement dans l'échantillon 4), ou les pics 5 et 6 (qui ne ressortent plus en fin d'expérience), ou encore le pic 7 (présent dans le rétentat de départ, mais pas dans nos fractions, semblant montrer qu'il sera élué ultérieurement au cours de l'élution à l'huile de tournesol), qui semblent par conséquent pouvoir être séparés par la chromatographie. Il semble donc que la chromatographie pourrait permettre la séparation entre les protéines 3, 4 et 7 éluées par l'huile, et les protéines 1, 2, 5 et 6, semblant moins bien éluées par l'huile de tournesol.

Cependant, comme nous ne pouvons pas représenter la sortie des protéines entre l'échantillon 6 (à 24 mL de volume élué) et l'échantillon 24 (à 96 mL de volume élué), il est difficile de conclure.

III.3.2.2 Résine Amberlite XAD4

De la même manière, les principaux pics détectés au début de la fixation sur colonne sont comparés (**Tableau IV. 8**).

Tableau IV. 8 : Représentation des fractions récoltées après passage du rétentat sur colonne XAD4, élution à l'huile de tournesol puis NaCl

N° du pic Temps de rétention (min)	Fraction récoltée Volume d'élution							
	1 4 mL	2 8 mL	3 12 mL	4 16 mL	5 20 mL	6 24 mL	24 Elution NaCl 0.5 mol.L ⁻¹	25 Elution NaCl 1 mol.L ⁻¹
1 1.8	X 4.0	X 20.9	X 16.4				X 5.2	
2 4.8			X 0.5	X 6.0	X 5.5	X 4.5	X 5.3	X 3.1
3 6.4	X 0.4	X 1.3	X 1.7	X 2.9	X 4.4			
4 6.7		X 8.0	X 14.1	X 55.2	X 58.8	X 77.3	X 5.9	
5 7.8	X 0.3	X 9.2			X 17.0	X 26.7	X 3.3	X 1.0
6 8.8		X 1.0	X 2.4	X 1.5	X 4.7	X 11.9		
7 9.3								

X signifie qu'un pic correspondant au temps de rétention est détecté

Les valeurs présentées dans le tableau représentent l'aire des pics identifiés par HPLC-UV (en mAU*min)

Nous constatons la présence de beaucoup plus de pics au tout début de l'élution à l'huile de tournesol, montrant que les protéines sont bien moins fixées sur la résine XAD4 que sur la résine IRA 900, confirmant nos essais préalables. Les protéines semblent être séparées par la porosité de la résine. Ainsi, les protéines 2, 4 et 6, éluées plus lentement, seraient plus petites que les autres. Ces protéines sont très abondantes dans la fraction 6, et faiblement concentrées à la fraction 24, voire indétectable pour la protéine 6. Il apparaît donc que l'élution à l'huile a effectivement séparé ces molécules.

L'élution avec l'huile de tournesol semble plus rapide avec la résine XAD4 qu'avec la résine IRA 900. La première est donc plus adaptée à ce type de séparation.

IV. CONCLUSIONS

Il a été montré que c'est la diffusion externe qui limite la fixation des protéines sur la résine IRA 900, mais qu'un phénomène non identifié semble limiter cette diffusion. Les protéines ne se fixent pas uniquement sur les sites actifs.

Un effet de coopération entre les protéines apparaît, donnant naissance à de nouveaux sites de fixation sur la résine et créant un phénomène de multicouches. Néanmoins, de nouveaux essais expérimentaux seraient nécessaires pour la vérification de cette hypothèse. Les études des mécanismes de fixation ont été menées pour chacune des protéines modèles, séparément. Des essais sur un mélange de ces deux protéines, ayant une affinité très différente pour l'huile de tournesol, nous apporteraient des informations complémentaires, et seraient une nouvelle étape vers la modélisation du comportement de la fixation des protéines de l'extrait de luzerne. En effet, il s'agit d'une solution très complexe, mettant en jeu non seulement des interactions entre protéines, mais aussi avec d'autres composés, comme les saponines par exemple, entraînant la formation d'émulsion et venant par conséquent complexifier un peu plus les mécanismes.

Il n'est pas apparu de différence significative dans le mode de fixation des protéines, en conditions hydrophobes ou hydrophiles. Ainsi, il a été envisagé de mener la séparation par chromatographie en éluant les protéines fixées sur résine hydrophile avec de l'huile.

Même s'il n'a pas été possible de mettre en évidence la réalité d'une séparation entre les protéines de l'extrait de luzerne par chromatographie, nous avons pu montrer que des protéines sont effectivement fixées par la résine, puisqu'elles ne sont pas éluées au début de la mise en œuvre de la chromatographie, ou pas entièrement en tout cas. L'élué au NaCl permettant la détection d'un nombre limité de pics dans les fractions tend à démontrer que les autres composés protéiques ont bien été élués par l'huile de tournesol.



CHAPITRE V

PARTIE EXPERIMENTALE

SOMMAIRE

I. DETERMINATIONS ANALYTIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES : CARACTERISATION DE LA MATIERE PREMIERE.....	- 216 -
I.1. Teneur en eau	- 216 -
I.2. Teneur en matières minérales et en matières organiques	- 216 -
I.3. Teneur en composés hydrosolubles.....	- 217 -
I.4. Dosage et caractérisation des protéines	- 217 -
I.4.1 Teneur globale en protéines.....	- 217 -
I.4.2 Séparation entre protéines « hydrophiles et protéines « hydrophobes ».....	- 218 -
I.4.3 Analyse de la composition en acides aminés des extraits.....	- 219 -
I.4.3.1 Préparation des hydrolysats de protéines	- 219 -
I.4.3.2 Chromatographie d'échange ionique	- 219 -
I.4.4 Quantification de la teneur en protéines d'extraits liquides par HPLC-UV	- 220 -
I.5. Détermination de la teneur en lipides	- 221 -
I.5.1 Détermination de la teneur en lipides totaux des échantillons solides	- 221 -
I.5.2 Détermination de la teneur en lipides totaux des échantillons liquides.....	- 222 -
I.6. Teneur en constituants pariétaux des solides	- 223 -
I.6.1 Attaque NDF.....	- 224 -
I.6.2 Attaques ADF	- 224 -
I.7. Teneur en sucres.....	- 225 -
I.8. Teneur en chlorophylle	- 226 -
I.8.1 Protocole d'extraction de la chlorophylle.....	- 226 -
I.8.2 Mesure de la longueur d'onde au spectrophotomètre d'absorption	- 226 -
I.9. Observations structurales	- 227 -
I.10. Mesure du taux de gonflement.....	- 227 -
I.11. Mesure du taux d'absorption.....	- 227 -
II. MISE EN ŒUVRE DE L'EXTRUDEUR BI-VIS.....	- 229 -
II.1. Description de l'extrudeur bi-vis utilisé.....	- 229 -
II.2. Mise en œuvre de l'extrudeur	- 230 -
II.2.1 Introduction de luzerne.....	- 230 -
II.2.2 Déroulement d'un essai	- 230 -
II.2.3 Détermination de la répartition massique de solide dans la machine.....	- 231 -
II.2.4 Conditions opératoires des essais effectués	- 232 -
II.3. Analyses statistiques.....	- 233 -

III. TRAITEMENT DE LA LUZERNE EN REACTEUR AGITE.....	- 234 -
III.1. Types de mobiles d'agitation.....	- 234 -
III.1.1 Ultra-Turrax.....	- 234 -
III.1.2 Emulsificateur Silverson	- 234 -
III.1.3 Mixeur-hachoir	- 235 -
III.1.4 Essais effectués	- 235 -
III.2. Echantillonnage et détermination de la teneur en protéines	- 235 -
IV. MISE EN ŒUVRE DE L'UTRAFILTRATION.....	- 236 -
IV.1. Traitement de la solution en mode recirculation.....	- 236 -
IV.2. Traitement de la solution en mode concentration	- 237 -
IV.3. Calcul de la vitesse tangentielle.....	- 238 -
V. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS SUR RESINES.....	- 239 -
V.1. Propriétés des résines	- 239 -
V.2. Conditionnement des résines.....	- 239 -
V.3. Fixation des protéines sur résine en réacteur agité	- 241 -
V.4. Extraction des protéines sur colonne d'échange d'ions.....	- 241 -
VI. DESCRIPTION DES LOTS DE LUZERNE UTILISES	- 242 -

I. DETERMINATIONS ANALYTIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES : CARACTERISATION DE LA MATIERE PREMIERE

I.1. Teneur en eau

La teneur en eau de la plante de départ et des différentes fractions obtenues au cours du procédé de fractionnement est déterminée selon la norme NF V 03-903. Il s'agit de mesurer la perte d'eau de l'échantillon après mise à l'étuve à 103 ± 2 °C au moins 12 h, jusqu'à l'obtention d'une masse constante. La teneur en eau de l'échantillon, ou humidité, notée H est exprimée en pourcentage massique selon la formule suivante :

$$H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 est la tare de la coupelle (en g)

m_1 est la masse de la coupelle et de l'échantillon avant mise à l'étuve (en g)

m_2 est la masse de la coupelle et de l'échantillon après séchage à 103 °C jusqu'à poids constant (en g)

La matière sèche de l'échantillon, notée MS et exprimée également en pourcentage massique, peut être déduite de la teneur en eau de la manière suivante :

$$MS = 100 - H = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

I.2. Teneur en matières minérales et en matières organiques

La teneur en matières minérales de la plante de départ et des différentes fractions est déterminée selon la norme française NF V 03-322. Le résidu résultant de la calcination de l'échantillon dans un four à 550 °C jusqu'à masse constante est pesé. La teneur en matières minérales, notée MM est exprimée en pourcentage massique, et est obtenue selon la formule suivante :

$$MM = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 est la tare de la coupelle (en g).

m_1 est la masse du creuset et de l'échantillon avant calcination (en g).

m_2 est la masse du creuset et du résidu après calcination à 550 °C, jusqu'à poids constant (en g).

I.3. Teneur en composés hydrosolubles

Le pourcentage massique d'hydrosolubles dans l'échantillon est déterminé en pesant 1 g de matière, dont la teneur en matière sèche est connue, dans un fritté spécial de porosité 2, adaptable à un système Tecator Fibertec M2. De l'eau déminéralisée est ajoutée dans chaque fritté (100 mL), puis portée à ébullition pendant 1 h. L'eau est alors filtrée puis l'échantillon dans le fritté est placé à l'étuve à 103 °C pendant 12 h minimum, jusqu'à masse constante. La teneur en composés hydrosolubles dans l'échantillon est alors déterminée grâce à la formule suivante :

$$\% \text{ Hydrosolubles} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 est la tare du fritté de porosité 2 (en g).

m_1 est la masse du fritté contenant l'échantillon avant solubilisation dans l'eau (en g).

m_2 est la masse du fritté contenant le résidu et séché jusqu'à masse constante à 103 °C (en g).

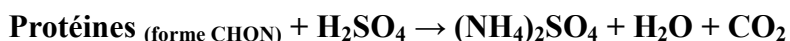
I.4. Dosage et caractérisation des protéines

I.4.1 Teneur globale en protéines

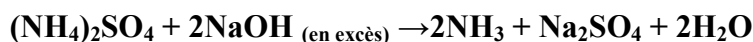
La teneur en protéines brutes est déterminée selon la méthode Kjeldahl, répondant à la norme française NF V 18-100. Le principe de la mesure repose sur la minéralisation de l'azote organique contenu dans l'échantillon en azote minéral, sous forme d'ammoniac. L'ammoniac formé est alors dosé, et la teneur en azote total obtenue est multipliée par un facteur de conversion (égal à 6.25 pour les Fabacées, *FAO, Methods of Food Analysis*), afin d'obtenir la teneur en protéines brutes de l'échantillon de départ. Ce facteur empirique tient compte de la masse molaire moyenne des acides aminés des protéines à quantifier.

L'échantillon de départ (de 0.5 à 1.5 g selon la teneur supposée en protéines), préalablement séché à l'étuve à 103 °C jusqu'à masse constante dans le cas d'un solide, est minéralisé par ajout d'acide sulfurique concentré (12.5 mL). La réaction est catalysée par deux pastilles Kjeltabs CK [3.5 g K_2SO_4 + 0.4 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$] AA17. La minéralisation est effectuée à 400 °C sur le Tecator Digestor 2020, pendant une heure et demie.

Réaction de minéralisation avec l'acide sulfurique concentré :



Les produits de la réaction de minéralisation sont alcalinisés par une solution de soude à 40 %, comme décrit ci-dessous, l'ammonium étant converti en ammoniac :



Le produit est ensuite refroidi, puis l'ammoniac est entraîné par distillation à la vapeur de manière automatique à l'aide d'un appareil Tecator Kjeltac 2200, dans une fiole contenant de l'acide borique à 4 %, formant alors un complexe d'ammonium borate. La solution d'acide borique contient un mélange d'indicateurs colorés : rouge de méthyle et vert de bromocrésol, ce qui permet la titration de l'ammoniac par une solution d'acide chlorhydrique à 0.1 N.



La teneur en protéines de l'échantillon, notée P et exprimée en pourcentage massique, est déterminée grâce à la formule suivante :

$$P = 6.25 \times \frac{M_N \times C \times (V_1 - V_0) \times 10^{-3}}{m} \times 100$$

M_N est la masse molaire de l'azote (= 14.007 g.mol⁻¹)

C est la concentration de la solution d'acide chlorhydrique (en mol.L⁻¹)

V_1 est le volume d'acide chlorhydrique ajouté pour la titration (en mL)

V_0 est le volume d'acide chlorhydrique utilisé pour un échantillon blanc (en mL)

m est la masse de l'échantillon quantifié (en g)

I.4.2 Séparation entre protéines « hydrophiles et protéines « hydrophobes »

Les protéines hydrophiles, dites « protéines blanches » sont séparées des protéines hydrophobes, dites « protéines vertes », par précipitation avec du sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄, à différentes concentrations. Cette technique met en œuvre la différence de solubilité des deux types de protéines dans le sulfate d'ammonium. En effet, la modification de la force ionique de la solution permet la précipitation des protéines. Ainsi, les protéines hydrophobes précipitent dans un milieu saturé à 27 %, tandis que les protéines hydrophiles précipitent à 55 % de saturation.

L'augmentation de la force ionique dans une solution permet la neutralisation de certaines charges ioniques à la surface des protéines responsables du maintien de la solubilité. En outre, il y a apparition d'un phénomène de compétition avec les protéines, ce qui prive ces dernières de molécules d'eau assurant leur hydratation, entraînant leur précipitation. Ce phénomène est appelé salting-out.

D'après les tables élaborées par *Di Jeso*, (1968) il faut ajouter 15 g de sulfate d'ammonium pour 100 mL de jus de luzerne pour atteindre 27 % de saturation. La solution est mise sous agitation magnétique pendant une heure. Elle est ensuite centrifugée 20 min à 5000 g et 20 °C. Le culot constitue la fraction de protéines vertes. Le surnageant est récupéré. Puis est saturé à 55 % par ajout de 17 g de sulfate d'ammonium pour 100 mL de surnageant. Après une heure d'agitation, une nouvelle centrifugation à 5000 g pendant 20 min à 20 °C est menée. Elle permet la récupération des protéines blanches dans le culot.

I.4.3 Analyse de la composition en acides aminés des extraits

La détermination de la composition en acides aminés est effectuée par chromatographie échangeuse d'ions, permettant la séparation des acides aminés libres, provenant de l'hydrolyse des protéines des échantillons.

I.4.3.1 Préparation des hydrolysats de protéines

Avant l'analyse chromatographique, l'échantillon doit être hydrolysé de manière à casser les liaisons peptidiques entre les acides aminés des protéines. Une quantité connue d'échantillon est placée dans un tube d'hydrolyse en verre épais, dans lequel est ajouté de l'acide chlorhydrique (5.7 M) à ébullition constante, selon un rapport de 1 mL d'acide pour 10 mg de protéines. Le tube contenant l'échantillon est ensuite purgé avec de l'azote sans oxygène, jusqu'à ce que tout l'oxygène ait été chassé du tube. Celui-ci est ensuite scellé et placé à 110 °C pendant 24 h. Après cette période, le tube est retiré et l'échantillon est déshydraté à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'échantillon est ensuite dilué en utilisant une quantité connue de tampon de chargement de pH 2.2, puis filtré sur une membrane de porosité 0.2 µm.

I.4.3.2 Chromatographie d'échange ionique

Les acides aminés contenus dans les hydrolysats sont séparés par chromatographie d'échange d'ions, par élution avec différents solvants sur une installation Biochrom 30 Amino Acids Analyser équipée d'un module fluide, d'un injecteur automatique et d'un logiciel d'acquisition EZChrome Elite.

La détection des acides aminés est possible grâce à un réactif révélateur : la ninhydrine, qui se colore en violet lors de la formation d'un complexe avec les acides aminés. Dans le photomètre, la quantité de chaque composé coloré est déterminée en mesurant la quantité de lumière absorbée à 570 nm pour la plupart des acides aminés, et à 440 nm pour la

proline et l'hydroxyproline. Les deux détecteurs sont situés sur deux canaux différents (à 570 et 440 nm).

Tableau V. 1 : Paramètres HPLC pour le dosage des acides aminés

Paramètre	Détails
Colonne haute pression PEEK avec système de régulation de température	Résine d'échange de cations Ultrapac 8, forme sodium Longueur : 200 mm Diamètre interne : 4.6 mm
Pression dans la colonne	71 bar
Température	Four : 135 °C
Débit	35 mL.h ⁻¹ pour les tampons, 25 mL.h ⁻¹ pour la ninhydrine
Eluants	Tampons Citrate de sodium (pH 2.65, 3.35, 4.25) Tampons borate/citrate de sodim (pH 8.6) Tampon de dilution : citrate de sodium (pH 2.2) Ninhydrine
Volume d'injection	20 µL
Détection	Photomètre, lampe tungstène halogène 20 W 440 et 570 nm
Régénération de la colonne	Base forte puis solution tampon

I.4.4 Quantification de la teneur en protéines d'extraits liquides par HPLC-UV

Les analyses sont effectuées sur une chaîne Dionex, constituée d'un injecteur (ASI-100 Automated Sample, Dionex) et d'un passeur automatique, d'une pompe (P680 HPLC Pump, Dionex) ainsi que d'un détecteur UV-visible à barrette de diodes (D34DU, Dionex). La colonne est placée dans une boîte thermostatée à 20 °C.

L'acquisition des données et le traitement des résultats sont permis par le logiciel Chroméléon 6-60-508 Build 1544 (Dionex).

Les paramètres de chromatographie, décrits dans le tableau suivant, ont été déterminés et optimisés à partir de données de la littérature (*Wang et al., 2009*), et adaptés pour les protéines quantifiées dans cette thèse (Lysozyme, Bovine Serum Albumine, Rubisco, protéines dites « vertes » de luzerne).

Tableau V. 2 : Paramètres HPLC pour le dosage des protéines en phase inverse

Paramètre	Détails
Colonne ACI 221 2546	Apolaire C18 Longueur : 25cm Diamètre interne : 4.6 mm
Pression dans la colonne	150 bars
Température	30 °C
Débit	1.5 mL.min ⁻¹
Eluant	Solvant A : acétonitrile + 0.1 % d'acide formique Solvant B : eau milliQ + 0.1 % d'acide formique
Volume d'injection	10 µL
Longueur d'ondes	280 et 214 nm
Gradient d'élution	100 % d'acétonitrile à 5 mL.min ⁻¹

Un programme de quantification se basant sur la taille des pics du chromatogramme et sur la réalisation d'une gamme étalon est élaboré pour chacune des protéines témoins.

I.5. Détermination de la teneur en lipides

Deux protocoles différents ont été employés pour la détermination de la teneur en lipides, selon la nature de l'échantillon. Ainsi, la teneur en lipides totaux des échantillons de nature solide a été quantifiée par extraction accélérée par cyclohexane, à l'aide d'un appareil Dionex ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor), tandis que la teneur en lipides des solutions a été évaluée par extraction liquide/liquide à l'aide d'un mélange constitué de chloroforme et de méthanol (*Bligh et Dyer, 1959*).

I.5.1 Détermination de la teneur en lipides totaux des échantillons solides

La teneur en lipides totaux des échantillons est évaluée grâce à une extraction accélérée au cyclohexane, à l'aide d'un appareil Dionex ASE 200 (Accelerated Solvent Extractor). L'extraction accélérée par solvant est une méthode entièrement automatisée, appliquant une température et une pression élevées. La température dans le four est élevée, afin d'accélérer la cinétique d'extraction. Une pression importante est appliquée, de manière à maintenir le solvant sous forme liquide durant le procédé d'extraction. Les conditions de fonctionnement sont programmées sur l'appareil :

- 4 cycles d'extraction de 10 min
- Pression au sein de la cartouche : 70 bar

- Température du four : 105 °C
- Réintroduction automatique de solvant propre dans la cartouche avant chaque cycle

Cette méthode a l'avantage d'être rapide et de nécessiter une faible quantité d'échantillon et de solvant par rapport à d'autres techniques comme l'extraction par Soxhlet par exemple.

Néanmoins, afin d'éviter tout risque de détérioration de l'appareillage, il est impératif de sécher au préalable l'échantillon à analyser jusqu'à une teneur en eau et en matières volatiles inférieure à 5 % environ. L'échantillon est introduit dans une cellule contenant un filtre, percée de deux orifices. La cellule est ensuite chauffée et pressurisée : le solvant passe à travers elle, permettant l'extraction de la fraction lipidique. Les cartouches récupérées en fin d'analyse contiennent du cyclohexane et la fraction lipidique extraite. Leur contenu est introduit dans un ballon préalablement taré, puis le cyclohexane est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le ballon est placé à l'étuve à 103 °C jusqu'à masse constante, afin d'éliminer les dernières traces de cyclohexane. Le ballon est pesé, de manière à obtenir la masse de l'extrait lipidique.

I.5.2 Détermination de la teneur en lipides totaux des échantillons liquides

La teneur en lipides des échantillons de nature liquide est déterminée selon la méthode de Bligh et Dyer (1959). Il s'agit de mettre en contact l'échantillon avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1). La solution obtenue est alors agitée pendant 15 min, puis du chloroforme est rajouté à la solution, et l'échantillon est à nouveau agité, avant d'être centrifugé pendant 5 min, sous 3000 g à 20 °C sur une centrifugeuse discontinue (Sigma 6K15). La phase lipidique inférieure est récoltée à l'aide d'une pipette Pasteur, à travers le disque protéique formé à sa surface. Cette phase est introduite dans un ballon taré, et le solvant est évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le ballon est enfin placé à l'étuve à 103 °C jusqu'à masse constante, de manière à éliminer les dernières traces de solvant. Le ballon est pesé, de manière à obtenir la masse de l'extrait lipidique.

La teneur en lipides totaux (notée L_T) est donnée par la formule suivante :

$$L_T = \frac{m_2 - m_0}{m_1} \times 100$$

m_0 est la tare du ballon (en g)

m_1 est la masse de l'échantillon de départ (en g)

m_2 est la masse du ballon et de l'extrait lipidique après séchage (en g)

1.6. Teneur en constituants pariétaux des solides

La teneur en cellulose, hémicelluloses et lignines est estimée par la méthode de Van Soest (*Van Soest, 1963, Van Soest et Wine, 1968*). Le principe repose sur la différence de solubilité de chacun des constituants pariétaux dans deux détergents différents.

La matière végétale subit deux attaques différentes. Lors de l'attaque NDF (Neutral Detergent Fiber), un détergent neutre à base d'EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) solubilise l'ensemble des constituants non pariétaux (protéines, pectines, sucres, ...). Le résidu insoluble résultant de cette attaque est constitué de matière minérale et de matière organique regroupant les constituants suivants : cellulose, hémicelluloses et lignines. L'attaque ADF (Acid Detergent Fiber) est en réalité divisée en deux attaques successives. Lors de la première attaque, le détergent acide, à base de bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB) et d'acide sulfurique dilué, solubilise l'ensemble des constituants non pariétaux, mais aussi les hémicelluloses. La fraction organique du résidu obtenu est ainsi constituée de lignines et de cellulose. Une seconde attaque acide sur le résidu permet la solubilisation des lignines par action de permanganate de potassium. La fraction organique du nouveau résidu contient donc uniquement la cellulose.

Notées respectivement H, L et C, les teneurs en hémicelluloses, lignines et cellulose sont exprimées en pourcentage massique et peuvent par conséquent être déterminées grâce à la combinaison de ces deux méthodes, selon les principes suivants :

Attaque NDF : Matière \longrightarrow H + L + C

Première et deuxième attaques ADF : Matière \longrightarrow L + C \longrightarrow C

Les échantillons doivent être préalablement séchés afin qu'ils aient une matière sèche supérieure ou égale à 85 % et réduits sous forme de poudre homogène (de 0.8 à 1 g par prise

d'essai). Les attaques sont effectuées dans des frittés spéciaux, de porosité 2, qui s'adaptent au système Fibertec M2, permettant d'effectuer l'ensemble du traitement des échantillons sans changer les récipients.

I.6.1 Attaque NDF

L'attaque NDF est menée à chaud sur l'appareil Fibertec system M-Hot extractor. 100 mL de réactif composé de sodium lauryl sulfate, d'EDTA, de phosphate disodique, de borate de sodium décahydrate et d'éthylène glycol monoéthyléther sont ajoutés à l'échantillon. Après une heure de mise en contact à ébullition, les réactifs sont éliminés par aspiration et le résidu est abondamment rincé à l'eau bouillante. Les frittés sont ensuite placés à l'étuve à 103 °C pendant douze heures minimum. Ils sont ensuite pesés, puis les résidus sont calcinés dans un four à 550 °C pendant 3 h. La teneur en constituants pariétaux totaux peut être déterminée grâce à la formule suivante :

$$H + L + C = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 est la tare du fritté (g)

m_1 est la masse du fritté et de l'échantillon avant attaque NDF (g)

m_2 est la masse du fritté et du résidu après attaque NDF et séchage à l'étuve (g)

m_3 est la masse du fritté et du résidu après calcination (g)

I.6.2 Attaques ADF

La première attaque ADF est effectuée à chaud, également à l'aide de l'appareil Fibertec system M-Hot extractor. 100 mL de réactif constitué de CTAB et d'acide sulfurique dilué sont ajoutés à l'échantillon à analyser. Après une heure à ébullition, les réactifs sont éliminés par aspiration et le résidu est abondamment rincé à l'eau bouillante. Les frittés sont ensuite placés à l'étuve à 103 °C pendant au moins 12 h. Ils sont ensuite réutilisés pour la seconde attaque ADF, qui permet la solubilisation de la lignine encore contenue dans les échantillons traités.

La seconde attaque ADF est menée à froid sur l'appareil Fibertec system M-Cold extractor par ajout au résidu de 25 mL d'un mélange d'une solution saturée de permanganate de potassium (50 g.L⁻¹) et d'une solution tampon constituée de nitrate de fer, de nitrate d'argent, d'acide acétique glacial, d'acétate de potassium et d'alcool butyrique tertiaire (2:1). Le réactif est laissé en contact avec l'échantillon pendant 1 h 30 puis il est éliminé par aspiration et rincé à l'aide d'une solution déminéralisante composée d'acide oxalique dihydraté, d'éthanol et d'acide chlorhydrique. Les fibres prennent alors une coloration

blanche. Deux lavages à l'éthanol et deux rinçages à l'acétone précèdent le séchage du résidu cellulosique à l'étuve à 103 °C pendant 12 h puis sa calcination dans un four à 550 °C (pour éliminer toute la matière organique) pendant 3 h. Les frittés sont pesés après chaque séchage à l'étuve, et également après calcination, de manière à pouvoir déterminer grâce aux formules présentées ci-dessous, les teneurs en cellulose et en lignines.

$$L + C = \frac{m_2 - m_4}{m_1 - m_0} \times 100 \text{ et } C = \frac{m_3 - m_4}{m_1 - m_0} \times 100 \text{ d'où } L = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100$$

m_0 est la tare du fritté (g)

m_1 est la masse du fritté et de l'échantillon avant attaque ADF (g)

m_2 est la masse du fritté et du résidu après l'attaque à chaud et le séchage à l'étuve (g)

m_3 est la masse du fritté et du résidu après l'attaque à froid et le séchage à l'étuve (g)

m_4 est la masse du fritté et du résidu après calcination (g)

1.7. Teneur en sucres

La détermination de la teneur en sucres des échantillons est effectuée par HPLC, après hydrolyse des sucres.

De 0.5 à 2 g d'échantillon (séchés dans le cas d'un solide) sont placés dans un tube à vis, dans lequel sont ajoutés 1.25 mL d'acide chlorhydrique à 72 %. Après 30 min d'imprégnation à température ambiante, les tubes sont placés dans un bain d'huile à 100 °C, pour hydrolyse, pendant 90 min. A la fin de la durée de l'hydrolyse, la réaction est stoppée en refroidissant immédiatement le tube sous un jet d'eau froide, et en neutralisant la solution à l'aide de soude à 32 %. La solution est ensuite filtrée (filtres de 0.45 µm), puis 500 mg sont dilués dans des fioles de 25 mL.

La teneur en sucres des solutions est déterminée par HPLC sur un système Dionex DX300, grâce à un étalonnage à l'aide de solutions synthétiques plus ou moins diluées de sucres simples.

Les paramètres de la chromatographie sont listés dans le **Tableau V. 3**.

Tableau V. 3 : Paramètres HPLC pour le dosage des protéines en phase inverse

Paramètre	Détails
Colonne Carbopac PA1	Longueur : 30 cm Diamètre interne : 7.8 mm
Pré-colonne	Carbopac Guard
Débit	1 mL.min ⁻¹
Détecteur	Détecteur Dionex à ampérométrie pulsée Ajout post-colonne de soude à 500 mM à 1 mL.min ⁻¹

I.8. Teneur en chlorophylle

La teneur en chlorophylle des échantillons est déterminée à partir de la méthode de *Porra et al., 1989*, légèrement modifiée. En effet, elle a été adaptée à la détermination de la teneur en chlorophylle de l'extrait vert, du culot issu de la centrifugation et de la plante entière.

I.8.1 Protocole d'extraction de la chlorophylle

La prise d'essai doit être de l'ordre du gramme, mais un calcul préalable est nécessaire. En effet, 4 mL d'acétone sont ajoutés à l'échantillon, de manière à ce que la concentration finale de l'acétone dans l'échantillon soit égale à 80 %. 6 mL d'acétone (à 80 % pour ne pas modifier la concentration en acétone) sont ajoutés, puis l'échantillon est mis sous agitation magnétique pendant 30 min environ et centrifugé 5 min à 7000 g. Le surnageant constitué d'acétone et des pigments est récupéré dans une fiole jaugée et ajusté à 10 mL avec de l'acétone à 80 %.

I.8.2 Mesure de la longueur d'onde au spectrophotomètre d'absorption

Dans une fiole jaugée de 20 mL, 2 mL de l'extrait pigmentaire sont dilués dans de l'acétone à 80 %. L'absorbance de la solution est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Sacomam – Anathelie à 645 et 663 nm (selon les pics observés sur le spectre).

Les formules utilisées pour décrire la concentration en chlorophylle dans l'échantillon préparé sont détaillées ci-dessous. Elles prennent en compte les coefficients d'extinction de la chlorophylle dans l'acétone aux longueurs d'ondes considérées et ont été déterminées par *Porra et al. (1989)* sur des feuilles vertes.

$$[\text{Chla}] = 12.0A_{663} - 3.1A_{645}$$

$$[\text{Chlb}] = 20.8A_{645} - 4.9A_{663}$$

$$[\text{Chla}] + [\text{Chlb}] = 7.1A_{645} + 17.7A_{663}$$

[Chla] est la concentration de la solution en chlorophylle a (en g.L⁻¹)

[Chlb] est la concentration de la solution en chlorophylle b (en g.L⁻¹)

Ces valeurs permettent de retrouver la teneur en chlorophylle de chaque prise d'essai.

1.9. Observations structurales

Des observations sur la luzerne ont été effectuées aux différentes étapes du procédé d'extrusion. Ces observations ont été réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire (Nikon SMZ) 1500, équipée d'une caméra numérique (Nikon DMX 1200), pilotée par ordinateur pour l'enregistrement des images. Le traitement et l'acquisition des photographies sont effectués grâce au logiciel Lucia G version 5.3.

1.10. Mesure du taux de gonflement

Le taux de gonflement de la luzerne est un indicateur du volume occupé par la plante en présence d'un excès d'eau. Un volume connu de luzerne est introduit dans une éprouvette de 500 mL, puis est recouvert d'un excès d'eau. Après une nuit de mise en contact, les volumes d'extrait aqueux filtré sur passoire et du mélange total sont relevés. Le taux de gonflement est déterminé selon la formule suivante :

$$T_{\text{gonflement}} = \frac{V_t - V_a}{V_s}$$

Avec :

V_t est le volume total du mélange après une nuit de mise en contact (mL)

V_a est le volume d'extrait aqueux obtenu après égouttage sur passoire (mL)

V_s est le volume occupé par l'échantillon de luzerne avant ajout d'eau (mL)

1.11. Mesure du taux d'absorption

Le taux d'absorption représente le nombre de fois que la plante est capable d'absorber sa masse en eau, lorsqu'elle est saturée. Comme pour la mesure du taux de gonflement, une

masse connue de luzerne est introduite dans une éprouvette, dans laquelle on ajoute une masse d'eau précise, en excès. Après 24 h d'imprégnation, la masse d'extrait aqueux récolté par égouttage du mélange sur passoire. Le taux d'absorption est calculé selon la formule

$$\text{suivante : } T_{\text{absorption}} = \frac{m_s + m_e - m_a}{m_s} - 1 = \frac{m_e - m_a}{m_s} - 1$$

Avec :

m_e est la masse d'eau distillée ajoutée dans l'éprouvette (en g)

m_a est la masse d'extrait aqueux récolté après égouttage sur passoire (en g)

m_s est la masse de la prise d'essai (en g)

II. MISE EN ŒUVRE DE L'EXTRUDEUR BI-VIS

II.1. Description de l'extrudeur bi-vis utilisé

L'extrudeur bi-vis Clextral BC 45 (France) sur lequel ont eu lieu nos essais est un extrudeur à vis co-rotatives et co-pénétrantes. Il est constitué de deux arbres parallèles de 1.40 m insérés dans un fourreau.

Autour du fourreau sont agencés sept modules de 20 cm de long, assemblés entre eux par des colliers, équipés d'un dispositif permettant la circulation de l'eau de refroidissement. Certains de ces modules sont fermés et peuvent être chauffés par induction grâce à des fours à induthermes de 5 kW. La température de chacun de ces modules peut être contrôlée et régulée individuellement. En outre, les modules peuvent également être pourvus d'une ouverture permettant l'introduction de matière dans la machine, ou être équipés d'un filtre. Dans ce cas, des grilles de filtration semi-cylindriques sont installées sous le module, percées de trous coniques (1 mm de diamètre intérieur, 2 mm de diamètre extérieur, 8 trous.cm⁻²). Enfin, chaque module dispose de buses permettant l'ajout facultatif de liquide.

Les vis disposées sur les arbres sont entraînées par un moteur à vitesse variable par l'intermédiaire d'un boîtier de réduction, dont le pilotage est assuré par une armoire de commande sur laquelle peuvent être relevés et/ou réglés les paramètres de fonctionnement (vitesse de rotation des vis, vitesse d'alimentation en matière première au niveau de la trémie, ampérage, température des différents capteurs).

Deux pompes sont utilisées pour l'introduction de l'eau, selon les débits souhaités. Une première pompe volumétrique à piston (DKM K20-2-P32, Clextral), ayant un débit maximal de 87 L.h⁻¹ est utilisée pour l'ajout d'eau pour les débits les plus élevés. Pour des débits inférieurs à 5 L.h⁻¹, une seconde pompe volumétrique à piston (DKM I30-UG220, Clextral) est utilisée.

II.2. Mise en œuvre de l'extrudeur

II.2.1 Introduction de luzerne

L'introduction de luzerne par l'intermédiaire de la trémie volumétrique d'alimentation est impossible, la matière étant trop humide et formant des masses compactes qui ne parviennent pas à être happées par la vis situées à la sortie de la trémie. L'alimentation en plante est donc manuelle, au niveau du premier module de l'extrudeur bi-vis.

Les sacs de luzerne ont été conservés à -20 °C. Afin de permettre une meilleure introduction dans l'extrudeur, la luzerne a été broyée encore congelée dans un broyeur-composteur à végétaux (Viking). Les fragments de plantes obtenus mesuraient en moyenne 7 cm de longueur. Les sacs de luzerne ont été remplacés à -20 °C jusqu'à leur utilisation pour les expérimentations.

Un soin tout particulier doit être apporté lors de l'introduction de la plante, afin que le débit d'alimentation soit le plus constant possible, tout en vérifiant qu'il n'y ait pas de phénomène d'agrégation des morceaux de luzerne qui forment alors une masse et ne sont pas convoyés à l'intérieur de la machine. L'introduction en plante doit être lancée après le démarrage de la pompe d'alimentation en eau, dans les cas où de l'eau est additionnée à la matière végétale, afin d'éviter le blocage de la machine.

II.2.2 Déroulement d'un essai

Une démarche spécifique est à adopter pour faire fonctionner l'extrudeur bi-vis. Avant de commencer les essais, il est nécessaire de régler sur l'armoire de pilotage les températures de consigne du fourreau et d'attendre que la température mesurée ait atteint la consigne et soit stable. La rotation des vis peut ensuite être mise en route, à vitesse lente. Si de l'eau est ajoutée, la pompe doit être allumée et la luzerne peut être introduite dès que l'eau commence à couler au niveau des filtres. Le débit d'alimentation en matière et la vitesse de rotation des vis sont augmentés progressivement jusqu'aux valeurs souhaitées. Il faut toutefois contrôler l'intensité du courant consommé par le moteur. En effet, au-delà d'une valeur limite (égale à 100 A pour cette machine selon les données constructeur), la machine se bloque. Lorsque le régime stable est obtenu (écoulement libre, continu et régulier de filtrat, ampérage stable, pendant plus de 20 min), un essai peut être lancé. Il s'agit alors de collecter pendant une durée précise (20 min généralement) l'extrudat et le filtrat, tout en ayant pesé précisément la quantité de luzerne introduite. Le filtrat est centrifugé (Centrifugeuse discontinue Sigma

6K15) à 4000 g pendant 20 min à 20 °C ; de manière à éliminer les particules solides, ce qui conduit à l'obtention d'un filtrat clarifié de couleur brune (appelé jus brun).

II.2.3 Détermination de la répartition massique de solide dans la machine

Lorsque des mesures de répartition de la matière dans la machine sont effectuées, la rotation des vis de l'extrudeur est arrêtée immédiatement après la durée de l'essai. Le fourreau est alors ouvert, et, section par section (donc sur une longueur de 20 cm), la luzerne collée sur les vis est récoltée. Les fractions prélevées sont ensuite pesées et leur teneur en matière sèche est déterminée selon le protocole décrit dans le **Paragraphe I.1**.

Le niveau de remplissage de chaque section de l'extrudeur bi-vis est évalué grâce au calcul de la densité apparente du solide sec, qui est définie comme étant le rapport de la masse de solide sec dans chaque section par le volume libre dans la section considérée.

$$d_{\text{apparente}} = \frac{m_{\text{sec}}}{V_{\text{libre}}}$$

Le volume libre dans chaque section est calculé en tenant compte des éléments de vis dans chaque section du profil utilisé est déterminé selon la relation suivante :

$$V_{\text{libre}} = V_{\text{fourreau}} - 2 \times V_{\text{vis}} \text{ avec } V_{\text{fourreau}} = S_{\text{fourreau}} \times L_{\text{fourreau}}$$

Avec :

V_{vis} : volume des vis constituant chaque section considérée

V_{fourreau} : volume du fourreau dans chaque section considérée

S_{fourreau} : section transversale du fourreau (4606 mm² pour l'extrudeur bi-vis Clextral BC45)

L_{fourreau} : longueur du fourreau pour chaque section

Le volume de chaque vis a été déterminé par *Evon, 2008* dans le cadre de sa thèse, par différence de niveau après immersion dans l'eau de l'élément de vis considéré (**Tableau V. 4**). Les orifices de passages des arbres de l'extrudeur ont été bouchés à l'aide de ruban adhésif afin de tenir compte de leur volume.

Tableau V. 4. Volume libre des éléments de vis utilisés sur l'extrudeur bi-vis Clextral BC 45
(Evon, 2008)

	Notation	Pas (mm)	Longueur (cm)	V vis (cm ³)	V fourreau (cm ³)	V libre (cm ³)	V libre (%)
Vis de convoyage à double filet	T2F66	66	10	132.8	460.6	195	42.3
	C2F50	50	10	150.5	460.6	159.6	34.7
	C2F33	33	10	146.5	460.6	167.6	36.4
			5	78.9	230.3	72.5	31.5
C2F25	25	5	79.1	230.3	72.1	31.3	
Vis de convoyage à simple filet	C1F33	33	10	161.1	460.6	138.4	30
	C1F25	25	10	158.1	460.6	144.4	31.4
			5	88	230.3	54.3	23.6
CF1T15	15	10	144.5	460.6	171.6	37.3	
Contre- filets	CF1TC-25	-25	5	83	230.3	64.3	27.9
	CF1TC-15	-15	5	81.5	230.3	67.3	29.2
Eléments restrictifs	DM	-	1	16.6	46.1	12.9	28
	BB	-	1	15.9	46.1	14.3	31

II.2.4 Conditions opératoires des essais effectués

Le pressage-extrusion de la luzerne a été mené selon différents objectifs (production de jus vert, étude de la faisabilité sur différents profils, analyse de l'effet de différents paramètres). Au total, une trentaine d'essais d'extrusion ont été effectués, sur 5 profils différents (profils détaillés dans le **Chapitre III**). Les conditions opératoires sont détaillées dans le **Tableau V. 5**.

Tableau V. 5 : Récapitulatif des conditions opératoires pour le traitement de luzerne sur l'extrudeuse bi-vis Clextral BC-45

Série d'essais	Lot de luzerne	Profil de vis	Vitesse de rotation des vis	T°C	Ratio L/S	Débit d'alimentation en luzerne	Objectifs
1^{ère} campagne d'extrusion	Lot 1	1	140 rpm	20 °C	Pas d'eau introduite	32 kg.h ⁻¹	Production de jus vert
2^{nde} campagne d'extrusion	Lot 2 <i>Essais 1 à 8</i>	1	110 rpm	De 25 à 50 °C	De 0.4 à 6.1	(10.8 ± 1.1) kg.h ⁻¹	Etude de l'influence de la température et du ratio liquide/solide : plan d'expériences 1
	Lot 2 <i>Essais 9 à 16</i>	2	110 rpm	De 25 à 50 °C	De 0.5 à 6.8	(10.0 ± 0.7) kg.h ⁻¹	Etude de l'influence de la température et du ratio liquide/solide : plan d'expériences 2
3^{ième} campagne	Lot 3	3	110 rpm	50 °C	De 4 à 8	Reflux de liquide, pas de séparation L/S	Influence du profil de vis et des conditions opératoires
	Lot 3 <i>Essais 17 à 20</i>	2	110 rpm	50 °C	De 4.0 à 7.6	De 11.8 à 27.7 kg.h ⁻¹	Influence du profil de vis et des conditions opératoires (débit de luzerne, ratio L/S)
	Lot 3 <i>Essais 21 à 23</i>	4	110 rpm	50 °C	De 4.0 à 7.4	De 12.3 à 32.9 kg.h ⁻¹	Influence du profil de vis et des conditions opératoires (débit de luzerne, ratio L/S)
	Lot 3 <i>Essais 24 à 26</i>	5	110 rpm	50 °C	De 4.0 à 7.4	De 12.3 à 32.9 kg.h ⁻¹	Double filtration Influence du profil de vis et des conditions opératoires (débit de luzerne, ratio L/S)

II.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sur les résultats sont réalisées à l'aide du logiciel NEMROD (New Efficient Methodology for Research using Optimal Design, *Mathieu et Phan-Than-Luu, 1992*). Ce logiciel permet l'élaboration de courbes d'isoréponses, montrant l'influence croisée des différents paramètres testés sur la qualité des fractions obtenues. Ici, les paramètres testés, pour chaque profil de vis, sont la quantité d'eau introduite dans l'extrudeur bi-vis et la température de consigne de la machine.

III. TRAITEMENT DE LA LUZERNE EN REACTEUR AGITE

Trois techniques différentes sont mises en œuvre pour l'étude de l'extraction de protéines en réacteur agité. Tous les essais ont été conduits sur de la luzerne congelée préalablement coupée à l'aide de ciseaux, pour obtenir des fragments de 1 à 2 cm.

III.1. Types de mobiles d'agitation

III.1.1 Ultra-Turrax

Un Ultra-Turrax (IKA T25) de puissance utile égale à 350 W est utilisé pour l'agitation de la luzerne dans l'eau, en conditions cisailantes. La luzerne est introduite dans un bécher de 150 mL. L'eau déminéralisée est ajoutée selon le rapport massique de luzerne choisi, et la solution totale de 100 g est agitée pendant deux périodes de 5 min, à 16000 tr.min⁻¹.

Les pourcentages massiques choisis sont dans une gamme située entre 5 et 20 %. Au delà, l'agitation n'a plus d'effet sur la taille des morceaux de plante.

III.1.2 Emulsificateur Silverson

L'émulsificateur utilisé, le Silverson L4RT combine une action d'agitation du mélange à un broyage de la partie solide, car il est équipé d'une grille de mailles de 2 mm (**Figure V. 1**). Des échantillons de 300 g du mélange luzerne + eau sont préparés, selon les rapports massiques choisis. Ils sont ensuite traités pendant 10 min à 4000 tr.min⁻¹, vitesse permettant le broyage de la matière. Au-delà de 15 % de luzerne, la plante s'agglomère pour former une masse qui n'est plus entraînée par l'agitation.

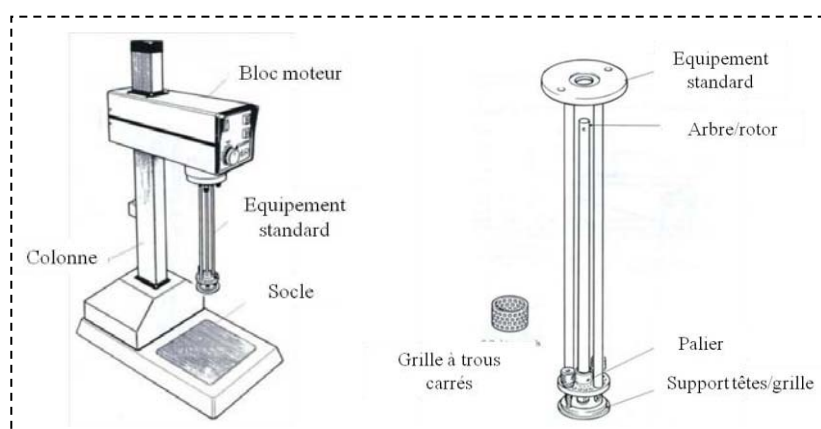


Figure V. 1 : Représentation du Silverson L4RT utilisée : vue générale de l'appareil et de l'équipement standard

III.1.3 Mixeur-hachoir

Un hachoir de cuisine de type Maxi Chopper (SEB) d'une puissance de 30 W a également été testé. Des échantillons de 100 g de luzerne et d'eau ont été préparés, puis mixés pendant 5 périodes de 10 s chacune.

III.1.4 Essais effectués

Le **Tableau V. 6** présente un récapitulatif des essais effectués pour le traitement de la luzerne en réacteur agité.

Tableau V. 6 : Conditions opératoires de l'extraction des protéines de luzerne en réacteur agité

Mobile d'agitation	Durée d'agitation	Masse de l'échantillon (g)	Pourcentage massique de luzerne en mélange avec l'eau déminéralisée (%)
Ultra-Turrax IKA T25 350 W	2 fois 5 min	100	De 5 à 20 %
Emulsificateur Silverson L4RT 4000 tr.min ⁻¹	10 min	300	De 5 à 15 %
Mixeur-Hachoir Maxi Chopper SEb 30 W	5 fois 50 s	100	De 5 à 15 %

III.2. Echantillonnage et détermination de la teneur en protéines

Après agitation, le mélange plante + eau est filtré sur une passoire, et légèrement pressé à l'aide du doigt. Le filtrat ainsi que le gâteau sont récoltés et leur teneur en protéines est déterminée par la méthode de Kjeldahl (**Paragraphe I.4.1**).

IV. MISE EN ŒUVRE DE L'UTRAFILTRATION

L'extrait vert centrifugé (ou jus brun) a été filtré sur des membranes d'ultrafiltration dont les caractéristiques sont présentées dans le **Tableau V. 7**.

Tableau V. 7 : Caractéristiques des membranes (Hollow Fiber Cartridge UFP) utilisées pour l'ultrafiltration du jus de luzerne centrifugé

Membrane	Diamètre des pores (kDa)	Module de filtration	Type	Diamètre des fibres (mm)	Longueur du module (cm)	Surface filtrante (m ²)
UFP10	10	Fibres creuses	Polyéthersulfone	0.5	60	0.14
UFP30	30	Fibres creuses	Polyéthersulfone	0.5	60	0.14

Le jus brun constitue la solution d'alimentation, et est entraîné vers la membrane grâce à une pompe (Quattro 1000). La solution traversant la membrane est nommée perméat et la solution retenue par la membrane est appelée rétentat. La pression transmembranaire (formule ci-dessous) est mesurée à l'aide de manomètres situés en entrée et en sortie d'installation. La membrane est tout d'abord conditionnée dans de l'eau et des mesures de la perméabilité dans l'eau sont effectuées. La solution de jus brun est par la suite traitée, d'abord en mode recirculation et enfin en mode concentration.

$$PTM = \frac{P_e + P_s}{2}$$

Avec :

PTM est la pression transmembranaire

Pe est la pression en entrée de la membrane (en bar), côté alimentation

Ps est la pression à la sortie de la membrane (en bar), côté rétentat

IV.1. Traitement de la solution en mode recirculation

Dans cette configuration (**Figure V. 2**), le perméat et le rétentat en sortie de membrane sont recyclés dans le récipient d'alimentation de la solution de départ, afin de maintenir un volume et une concentration constants.

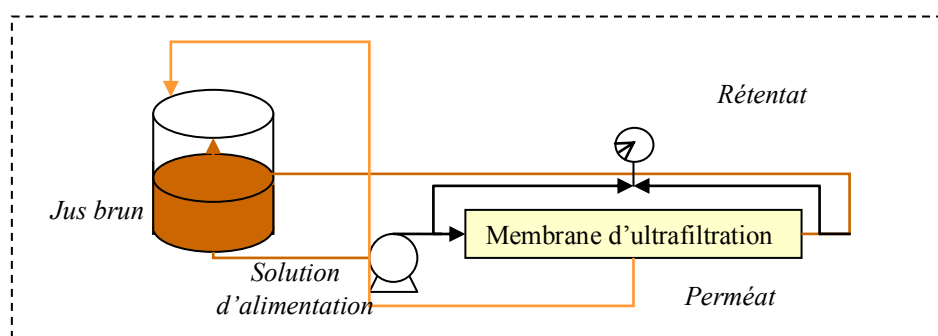


Figure V. 2 : Représentation schématique de l'installation d'ultrafiltration en mode recirculation

Des mesures de perméabilité de la membrane dans le jus brun sont alors effectuées. Pour cela, le débit de perméat est mesuré, à plusieurs vitesses d'alimentation en jus brun, pour une pression transmembranaire fixée, et des mesures du débit de perméat sont menées pour plusieurs pressions transmembranaires, à vitesse de recirculation constante. Les flux de perméation selon la pression (entre 1 et 2.2 bars) ou la vitesse de recirculation (100, 150, 200 rpm) peuvent ainsi être calculés.

IV.2. Traitement de la solution en mode concentration

En mode concentration, le perméat est éliminé, tandis que le rétentat est recyclé dans la solution d'alimentation. Le but est de concentrer la solution de départ et de réduire son volume en éliminant l'eau et les composés de taille inférieure aux pores de la membrane. Des mesures de débit du perméat sont effectuées toutes les 5 min. En outre, les masses de perméats récoltées tout au long de la concentration sont pesées, de manière à calculer le facteur de concentration massique, selon la formule suivante, au cours du temps :

$$\text{FCM} = \frac{V_i}{V_t}$$

Avec :

V_i est le volume initial de solution de recirculation (mL)

V_t est le volume de solution de recirculation à l'instant t (mL)

IV.3. Calcul de la vitesse tangentielle

La vitesse tangentielle de la solution au niveau de la membrane peut être calculée grâce à la formule suivante :

$$\mathbf{u} = \frac{\mathbf{Q}_R}{\mathbf{Nf} \times \mathbf{\Omega}_T} = \frac{\mathbf{Q}_R}{\mathbf{Nf} \times \frac{\mathbf{\Pi d}^2}{4}}$$

Avec :

\mathbf{u} : Vitesse tangentielle ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

\mathbf{Q}_R : Débit de recirculation ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$)

\mathbf{Nf} : Nombre de fibres dans le module de filtration

$\mathbf{\Omega}_T$: Section totale des fibres (m^2)

\mathbf{d} : Diamètre d'une fibre (m)

V. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS SUR RESINES

V.1. Propriétés des résines

Deux résines différentes ont été testées pour le traitement du jus de luzerne. La résine Amberlite 900 Cl est une résine échangeuse d'ions tandis que la résine Amberlite XAD4 est une résine adsorbante. Leurs caractéristiques sont détaillées dans le **Tableau V. 8**.

Tableau V. 8 : Caractéristiques des résines utilisées pour le traitement du jus de luzerne

Résines	Producteur	Squelette de la résine	Taille effective des billes	Caractéristiques
Amberlite IRA 900-Cl	Rohm & Haas	Polystyrénique réticulé macroporeux	0.60 mm	Fonction $N^+(CH_3)_3$ Masse volumique : 1.03 $g.cm^{-3}$
Amberlite XAD4	Rohm & Haas	Polyaromatique réticulé	0.52 mm	Surface : $750m^2.g^{-1}$ Diamètre des pores : 50 Å

V.2. Conditionnement des résines

La résine est conditionnée de deux manières différentes : soit en milieu hydrophile, soit en milieu hydrophobe. La **Figure V. 3**, ci-dessous, décrit les protocoles suivis, d'après les travaux de *Bellemare, 2003*.

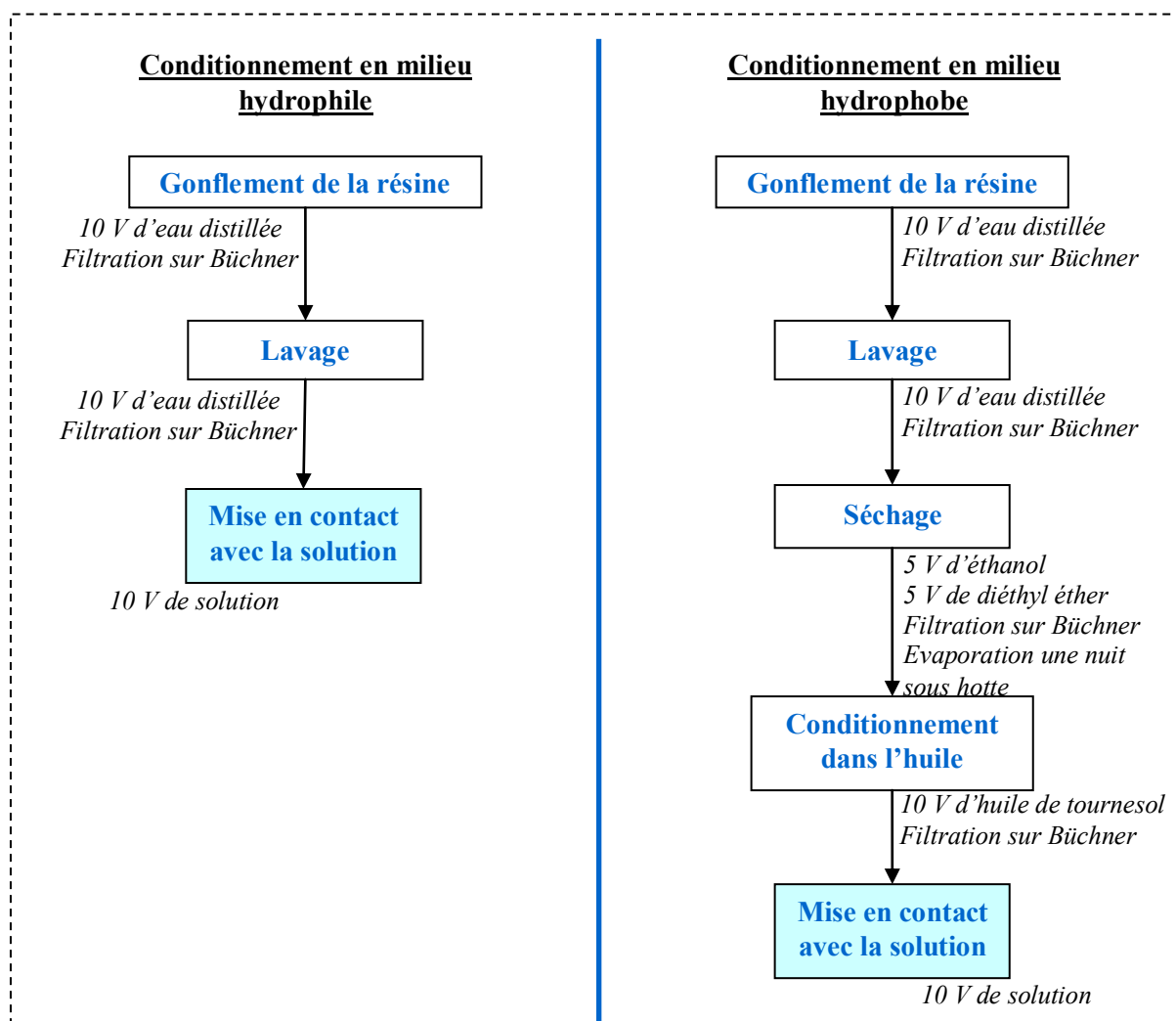


Figure V. 3 : Protocole de conditionnement de la résine en milieu hydrophile et milieu hydrophobe

Le gonflement de la résine dans l'eau permet aux pores et aux canaux de la résine de s'élargir. Les échanges ultérieurs avec une solution aqueuse sont ainsi facilités. En outre, les molécules d'eau viennent solvater les groupements ioniques. Elle peut provoquer une ionisation des liaisons et une dissociation des ions ainsi formés (Trémillon, 1965). Le lavage à l'eau permet l'élimination des impuretés présentes dans le polymère.

Après mise en contact de la solution pendant la durée définie, l'ensemble résine/solution est filtré sur Büchner et la teneur en protéines du filtrat est analysée, soit par Kjeldahl pour un jus brut (Paragraphe I.4.1), soit par HPLC-UV pour les solutions synthétiques (Paragraphe I.4.4).

V.3. Fixation des protéines sur résine en réacteur agité

Les premiers essais d'extraction des protéines par fixation sur résine d'échange d'ions ont été réalisés en batch. Pour chaque test, 2 g de résine conditionnée selon le protocole décrit dans le paragraphe précédent sont placés dans 20 mL de solution protéique, et mis sous agitation. Le **Tableau V. 9** présente les essais menés sur le lysozyme, la BSA, l'extrait de protéines vertes de luzerne et la Rubisco.

Tableau V. 9 : Essais d'extraction des protéines en réacteur agité

	Masse de résine conditionnée, pour chaque essai	Volume de solution protéique	Concentration de la solution protéique	Durée de mise en contact
Cinétiques de fixation	2 g	20 mL	1 g.L ⁻¹	De 0.5 à 14 h
Isotherme de fixation	2 g	20 mL	De 0.1 à 10 g.L ⁻¹ (Jusque 100 g.L ⁻¹ pour BSA)	Equilibre de fixation atteint : 6 h pour toutes les protéines, 5 h pour lysozyme

Après fixation, le mélange est filtré sur Büchner. La teneur en protéines du filtrat est ensuite analysée par HPLC-UV (**Paragraphe I.4.4**).

V.4. Extraction des protéines sur colonne d'échange d'ions

Les essais d'extraction des protéines par fixation sur résine d'échange d'ions en colonne sont réalisés sur du jus centrifugé puis ultrafiltré. Pour cela, 20 mL, correspondant à un Bed Volume (BV) de résine Amberlite IRA 900 préalablement conditionnée dans l'eau, sont introduits dans une colonne en verre de 10 mm de diamètre.

- **Injection** : En haut de la colonne, 2 mL (0.1 BV) de solution à traiter sont injectés
- **Elution** : L'élution est réalisée à l'aide soit d'huile, soit d'eau, à un débit de 20 mL.h⁻¹ (1 BV.h⁻¹), avec un volume total de 6 BV.
- **Echantillonnage** : Des échantillons sont prélevés tous les 2 mL en sortie de colonne. Leur pH, leur conductivité et leur absorbance sont mesurés. Ils sont ensuite passés en HPLC, afin de caractériser les protéines qu'ils contiennent.
- **Lavage** : La phase de lavage de la résine est effectuée avec de l'éthanol.

VI. DESCRIPTION DES LOTS DE LUZERNE UTILISES

Le premier lot reçu consistait en une luzerne fauchée (deuxième ou troisième coupe, avec des fleurs à l'état de boutons) dans un champ d'agriculture biologique près d'Angers (Maine-et-Loire), cultivée en association avec une Graminée (70 % de luzerne). Fauchée à l'état mouillé (après un orage), puis ramassée et acheminée à l'état frais jusqu'à Toulouse, elle a été conditionnée en sacs de 10 kg, puis stockée à -20 °C. Ce premier lot de luzerne a été extrudé sans ajout d'eau ni chauffage, à l'aide du profil de vis 1 (**Chapitre III**), de manière à produire une quantité de jus de luzerne suffisante pour les essais de fractionnement.

Le second lot de luzerne, provenant de la même zone géographique, provenait d'une luzerne pré-fanée puis congelée immédiatement dans de bonnes conditions, sous forme de sacs d'une quinzaine de kilos chacun puis acheminée par camion frigorifique avant stockage à -20 °C. Il s'agissait d'une luzerne possédant déjà des fleurs. Une étude de l'influence du profil de vis sur la qualité des fractions obtenues après extrusion a été réalisée sur ce lot de luzerne (**Chapitre III**). Le jus ainsi produit n'a pas été utilisé pour l'élaboration du procédé de fractionnement.

Le troisième et dernier lot, provenant du même champ que le lot précédent, toujours congelé dès la récolte a été transporté en l'état jusqu'à Toulouse. Cette luzerne était issue de la coupe terminale. En effet, il s'agissait de la dernière coupe de l'année, sur une luzerne peu haute et sans fleurs ni boutons, permettant de préparer la repousse de la plante au printemps suivant. L'optimisation du procédé de pressage-extrusion a été réalisée grâce à ce dernier lot de luzerne. Le jus ainsi produit a également été utilisé pour certaines étapes du procédé de fractionnement décrites dans ce chapitre.

Chacun des lots pesait au minimum 150 kg.



CONCLUSION GENERALE

L'industrie de déshydratation des plantes fourragères utilise notamment la luzerne (*Medicago sativa*) comme matière première pour la production d'aliments pour le bétail, sous forme de brins déshydratés ou de granulés par exemple. Les jus verts générés lors du procédé de déshydratation de la luzerne sont caractérisés par leur forte teneur en protéines. Des procédés de concentration des jus pour l'obtention d'isolats protéiques existent, mais sont encore difficiles à mettre en place à l'échelle industrielle.

Le projet PRODULUZ, développé entre le laboratoire RAPSODEE de l'Ecole des Mines d'Albi, le LISBP de l'INSA Toulouse et le LCA, avait pour titre : procédé durable de transformation et valorisation de la luzerne : étude d'un procédé de déshydratation intensif et récupération des produits à haute valeur ajoutée. Il proposait l'étude des voies d'amélioration du procédé classique de déshydratation, en assurant son intérêt économique et son optimisation environnementale. Deux aspects ont été traités :

- Un procédé de déshydratation mécanique intensif performant permettant des économies d'énergie par rapport au pressage et à la déshydratation usuels, a été développé
- Des procédés de bioséparation par procédés chromatographiques ont été mis au point, pour la séparation des protéines hydrophiles de luzerne (en lit expansé, LISBP), et de protéines hydrophobes (par chromatographie en phase hydrophobe, LCA)

L'objectif de la thèse a été non seulement : **(i.)** de développer un procédé global de traitement des plantes fourragères, en prenant comme exemple la luzerne, permettant la valorisation de toutes les fractions de la plante, en minimisant les déchets produits, et en utilisant uniquement des solvants respectueux de l'environnement, faisant partie intégrante de la chimie verte (**Figure conclusion. 1**), mais aussi **(ii.)** de répondre à la question scientifique concernant la faisabilité de l'utilisation d'interactions hydrophobes pour la séparation des protéines vertes de luzerne, entrant dans le cadre du projet PRODULUZ.

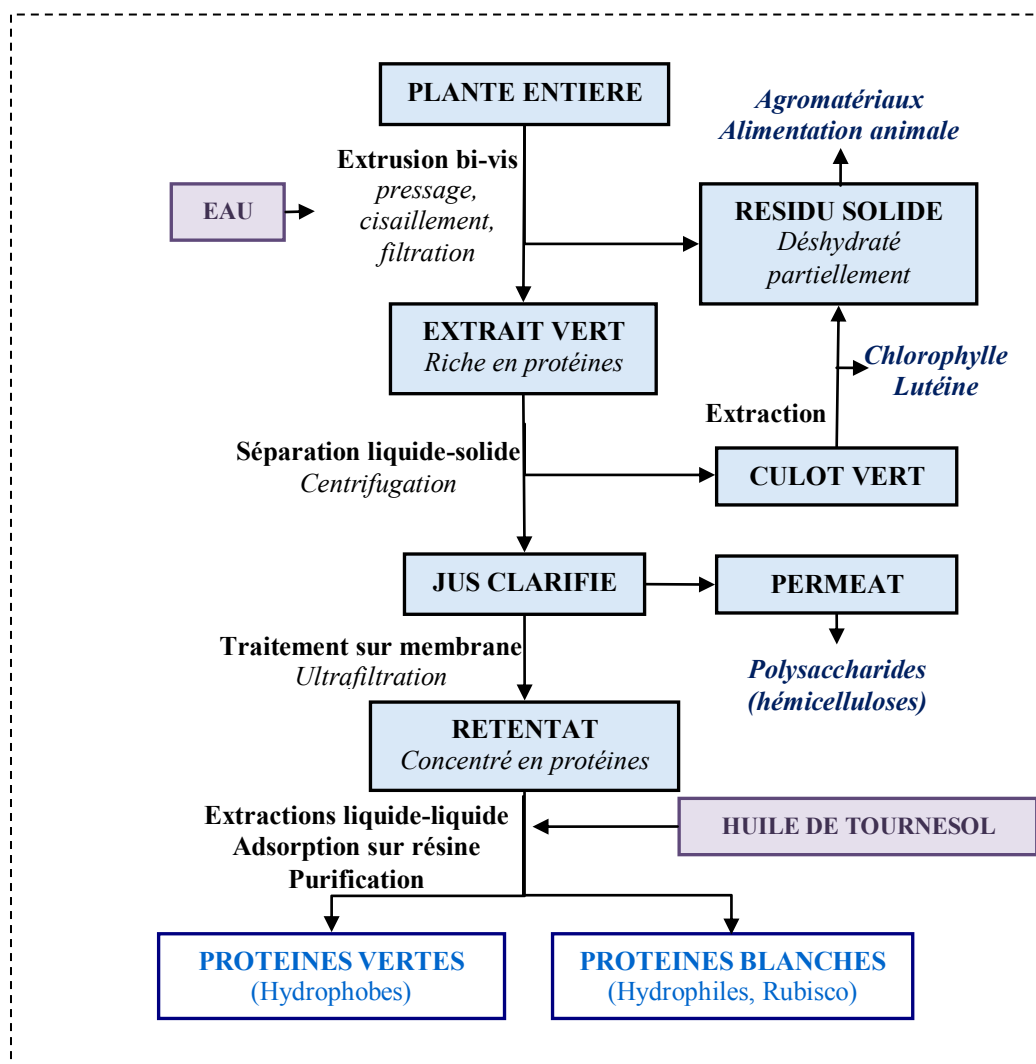



Figure conclusion. 1 : Schéma de traitement d'une plante fourragère

L'extrusion bi-vis, technique étudiée au LCA, a été choisie comme alternative au pressage classique de la luzerne et a permis l'obtention de deux fractions : un résidu solide et un extrait liquide. L'extrait liquide a par la suite été fractionné, afin d'étudier la faisabilité de la séparation entre protéines hydrophiles et protéines hydrophobes.


Après avoir élaboré le schéma de traitement de la plante, plusieurs étapes ont été particulièrement étudiées. Ainsi, l'optimisation de l'étape d'extrusion bi-vis a été réalisée, et la fixation des protéines sur les résines utilisées en chromatographie a été investiguée de manière à en déterminer les mécanismes.

 L'élaboration d'un procédé de traitement de la luzerne entière a permis de mettre en évidence la richesse de cette biomasse en composés valorisables.

En effet, le résidu solide issu de l'extrusion est déjà partiellement déshydraté, permettant une étape de déshydratation ultérieure moins coûteuse en énergie s'il rejoint la filière traditionnelle de nutrition animale. Sa richesse en fibres en fait également un bon candidat à la fabrication d'agromatériaux, ce qui est une piste de valorisation à ne pas négliger. L'extrait vert, quant à lui, doit subir une étape de séparation liquide/solide, afin d'éliminer les matières en suspension entravant les étapes ultérieures. Une centrifugation discontinue a été appliquée dans le cadre de cette thèse, mais une réflexion a été menée sur l'amélioration de cette étape. Nous avons ainsi montré qu'une grande partie des protéines sont éliminées durant la centrifugation, non seulement les protéines insolubles, encore liées aux débris végétaux, mais également des protéines solubilisées, retenues dans le liquide piégé dans le culot. A l'échelle industrielle, une centrifugeuse à assiettes serait utilisée, avec des rendements de récupération des protéines sans doute différents ; mais une simple filtration pour l'élimination des plus grosses particules solides pourrait également être envisagée. La récupération des protéines hydrophobes, constituant les membranes des cellules végétales, peut être effectuée par addition d'un solvant adapté à l'extrait, avant centrifugation (amélioration de 30 % du rendement dans le cas de l'utilisation d'un détergent).

Le culot, de couleur verte, obtenu à l'issue de la centrifugation, s'est avéré riche en chlorophylle (57 mg.g^{-1}), extractible avant séchage de ce culot, et réintroduction dans la filière alimentation animale, grâce aux protéines qu'il contient encore.


L'extrait centrifugé est ensuite traité par ultrafiltration pour être concentré. Cette étape permet cependant d'éliminer des protéines, non identifiées, ainsi que des acides aminés ou peptides libres en solution.

 Le traitement de la plante en extrusion bi-vis permet un fractionnement thermo-mécanique, et combine dans une seule installation le broyage de la plante, une extraction efficace des protéines (au dessus de 60 % des protéines récupérées dans le filtrat), et une première séparation liquide/solide entraînant une déshydratation partielle de la luzerne (obtention d'un solide à 50 % de matière sèche avec le profil 1).

L'optimisation de l'extrusion a montré l'importance cruciale du choix des paramètres de fonctionnement de la machine, en particulier de la configuration du profil de vis, sur la qualité des fractions obtenues. En effet, sur une plante de même qualité, modifier le profil de vis le long de l'axe entraîne une évolution des zones définies dans la machine (broyage,

imprégnation d'eau de la luzerne, extraction, pressage, cisaillement), et donc des résultats différents en sortie.

En outre, il a été mis en évidence des différences notables de résultats entre de la luzerne issue de lots différents, et donc selon la qualité de la plante entière. Il aurait été intéressant d'avoir la possibilité d'optimiser les conditions d'extrusion (meilleure extraction des protéines dans le filtrat, résidu le mieux déshydraté) pour des lots de luzerne tout au long d'un cycle de culture. Ainsi, les qualités de la plante entière pourraient être reliées aux conditions d'extrusion les mieux adaptées pour chaque lot. L'extrudeur bi-vis étant un appareil très modulable, le traitement à échelle industrielle de la luzerne pourrait ainsi être effectué de manière optimisée à chaque coupe, en montant des profils différents sur la machine et en travaillant dans les meilleures conditions de fonctionnement. En outre, travailler sur de plus grosses quantités de plante permettrait d'augmenter le remplissage de la machine, et donc de diminuer l'énergie mécanique consommée par kg de matière. Une barrière technologique au traitement de la luzerne à échelle industrielle est l'introduction de la plante dans la machine. La luzerne est une plante riche en eau, qui colle et ne passe donc pas dans les trémies classiques.

 L'étude des mécanismes de fixation des protéines sur résine a permis de déterminer que le transfert externe était l'étape de diffusion limitante. Nous avons également montré que, des protéines modèles ayant des coefficients de partage dans l'huile très différents, l'huile de tournesol est un solvant intéressant permettant la séparation des protéines. Néanmoins, le fait d'utiliser l'huile de tournesol comme solvant a rendu l'étude de la séparation des protéines de l'extrait de luzerne sur colonne chromatographique difficile, l'huile n'étant pas miscible dans le solvant utilisé en HPLC-UV. Une solution serait de mener la séparation chromatographique sur des grandes quantités d'extrait et de résine, afin de récolter des fractions contenant suffisamment de protéines, pour que leur extraction au cyclohexane permette d'en récolter suffisamment pour l'injection en HPLC-UV.

Cette thèse a permis l'exploration de toutes les étapes de la raffinerie verte de la luzerne, et de montrer qu'il est possible de mieux valoriser la luzerne. De nombreuses

questions ont pu être posées devant les résultats obtenus, et ouvrent des pistes de recherche intéressantes.

L'extrusion bi-vis est une alternative au pressage classique de luzerne, et peut être appliquée à d'autres plantes riches en eau pour l'extraction de composés d'intérêt, notamment les protéines. Ainsi, cette méthode pourrait être envisagée pour l'extraction des protéines des microalgues, par exemple. Un nouveau pas dans l'optimisation de l'extraction de ces molécules pourrait être l'introduction d'enzymes ou de détergents (respectueux de l'environnement) à l'intérieur de l'extrudeur, permettant un fractionnement thermique et mécanique, mais aussi chimique, améliorant les rendements.

En outre, le traitement d'un extrait de luzerne, milieu biologique complexe mériterait d'être étudié plus en détail, notamment en caractérisant mieux les types de protéines séparées, et en réalisant d'autres études fondamentales permettant d'identifier avec certitude les mécanismes très complexes mis en jeu.

Enfin, la validation d'un tel procédé de fractionnement doit passer par l'étude de l'Analyse du Cycle de Vie, qui permettrait de mettre en évidence si le traitement de la luzerne et des autres plantes fourragères par extrusion bi-vis, puis par fractionnement des jus produits, est plus avantageux pour l'environnement (puis économiquement), que le traitement classique par déshydratation, puis pressage, couplé aux procédés traditionnels de purification de la Rubisco.



ANALYSE DES RESULTATS DES PLANS D'EXPERIENCES

Premier plan d'expériences

(Chapitre III. Paragraphe I.3)

Les coefficients des modèles polynomaux du second degré reliant les réponses expérimentales (rendement d'extraction des protéines, teneur en MS du résidu solide, rendement de récupération de la MS dans le filtrat, teneur en protéines du filtrat) aux deux variables indépendantes codées (T°C, ratio L/S) sont calculés grâce au logiciel NEMROD (Mathieu et Phan-Than-Luu, 1992).

Tableau Annexe 1 : Analyse statistique des coefficients de l'équation modélisant les réponses du premier plan d'expériences par le test de Student

Coefficient	Rendement d'extraction en protéines (R _P)		Rendement de récupération de MS dans le filtrat (R _{MS})		Teneur en protéines du filtrat (P _F)		Teneur en MS du résidu (MS _{RS})	
	Valeur	± (%)	Valeur	± (%)	Valeur	± (%)	Valeur	± (%)
b0	53.33*	3.18	51.11*	1.03	24.26*	0.99	51.11*	1.03
b1	-0.65	2.54	-0.05	0.82	-0.95	0.79	-0.05	0.82
b2	7.72*	2.23	-0.29	0.72	0.49	0.70	-0.30	0.72
b11	-1.14	4.44	1.59	1.44	0.01	1.39	1.59	1.44
b22	-2.18	3.47	-0.19	1.12	-1.16	1.09	-0.19	1.12
b12	-0.77	4.29	-2.96*	1.39	0.58	1.35	-2.96	1.39

Les astérisques signifient que le coefficient est significatif

Peu de coefficients sont statistiquement significatifs.

La répétition du point central de la matrice de Doehlert permet de fournir une estimation de l'écart-type expérimental, égal à 4.41 pour le rendement d'extraction des protéines, 4.02 pour le rendement de récupération de MS, 1.38 pour la teneur en protéines du filtrat et 1.42 pour la teneur en MS du résidu.

La comparaison des rendements expérimentaux et calculés (**Tableau Annexe 2**) montre que les modèles représentent de façon satisfaisante l'ensemble des résultats, avec des écarts maximum de 2.81 pour le rendement d'extraction en protéines, et inférieurs à 1 pour les autres réponses.

Tableau Annexe 2 : Valeurs expérimentales et valeurs calculées à partir du modèle polynomial pour les différentes réponses du premier plan d'expériences

N° de l'essai	Rendement d'extraction en protéines (R _P)		Rendement de récupération de MS dans le filtrat (R _{MS})		Teneur en protéines du filtrat (P _F)		Teneur en MS du résidu (MS _{RS})	
	Expérience (%)	Modèle (%)	Expérience (%)	Modèle (%)	Expérience (%/MS)	Modèle (%)	Expérience (%)	Modèle (%)
1	40.25	43.06 <i>-2.81</i>	51.06	50.14 <i>+0.92</i>	23.61	23.48 <i>+0.20</i>	51.06	50.14 <i>+0.92</i>
2	46.38	43.59 <i>+2.79</i>	52.22	53.11 <i>-0.89</i>	21.54	21.93 <i>-0.39</i>	52.22	53.11 <i>-0.89</i>
3	48.47	51.06 <i>-2.59</i>	53.71	52.87 <i>+0.84</i>	23.50	23.24 <i>+0.26</i>	53.71	52.87 <i>+0.84</i>
4	51.91	52.20 <i>-0.29</i>	51.14	51.17 <i>-0.03</i>	25.42	24.13 <i>+1.29</i>	51.14	51.17 <i>-0.03</i>
5	53.91	51.31 <i>+2.60</i>	51.45	52.29 <i>-0.84</i>	24.94	25.21 <i>-0.27</i>	51.45	52.29 <i>-0.84</i>
6	56.98	59.17 <i>-2.19</i>	53.3	52.60 <i>+0.70</i>	24.18	23.86 <i>+0.32</i>	53.30	52.60 <i>+0.70</i>
7	60.00	57.82 <i>+2.18</i>	48.78	48.78 <i>-0.72</i>	23.29	23.40 <i>-0.11</i>	48.78	49.50 <i>-0.72</i>
8	54.88	54.57 <i>+0.31</i>	51.06	51.06 <i>+0.02</i>	22.97	24.27 <i>-1.30</i>	51.06	51.04 <i>+0.02</i>

Les valeurs en italique représentent l'écart entre le modèle et la valeur obtenue expérimentalement

Second plan d'expériences

(Chapitre III. Paragraphe I.4)

De la même manière, l'analyse statistique des coefficients est réalisée pour le second plan d'expériences

Tableau Annexe 3 : Analyse statistique des coefficients de l'équation modélisant les réponses du second plan d'expériences par le test de Student

Coefficient	Rendement d'extraction en protéines (R _P)		Rendement de récupération de MS dans le filtrat (R _{MS})		Teneur en protéines du filtrat (P _F)		Teneur en MS du résidu (MS _{RS})	
	Valeur	± (%)	Valeur	± (%)	Valeur	± (%)	Valeur	± (%)
b0	47.17*	2.63	31.20*	2.50	30.53*	0.13	33.44*	0.19
b1	4.66	2.224	3.39	2.13	1.18*	0.11	-0.34	0.17
b2	23.65*	2.25	14.21*	2.14	-0.10	0.11	2.56*	0.17
b11	-3.49	3.80	-5.31	3.60	-0.86*	0.18	2.22*	0.28
b22	-16.03*	3.49	-11.81*	3.31	-0.38	0.17	2.50*	0.26
b12	3.01	4.73	2.18	4.15	1.80*	0.21	-1.47	0.32

Les astérisques signifient que le coefficient est significatif

L'écart-type expérimental (calculé grâce à la répétition du point central de la matrice de Doehlert) est égal à 3.79 pour le rendement d'extraction des protéines, 3.59 pour le rendement de récupération de MS, 0.18 pour la teneur en protéines du filtrat et 0.29 pour la teneur en MS du résidu. La comparaison des rendements expérimentaux et calculés (**Tableau Annexe 4**) montre que les modèles représentent de façon satisfaisante l'ensemble des résultats, avec des écarts maximum de 3.7 pour le rendement d'extraction en protéines, 3.6 pour le rendement de récupération de MS dans le filtrat, et inférieurs à 0.2 pour les autres résultats.

Tableau Annexe 4 : Valeurs expérimentales et valeurs calculées à partir du modèle polynomial pour les différentes réponses du second plan d'expériences

N° de l'essai	Rendement d'extraction en protéines (R _P)		Rendement de récupération de MS dans le filtrat (R _{MS})		Teneur en protéines du filtrat (P _F)		Teneur en MS du résidu (MS _{RS})	
	Expérience (%)	Modèle (%)	Expérience (%)	Modèle (%)	Expérience (%/MS)	Modèle (%)	Expérience (%)	Modèle (%)
9	6.35	7.34 <i>-0.99</i>	3.60	4.23 <i>-0.63</i>	30.33	30.33 <i>+0.00</i>	33.50	33.34 <i>+0.16</i>
10	9.84	9.15 <i>+0.69</i>	5.97	5.57 <i>+0.40</i>	29.73	29.74 <i>-0.01</i>	34.34	34.47 <i>-0.13</i>
11	46.27	47.08 <i>-0.81</i>	28.01	28.51 <i>-0.50</i>	30.77	30.76 <i>+0.01</i>	35.42	35.28 <i>+0.14</i>
12	43.75	46.98 <i>-3.23</i>	31.11	31.11 <i>-3.33</i>	30.39	30.57 <i>-0.18</i>	33.28	33.39 <i>-0.11</i>
13	36.84	35.87 <i>+0.98</i>	20.61	20.61 <i>+0.60</i>	28.73	28.74 <i>-0.01</i>	35.32	35.49 <i>-0.17</i>
14	50.35	51.37 <i>-1.02</i>	30.95	31.55 <i>-0.60</i>	28.89	28.88 <i>+0.01</i>	37.50	37.31 <i>+0.19</i>
15	58.73	58.03 <i>+0.70</i>	35.76	35.31 <i>+0.45</i>	31.37	31.37 <i>+0.00</i>	37.84	37.95 <i>-0.11</i>
16	49.12	45.43 <i>+3.69</i>	33.76	30.16 <i>+3.60</i>	30.75	30.57 <i>+0.18</i>	33.28	33.25 <i>+0.03</i>

Les valeurs en italique représentent l'écart entre le modèle et la valeur obtenue expérimentalement

Le calcul des seuils de signification pour chacun des coefficients montre que les modèles peuvent s'écrire sous forme simplifiée :

$$R_P = 47.17 + 23.65X_2^2$$

$$R_{MS} = 31.20 + 14.21X_2 - 11.81X_2^2$$

$$P_F = 30.53 + 1.18X_1 - 0.86X_1^2 + 1.80X_1X_2$$

$$MS_{RS} = 33.44 + 2.56X_2 + 2.22X_1^2 + 2.50X_2^2$$

En première approximation, il semble que la température n'ait pas d'influence significative sur le rendement d'extraction des protéines, ni sur la teneur en MS du résidu. Ainsi, le ratio L/S semble être le facteur le plus influent.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

ADAPA P.K., SCHOENAU G.J. et ARINZE E.A., 2004. Fractionation of alfalfa into leaves and stems using three-pass rotary drum dryer. *Biosystems Engineering*, **91** (4), pp 455-463

AIMAR P., BACCHIN P. et MAUREL A., 2010. Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Techniques de l'Ingénieur*, **J2789** pp 1-24

ALVES-RODRIGUES A. et SHAO A., 2004. The science behind lutein. *Toxicology Letters*, **150** pp 57-83

AMALIA KARTIKA I., 2005. Nouveau procédé de fractionnement des graines de tournesol : expression et extraction en extrudeur bi-vis, purification par ultrafiltration de l'huile de tournesol. *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

ANDERSEN M. et KIEL P., 2000. Integrated utilisation of green biomass in the green biorefinery. *Industrial Crops and Products*, **11** pp 129-137

ARLABOSSE P., BLANC M., KERFAI S. et FERNANDEZ A., 2011. Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part I: Effects of processing conditions on the dewatering kinetics. *Chemical Engineering Journal*, **168** pp 586-592

ATHALYE A.M., GIBBS S.J. et LIGHTFOOT E.N., 1992. Predictability of chromatography protein separations: Study of size-exclusion media with narrow particle size distributions. *Journal of Chromatography A*, **589** (1), pp 71-85

- B -

BAHR J.T., BOURQUE D.P. et SMITH H.J., 1977. Solubility properties of Fraction I proteins in maize, cotton, spinach and tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **25** (4), pp 783-789

BAKER R.W., 2004. Membrane technology and applications. *Wiley and Sons, Ltd*, England, 538 p

BAM L., CLELAND J.L. et RANDOLPH T.W., 1996. Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: stabilization with surfactants. *Biotechnology Progress*, **12** pp 801-809

BARBEAU W.E. et KINSELLA J.E., 1986. Physical behavior and functional properties: relationship between surface rheology and foam stability of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase. *Colloids and surfaces*, **17** pp 169-183

BELFORT G., DAVIS R.H. et ZYDNEY A.L., 1994. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, **96** (1-2), pp 1-58

BELLEMARE B., 2003. Etude des réactions de transfert d'acyles : synthèse catalytique des esters gras en présence de lipases de microorganismes chez les plantes oléoprotéagineuses. *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique, Toulouse.

BERGINS C., 2003. Kinetics and mechanism during mechanical/thermal dewatering of lignite. *Fuel*, **82** pp 355-364

BETSCHART A.A., 1974. Nitrogen solubility of alfalfa protein concentrate as influenced by various factors. *Journal of Food Science*, **39** (6), pp 1110-1115

BHATTACHARYA A.K. et VENKOBACHAR C., 1984. Removal of cadmium by low cost adsorbent. *Journal of American Civil Engineering*, **110** pp 110-116

BLIGH E.G. et DYER W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, **37** pp 911-917

BOURGEOIS J., LAFOREST V. et HAUSLER R., 2006. Traitements physico-chimiques des déchets industriels liquides. *Techniques de l'Ingénieur*, Réf **J3965** pp 1-20

BOUROCHE A. et LE BARS M., 1994. Techniques de séparation par membranes : vocabulaire français-anglais-allemand. *Editions Quae*, Paris, France, 62 p

BRUN J.P., 1988. Procédés de séparation par membranes. Transport, techniques membranaires, applications. *Edition Masson*, ISBN : 2-225-81573-9, 288 p

- C -

CAUSSERAND C., 2006. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - caractérisation des membranes. *Techniques de l'ingénieur*, pp 1-16

CHABANI M., AMRANE A. et BENSMAILI A., 2006. A kinetic modelling of the adsorption of nitrates by ion-exchange resin. *Chemical Engineering Journal*, **125** pp 111-117

CHENOU C., 1993. Cinétique et modélisation de l'adsorption de la Sérum Albumine Bovine en chromatographie d'échange d'ions. *Thèse de Doctorat*, INP Lorraine.

CHOUDHURY G.S., GOGOI B.K. et OSWAT A.J., 1998. Twin screw extrusion of pink salmon muscle and rice flour blends: effects of kneading elements. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **7** pp 69-91

CLAYTON S.A., SCHOLES O.N., HOADLEY A.F.A., WHEELER R.A., MCINTOSCH M.J. et HUYNH D.Q., 2006. Dewatering of biomaterials by mechanical thermal expression. *Drying Technology*, **24** pp 819-834

CLAYTON S.A., WHEELER R.A. et HOADLEY A.F.A., 2007. Pore destruction resulting from mechanical thermal expression. *Drying Technology*, **25** pp 533-546

COOP DE FRANCE. *La filière luzerne déshydratée*. 2009 [cited 2009]; Available from: <http://www.coopdefrance.coop/fr/30/deshydratation-luzerne>.

COULSON J.M. et RICHARDSON J.F., 1979. Chemical engineering - Volume three: Chemical Reactor Design, Biochemical Reaction Engineering including Computational Techniques and Control. *Pergamon Press*, 648 p

COZZI G., BURATO G.M., BERZAGHI P. et ANDRIGHETTO I., 2002. Evaluation of pellets from different industrial processing of dehydrated lucerne in dairy cattle feeding. *Animal Feed Science and Technology*, **99** pp 13-24

CUI Z.F. et WRIGHT K.I.T., 1994. Gas-liquid two phase crossflow ultrafiltration of BSA and dextran solutions. *Journal of Membrane Science*, **90** pp 183-189

- D -

DADAY H.V. et WHITECROSS M.I., 1983. Isoelectric focusing of ribulose biphosphate carboxylase from Lucerne and spinach. *Science Tools*, **30** pp 11-14

DAGNELIE P., 1998. Statistique théorique et appliquée. Tome 2 : Inférence statistique à une et deux dimensions. *De Boeck Université*, p

DE DARDEL F., 1998a. Echange d'ions : principes de base. *Techniques de l'Ingénieur*, **J 2783** pp 1-18

DE DARDEL F., 1998b. Echange d'ions : technologies d'applications. *Techniques de l'Ingénieur*, **J 2784** pp 1-18

DI JESO F., 1968. Ammonium sulfate concentration conversion nomograph for 0°. *The Journal of Biological Chemistry*, **243** (8), pp 2022-2023

DIEN B.S., JUNG H.J.G., VOGEL K.P., CASLER M.D., LAMB J.F.S., ITEN L., MICHELL R.B. et SARATH G., 2006. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*, **30** pp 880-891

DILLY J.D. et DE MATHAN O., 1978. L'extraction des protéines de luzerne. *Industries Agricoles et Alimentaires*, **2** pp 65-72

DIRECTIVE EUROPÉENNE 95/45/CE, 1995. Critères de pureté spécifiques pour les colorants pouvant être utilisés dans les denrées alimentaires. *JO L 226 du 22.9.1995*, pp 1

DOUILLARD R., 1985. Propriétés biochimiques et physicochimiques des protéines de feuilles. In *Protéines Végétales*, coord **B. GODON**. Tech et Doc - Lavoisier, Paris, pp 211-244

DOUILLARD R. et DE MATHAN O., 1994. Leaf protein for food use: potential of Rubisco. In *Developing sources of food proteins*. B.J.F. Hudson, Chapman & Hall, London, pp 307-342

DOUILLARD R. et SONGVILAY KONGPHET T., 1990. Propriétés tensioactives de la ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase de luzerne native et maltolysée. *Science des Aliments*, **10** pp 175-187

- E -

EAKIN D.E., SINGH R.P., KOHLER G.O. et KNUCKLES B., 1978. Alfalfa protein fractionation by ultrafiltration. *Journal of Food Science*, **43** (2), pp 544-547

ELLIS R.J., 1979. The most abundant protein in the world. *Trends in Biochemical Sciences*, **4** pp 241-244

EVERBERG H., LEIDING T., SCHIÖTH A., TJERNELD F. et GUSTAVSSON N., 2006. Efficient and non-denaturing membrane solubilization combined with enrichment of membrane protein complexes by detergent/polymer aqueous two-phase partitioning for proteome analysis. *Journal of Chromatography A*, **1122** (1-2), pp 35-46

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 de doctorat*, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

- F -

FAO, Food energy - methods of analysis and conversion factors. *FAO Food and Nutrition Paper*, ISSN **0254-4725** (77), pp 1-92

FAO STAT. *Food and agriculture organization of the United Nations*. 2010 [cited 2010]; Available from: <http://faostat.fao.org/>.

- G -

GARCÍA-VALENZUELA X., GARCÍA-MOYA E., RASCÓN-CRUZ Q., HERRERA-ESTRELLA L. et AGUADO-SANTACRUZ G.A., 2005. Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *Journal of Plant Physiology*, **162** (6), pp 650-661

GARCIA J., PEREZ-ALBA L., ALVAREZ C., ROCHA R., RAMOS M. et BLAS C.D., 1995. Prediction of the nutritive value of lucerne hay in diets for growing rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, **54** pp 33-44

GAUTIER D. et LE GALL A., 2003. La luzerne : culture - utilisation. *Gnis, Arvalis - Institut du Végétal, Institut de l'Elevage*, 64 p

GNIS. (*Groupement National Interprofessionnel des Semences et plantes*). 2009 [cited 2009]; Available from: <http://www.gnis-pedagogie.org/>.

GODON B., 1985. *Protéines Végétales*. Paris, 629 p

GOGOI B.K., CHOUDHURY G.S. et OSWALT A.J., 1996. Effects of location and spacing of reverse screw and kneading element combination during twin-screw extrusion of starchy and proteinaceous blends. *Food Research International*, **29** (5-6), pp 505-512

GOKULAKRISHNAN N., PANDURANGAN A. et SINHA P.K., 2006. Effective uptake of decontaminating agent (citric acid) from aqueous solution by mesoporous and microporous materials: An adsorption process. *Chemosphere*, **63** (3), pp 458-468

GOLAWSKA S. et ŁUKASIK I., 2009. Acceptance of low-saponin lines of alfalfa with varied phenolic concentrations by pea aphid (Homoptera: Aphididae). *Biologia*, **64** (2), pp 377-382

GONZALEZ J., FARIA-MARMOL J., RODRIGUEZ C.A. et ALVIR M.A., 2001. Effects of stage of harvest on the protein value of fresh lucerne for ruminants. *Reproduction Nutrition Development*, **41** pp 381-392

- H -

HAHN-HAGERDAL B., GALBE M., GROWA-GRAUSLUND M.F., LIDEN G. et ZACCHI G., 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Review TRENDS in Biotechnology*, **24** (12), pp 549-556

HAMM M., DEBEIRE P., MONTIES B. et CHABBERT B., 2002. Effect of industrial processing on alfalfa cell walls. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **82** pp 1806-1815

HERNANDEZ A., HERNANDEZ T. et MARTINEZ C., 1998. Production and chemical composition of alfalfa protein concentrate obtained by freezing. *Animal Feed Science and Technology*, **72** pp 169-174

HERNANDEZ T., HERNANDEZ A. et MARTINEZ C., 1991. Polyphenols in alfalfa leaf concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** pp 1120-1122

HO Y.S. et MCKAY G., 1999a. Batch Lead(II) Removal From Aqueous Solution by Peat: Equilibrium and Kinetics. *Process Safety and Environmental Protection*, **77** (3), pp 165-173

HO Y.S. et MCKAY G., 1999b. Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochemistry*, **34** (5), pp 451-465

HOPKINS W.G. et EVRARD C.-M., 2003. *Physiologie végétale*, traduction de la deuxième édition américaine par Serge Rambour. *De Boeck Supérieur*, 532 p

- J -

JAMESON G.W., 1987. Manufacture of Cheddar from milk concentrated by ultrafiltration: the development and evaluation of a process. *Food Technology in Australia*, **39** (12), pp 560-564

JONES M.N., 1999. Surfactants in membrane solubilisation. *International Journal of Pharmaceutics*, **177** (2), pp 137-159

JUNGBAUER A., 2005. Chromatographic media for bioseparation. *Journal of Chromatography A.*, **1065** pp 3-12

- K -

KAMM B. et KAMM M., 2004. Biorefinery - Systems. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **18** (1), pp 1-6

KAPEL R., RAHHOU A., LECOUTURIER D., GUILLOCHON D. et DHULSTER P., 2006. Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. *Process Biochemistry*, **41** pp 1961-1966

KATAKAM M., BELL L.N. et BANGA A.K., 1995. Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **84** (6), pp 713-716

KERFAI S., 2011. Etude d'un procédé chromatographique d'échange d'ions pour la séparation de la Ribulose 1.5-bisphosphate Carboxylase Oxygénase (Rubisco) dans le cadre de la valorisation d'un sous produit agricole. *Thèse de doctorat*, Université de Toulouse, Toulouse.

KERFAI S., FERNANDEZ A., MATHÉ S., ALFENORE S. et ARLABOSSE P., 2011. Production of green juice with an intensive thermo-mechanical fractionation process. Part II: Effect of processing conditions on the liquid fraction properties. *Chemical Engineering Journal*, **167** pp 132-139

KNUCKLES B.E., DE FREMERY D., BICKOFF E.M. et KOHLER G.O., 1975. Soluble protein from alfalfa juice by membrane filtration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **23** (2), pp 209-212

KNUCKLES B.E. et KOHLER G.O., 1982. Functional properties of edible protein concentrates from alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30** pp 748-752

KOSCHUH W., POVODEN G., THANG V.H., KROMUS S., KULBE K.D., NOVALIN S. et KROTSCHHECK C., 2004. Production of leaf protein concentrate from ryegrass (*Lolium perenne x multiflorum*) and alfalfa (*Medicago sativa subsp. sativa*). Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration. *Desalination*, **163** pp 253-259

KUBERKAR V.T. et DAVIS R.H., 2001. Microfiltration of protein-cell mixtures with crossflushing or backflushing. *Journal of Membrane Science*, **183** pp 1-14

- L -

LADISCH M.R., 2001. Bioseparations Engineering - Principles, Practice and Economics. *Wiley Interscience*, 735 p

LAGERGEN S., 1898. Zur Theorie der sogenannten Adsorption gelöster Stoffe. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. Handlingar*, **24** (4), pp 1-39

LAMSAL B.P., KOEGEL R.G. et GUNASEKARAN S., 2007. Some physicochemical and functional properties of alfalfa soluble leaf proteins. *LWT*, **40** pp 1520-1526

LE MAIRE M., CHAMPEIL P. et MØLLER J.V., 2000. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1508** (1-2), pp 86-111

LEVESQUE D. et RAMBOURG J.-C., 2002. Method for processing the raw juice produced from a protein-rich leaf material such as alfalfa, *WO/2002/058482*, France.

LIBOUGA D.G., AGUIÉ-BÉGHIN V. et DOUILLARD R., 1996. Thermal denaturation and gelation of rubisco: effects of pH and ions. *International Journal of Biological Macromolecules*, **19** (4), pp 271-277

LIVINGSTON A.L., KNUCKLES B.E., EDWARDS R.H., DE FREMERY D., MILLER R.E. et KOHLER G.O., 1979. Distribution of saponin in alfalfa protein recovery systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **27** (2), pp 362-365

LODISH H., BERK A., MATSUDAIRA P., KAISER C.A. et DARENLL J., 2004. Les biomembranes et l'architecture de la cellule. In *Biologie moléculaire de la cellule*, 5ième édition. de boeck, pp 149-196

LOEB S. et SOURIRAJAN S., 1962. Sea Water Demineralization by Means of an Osmotic Membrane. *Advances in Chemistry Series*, **38** pp 117-132

LU C.D. et JORGENSEN N.A., 1987. Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants. *The Journal of Nutrition*, **117** pp 919-927

LUZERNES.ORG. 2009 [cited 2009]; Available from: <http://www.luzernes.org/>.

- M -

- MAHMOUD A., FERNANDEZ A., CHITUCHI T.-M. et ARLABOSSE P.**, 2008. Thermally assisted mechanical dewatering (TAMD) of suspensions of fine particles: Analysis of the influence of the operating conditions using the response surface methodology. *Chemosphere*, **72** (11), pp 1765-1773
- MARÉCHAL P.**, 2001. Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis : obtention d'agromatériaux. *Thèse de Doctorat*, INP Toulouse.
- MARTELLI F.G.**, 1983. Twin-screw extruders: a basic understanding. *Vans Nostrand Reinhold Company*, New York, 128 p
- MATHIEU D. et PHAN-THAN-LUU R.**, 1992. New Efficient Methodology for Research using Optimal Design (NEMROD) Software. *LPRAI*, Centre St Gerome, University of Aix-Marseille.
- MCKAY G., EL GEUNDI M. et NASSAR M.M.**, 1988. External mass transport processes during the adsorption of dyes onto bagasse pith. *Water Research*, **22** (12), pp 1527-1533
- MEIRELES M., BESSIERES A., ROGISSART I., AIMAR P. et SANCHEZ V.**, 1995. An appropriate molecular size parameter for porous membranes calibration. *Journal of Membrane Science*, **103** pp 105-115
- MEUNIER F. et SUN L.**, 2003. Adsorption - aspects théoriques. In *Techniques de l'Ingénieur, Traité Génie des Procédés*. **J 2 730**, pp 1-15
- MILLER R.E., FREMERY D.D., BICKOFF E.M. et KOHLER G.O.**, 1975. Soluble protein concentrate from alfalfa by low-temperature acid precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **23** (6), pp 1177-1179
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE**. *Bureau des Statistiques sur les Productions et les Comptabilités Agricoles*. 2009-2010 semi définitive [cited 2011 2 décembre]; Available from: http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_saa2011T3a-2.pdf.
- MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION**, 1995. Manual of ion exchange resins and synthetic adsorbent - I. *DIAION : Ion Exchange Resin Manual*, 192 p
- MOREAU F. et PRAT R.** *La photosynthèse*. 2008 [cited]; Available from: www.snv.jussieu.fr.
- MORES W.D., BOWMAN C.N. et DAVIS R.H.**, 2000. Theoretical and experimental flux maximization by optimization of backpulsing. *Journal of Membrane Science*, **165** pp 225-236
- MOUSSARD C.**, 2006. Biochimie structurale et métabolique. *Ed. De Boeck Université*, Bruxelles, Belgique, 356 p

- N -

N'DIAYE S. et 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** pp 13-18

N'DIAYE S., RIGAL L., GOYETTE C. et VIDAL P., 1996. Extraction of hemicelluloses from poplar using twin-screw reactor: influence of the main factors. *Developments in Thermomechanical Biomass Conversion. IEA Bioenergy*, **1** pp 756-764

NOVALIN S. et ZWECKMAIR T., 2009. Renewable resources - green biorefinery: separation of valuable substances from fluid-fractions by means of membrane technology. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*, **3** pp 20-27

- O -

O'DONNELL C., KOEGEL R.G. et STRAUB R.J., 1997. Concentration of phytase in alfalfa juice by ultrafiltration. *US Dairy Forage Research Center, 1997 Research Summaries* pp 23-24

- P -

PAGLIERO C., OCHOA N., MARCHESE J. et MATTEA M., 2004. Vegetable oil degumming with polyimide and polyvinylidene fluoride ultrafiltration membrane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **79** pp 148-152

PETSKO G.A., RINGE D., SANLAVILLE C. et CHARMOT-BENSIMON D., 2004. Structure et fonctions des protéines. *Ed De Boeck Université, Bruxelles, Belgique*, 191 p

PORRA R.J., THOMPSON W.A. et KRIEDEMANN P.E., 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **975** pp 384-394

PRÉVOT-D'ALVISE N., LESUEUR-LAMBERT C., FERTIN A., DHULSTER P. et GUILLOCHON D., 2004. Continuous enzymatic solubilization of alfalfa proteins in an ultrafiltration reactor. *Enzyme and Microbial Technology*, **34** pp 380-391

PRÉVOT-D'ALVISE N., LESUEUR-LAMBERT C., FERTIN B., DHULSTER P. et GUILLOCHON D., 2000. Hydrolysis and large scale ultrafiltration study of alfalfa protein concentrate enzymatic. *Enzyme and Microbial Technology*, **27** pp 286-294

- R -

- RÉMIGY J.C. et DESCLAUX S.**, 2007. Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Techniques de l'Ingénieur*, **Réf J2791** pp 1-20
- RENGARAJ S. et MOON S.M.**, 2002. Kinetics of adsorption of Co(II) removal from water and wastewater by ion exchange resins. *Water Research*, **36** (7), pp 1783-1793
- REPETTO J.L., GONZALEZ J. et CARJAVILLE C.**, 2000. Effect of dehydration on ruminal degradability of lucerne. *Annales de Zootechnies* **49** pp 113-118
- RIGAL L.**, 1997. Technologie d'extrusion bi-vis et fractionnement de la matière végétale. *40 ans d'extrusion bi-vis chez Clextal, Firminy, France*, pp 26-33
- RIGAL L.**, 2000. *Twin-screw technology, a new tool for fractionation, and thermo-mechano-chemical conversion of the agroressources in Proceedings of the first World Conference on Biomass for Energy and Industry*. Sevilla, Spain, Science Publishers.
- ROUSTEL S.**, 2000. Cuisson-extrusion des aliments. *Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire*, **F 3120** pp 1-8

- S -

- SALVUCCI M.E., OSTERYOUNG K.W., GRAFTS-BRANDER S.J. et VIERLING E.**, 2001. Exceptional sensitivity of Rubisco activase to thermal denaturation in vitro and in vivo. *Plant Physiology*, **127** pp 1053-1064
- SAMAC D.A., JUNG H.-J.G. et LAMB J.F.S.**, 2006. Development of Alfalfa (*Medicago sativa L.*) as a feedstock for production of ethanol and other bioproducts. In *Alcoholic Fuels*. CRC Press, S. D. MINTEER, pp 79-99
- SAXENA A., KUMAR B.P.T.M. et SHAHI V.K.**, 2008. Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advances in Colloid and Interface Science*, **145** (1-2), pp 1-22
- SEDDON A.M., CURNOW P. et BOOTH P.J.**, 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1666** pp 105-117
- SEN S., MAKKAR H.P.S. et BECKER K.**, 1998. Alfalfa Saponins and Their Implication in Animal Nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** (1), pp 131-140
- SHEEN S.J.**, 1991. Comparison of chemical and functional properties of soluble leaf proteins from four plant species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** pp 681-685
- SHERWOOD T.K., PIGFORD R.L. et WILKE C.R.**, 1975. Mass Transfer. *McGraw-Hill*, New York, p
- SILVESTRE F., RIGAL L., LEYRIS J. et GASET A.**, 1999. Colle à l'eau à base d'extrait protéique végétal et procédé de préparation, *EP 0997513*, France.

SPENCER R.R., MOTTOLA A.C., BICKOFF E.M., CLARK J.P. et KOHLER G.O., 1971. The PRO-XAN process: the design and evaluation of a pilot plant system for the coagulation and separation of the leaf protein from alfalfa juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19** (3), pp 504-507

SREENATH H., MOLDES A.B., KOEGEL R.G. et STRAUB R.J., 2001a. Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92** (6), pp 518-523

SREENATH H.K., KOEGEL R.G., MOLDES A.B., JEFFRIES T.W. et STRAUB R.J., 1999. Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment. *Process Biochemistry*, **35** (1), pp 33-41

SREENATH H.K., KOEGEL R.G., MOLDES A.B., JEFFRIES T.W. et STRAUB R.J., 2001b. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. *Process Biochemistry*, **36** (12), pp 1199-1204

STACEY G., LIBAULT M., BRECHENMACHER L., WAN J. et MAY G.D., 2006. Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, **9** pp 110-121

SUBRAMANIAN S., STACEY G. et YU O., 2007. Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation. *TRENDS in Plant Science*, **12** (7), pp 282-285

- T -

THORNBER J.P., 1975. Chlorophyll-proteins: Light-harvesting and reaction center components of plants. *Annual Review of Plant Physiology*, **26** pp 127-158

TRÉMILLON B., 1965. Les séparations par les résines échangeuses d'ions. *Gauthier-Villars*, Paris, 390 p

TYN M.Y. et GUSEK T.W., 1990. Prediction of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, **35** pp 327-338

- V -

VAN DER VEEN J.W. et OLCOTT H.S., 1964. Lipids of dehydrated alfalfa (*Medicago sativa*). *Agricultural and Food Chemistry*, **12** (3), pp 287-289

VAN SOEST P.J., 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feed: determination of plant cell wall constituents. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **46** pp 829-835

VAN SOEST P.J. et WINE R.H., 1968. Determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **51** (4), pp 780-784

VIGNES P. et VIGNES D., 2007. L'herbier des plantes sauvages. *Larousse*, France, 576 p

VOET D. et VOET G.J., 2005. Biochimie, traduction de la 3ème édition américaine par G. Rousseau et L. Domenjoud. *2ème édition De Boeck et Larcier*, Bruxelles, 1600 p

- W -

WANG J., ZHANG Q.-H., WANG Z.-H. et LI H.-M., 2009. Determination of Major Bovine Milk Proteins by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **37** (11), pp 1667-1670

WANG J.C. et KINSELLA J.E., 1976. Functional properties of novel protein: Alfalfa leaf proteins. *Journal of Food Science*, **41** (2), pp 286-292

WANG W., WANG Y.J. et WANG D.Q., 2008. Dual effects of Tween 80 on protein stability. *International Journal of Pharmaceutics*, **347** (1-2), pp 31-38

WASSERMAN B.P., WAN L. et CHAN K., 1992. Molecular transformations of starch and protein during twin-screw extrusion processing of cornmeal. In *Food extrusion Science and Technology*. Dekker M. Inc. Ed., New York, pp 325-333

WATTIAUX M.A. et KARG K.L., 2004. Protein level for alfalfa and corn silage-based diets : I. Lactational response and milk urea nitrogen. *Journal of Dairy Science*, **87** pp 3480-3491

WEBER W.J. et MORRIS J.C., 1963. Kinetics of adsorption on carbon from solution. *Journal of Sanitary Engineering Division: Proceedings of the American Society of Civil Engineers*, **SA2** pp 31-59

WILDMAN S.G. et BONNER J., 1947. Proteins of green leaves I. Isolation, enzymatic properties and auxin content of spinach cytoplasmic proteins. *Archives of Biochemistry*, **14** pp 381-413

WILDMAN S.G. et KWANYUEN P., 1982. Method for preparation of Fraction I protein and by-products thereof, *US Patent 4347324*

- Y -

YIN Y., HAN Y. et LIU J., 2007. A novel protecting method for visual green color in spinach puree treated by high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, **79** pp 1256-1260

- Z -

ZEITOUN R., 2011. Procédés de fractionnement de la matière végétale - Application à la production de polysaccharides du son et de la paille de blé. *Thèse de doctorat*, Institut National Polytechnique de Toulouse, Toulouse.

