HAL open science

Nouvelles approches pour la valorisation des graines de moutarde riches en glucosinolates dans un concept de bioraffinerie

Mathieu Hébert

To cite this version:

Mathieu Hébert. Nouvelles approches pour la valorisation des graines de moutarde riches en glucosinolates dans un concept de bioraffinerie. Génie des procédés. Université de Technologie de Compiègne, 2020. Français. NNT : 2020COMP2552 . tel-02957139

HAL Id: tel-02957139

https://theses.hal.science/tel-02957139v1

Submitted on 4 Oct 2020

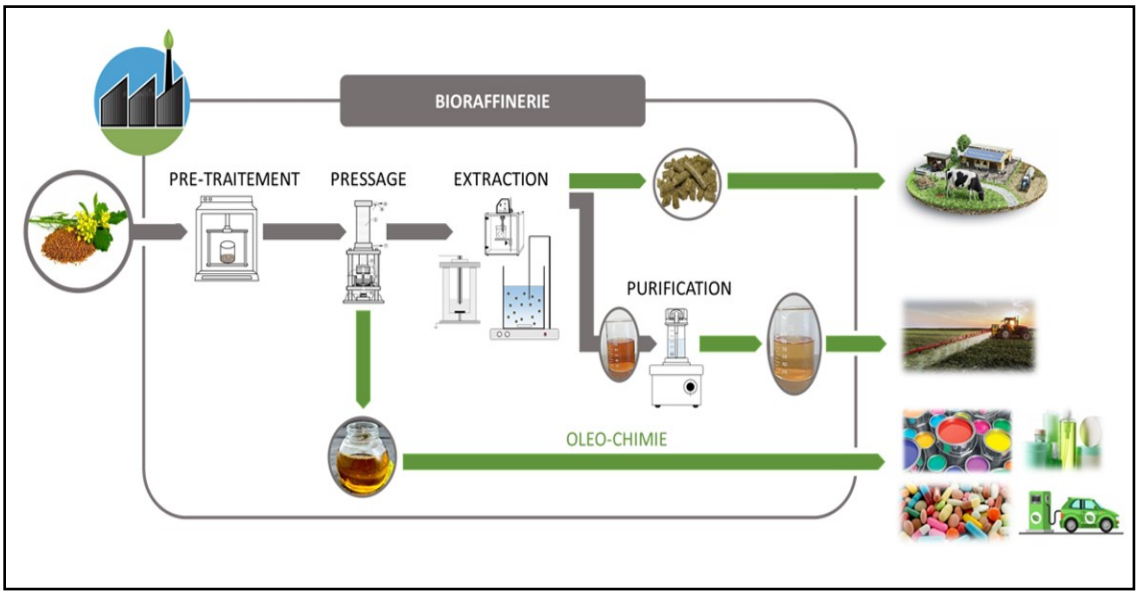
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Par **Mathieu HÉBERT**

Nouvelles approches pour la valorisation des graines de moutarde riches en glucosinolates dans un concept de bioraffinerie

Thèse présentée
pour l'obtention du grade
de Docteur de l'UTC



Soutenue le 23 juin 2020
Spécialité : Génie des Procédés : Transformations intégrées de la matière renouvelable (EA-4297)

D2552

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Technologie de Compiègne

Spécialité : Génie des Procédés

Nouvelles approches pour la valorisation des graines de moutarde riches en glucosinolates dans un concept de bioraffinerie

Par **Mathieu HEBERT**

Soutenue le 23 Juin 2020 devant le jury composé de :

Pr. Patricia ARLABOSSE	Rapporteur	Ecole des Mines Albi, France
Pr. Krasimir DIMITROV	Rapporteur	Ecole polytechnique universitaire de Lille, Lille, France
Pr. Aïssa OULD-DRIS	Président du jury	Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France
M. Jérôme LE NOTRE	Examinateur	SAS PIVERT, Venette, France
Pr. Eugène VOROBIEV	Directeur de thèse	Université de Technologies de Compiègne, Compiègne, France
Dr. Houcine MHEMDI	Co-directeur de thèse	Ecole Supérieure de Chimie Organique et Minérale, Compiègne, France

Remerciements

Je commencerai ce manuscrit en voulant remercier toutes les personnes qui m'ont suivi, aidé, accompagné et encouragé durant cette aventure de trois ans.

En tout premier lieu, je tiens à adresser ma reconnaissance à l'institut PIVERT qui m'a donné l'opportunité de travailler sur ce sujet de recherche plus que passionnant tant sur le plan scientifique, technologique qu'idéologique. J'exprime ma gratitude à **Jérôme Le Nôtre**, conducteur de projet et responsable du programme GENESYS de m'avoir fait confiance en me permettant de devenir acteur du progrès vers la bioéconomie, et avec qui j'ai le plaisir de continuer à collaborer aujourd'hui.

Je tiens à remercier très sincèrement mes deux directeurs de thèse : **Eugène Vorobiev** pour sa disponibilité, ses conseils et ses qualités tant humaines que professionnelles qui ont contribués à l'achèvement de ce travail ; mon seul regret est de ne pas avoir pu concrétiser notre petit projet personnel qui était de créer un trombinoscope sportif de l'équipe ; et **Houcine Mhemdi** pour ses encouragements, son accompagnement et la grande implication dont il a fait preuve dans ce projet.

Mes remerciements s'adressent également aux différents partenaires du projet que j'ai eu l'honneur de côtoyer à travers: **Alain Quinsac** (Terres Inovia) pour avoir sélectionné les graines utilisées dans le cadre de cette étude et pour m'avoir assuré une formation dans son laboratoire à Pessac qui m'a permis d'entamer cette thèse dans les meilleures conditions, **Patrick Carré** et **Morgane Citeau** (OLEAD) pour nos rencontres et échanges fructueux, **Christian Steinberg** (UMR/INRA Dijon), **Remi Saurel** (UMR PAM/Agro Sup Dijon), ainsi que **Jérôme Gervais** (Chambre d'Agriculture Côte d'Or) pour nous avoir fourni la matière première.

Je remercie également les professeurs **André Pauss** et **Isabelle Pezron** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire TIMR, en tant que stagiaire dans un premier temps puis doctorant.

Je tiens à exprimer ma gratitute et mon respect aux deux rapporteurs : les professeurs **Patricia Arlabosse** et **Krasimir Dimitrov** qui m'ont fait l'honneur de lire et juger ce travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je remercie vivement le professeur **Aïssa Ould-Dris** pour avoir accepté de présider le jury de soutenance de cette thèse.

J'adresse bien entendu mes remerciements à tous les membres de l'UTC, collègues comme amis avec qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Aux anciens du « golden age » de l'équipe TAI que j'ai connu au tout début : **Marwa Brahim**, **Fouad Almohammed**, **Olexii Parniakov**, **Pierre Adda**, **Lucie Drévillon** et surtout **Laurine Bogaert** pour qui je serai sans doute son éternel stagiaire et qui est pratiquement à l'origine de ma présence dans le vaste monde de la valorisation du naturel ; et bien sûr les doctorants et post-doctorants qui m'ont accompagné dans les laboratoires (et ailleurs) : **Sally El-Kantar**, **Sarra Tradent**, **Cayiun Liu**, **Morad Chadni**, **Lu Wang**, **Rui Zhang**, **Marina Al-Daccache, Nabila Bourai** ; aux dernières arrivées : **Kaidi Peng**, **Yancie Gagnon et Christa Aoude** à qui je souhaite bon courage pour la fin de leur thèse et aux autres doctorants (bien qu'également presque tous docteurs au jour d'aujourd'hui) : **Benjamin Dussaussoy**,

Doriane Vesperini, **Liu Chunmei**, **Lorine Le Priol**, **Franco Otaola** et **Remy Bois**, partenaire occasionnel à la salle de sport. Je salue également les enseignants-chercheurs de l'équipe TAI : **Nabil Grimi**, **Nadia Boussetta**, **Oliver Bals**, **Anissa Khelfa** et **Mohamed Koubba** dont la gentillesse, la bonne humeur et la générosité dans leur partage de savoir-faire et de connaissances ont participé à la bonne ambiance intra-laboratoires.

Je remercie bien évidemment les deux stagiaires ESCOM que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont su m'apporter leurs propres connaissances dans les travaux effectués : **Emmanuel Serra** et **Charles Torolindo**, deux potentiels futurs doctorants.

J'adresse bien entendu une salutation chaleureuse à tous les membres du personnel qui ont contribués de près ou de loin au déroulement de cette thèse : **Hervé Leclerc**, **Bruno Dauzat**, **Michael Lefebvre**, **Denis Luart**, **Erwann Guénin**, **Maurice Nonus**, **Frederic Delbecq**, **Frederic Nadaud**, **Jeremy Terrien**, **Antoine Fayeulle**, **Franck Moreau**.

Pour leurs différentes implications dans ce travail, je tiens à remercier nos administratives de l'équipe de choc du secrétariat GPI : **Lysiane Tauveron**, **Françoise Fournier**, **Véronique Desseaux** et l'irremplaçable **Muriel Gromard**, ainsi que **Marie Lotiquet** de l'Ecole Doctorale.

Je voudrais enfin remercier mes parents pour m'avoir encouragé et soutenu dans cette aventure. Et bien entendu une pensée chaleureuse pour **Jessica**, pour m'avoir accompagné, soutenu, motivé et surtout « supporté » (dans tous les sens du terme) dans les moments les plus difficiles. En dernier lieu, une petite salutation à tous mes amis de promotion de l'INSA pour lesquels ce manuscrit confirmera que je ne travaillais pas sur la « patate »…

Résumé

Ce travail de thèse est dedié à la mise en place d'une stratégie de valorisation optimale et raisonnée des cultures intermédiaires piège à nitrates de B. *juncea* (moutarde brune) dans un concept de bioraffinerie et de développement durable. Les graines de moutarde sont riches en huile (>35%) mais également en glucosinolates (≈ 120 µmol/g), facteurs antinutritionnels produisant de ce fait des tourteaux impropres à l'alimentation du bétail alors qu'ils sont riches en protéines de qualité. Ce travail de thèse a pour ambition de lever ce verrou en extrayant ces facteurs antinutritionnels de la graine pour exploiter leur activité biologique comme agent de contrôle des ennemis de cultures. Le schéma de bioraffinage proposé intègre les acteurs en amont et en aval de la chaîne de transformation. La première partie de travail a porté sur l'inactivation de la myrosinase, enzyme endogène responsable de l'hydrolyse des glucosinolates (sinigrine and gluconapine). Trois procédés d'inactivation ont été testés : (1) le chauffage conventionnel (2) le chauffage micro-ondes (MO) et (3) l'inactivation par CO_2 supercritique (SC-CO_2). Les trois procédés se sont montrés efficaces. Un chauffage à 80°C pendant 70 min a été retenu pour inactiver l'enzyme (98%) sans dégrader les composés d'intérêt (glucosinolates, protéines) tout en améliorant l'extractibilité de l'huile. Les graines ont ensuite subi un double pressage à 80 bars pendant 60 min à l'aide d'une presse hydraulique du laboratoire pour en extraire 84% d'huile et obtenir un tourteau enrichi en protéines (35.8-40.8%) et en glucosinolates intacts (144-158 µmol/g). La récupération des GSL a été entreprise en couplant une extraction hydro-alcoolique avec différents prétraitements (broyage, décharges électriques de haute tension, ultrasons) pour intensifier l'extraction des GSL tout en limitant la co-extraction des protéines. Une optimisation préliminaire d'extraction chimique a montré que 90% des GSL pouvaient être récupérés via une solution hydro-alcoolique d'éthanol (40% v:v) à 40°C sans altérer la qualité protéique du tourteau résiduel (36-40% protéines). Ces conditions viennent ainsi contrebalancer le procédé classique d'extraction/élimination des GSL par méthanol à haute température (75°C), contestable sur le plan environnemental, énergétique et sanitaire. L'extraction assistée par DEHT (U = 40 kV, t_{DEHT} = 3.5 ms) a permis d'extraire dans des conditions douces (T = 30°C, eau et à faible cout énergétique (233 kJ/kg)) la quasi-totalité des GSL (98 %) dans leur état intact tout en minimisant la co-extraction des protéines qui sont préservées dans le résidu solide. Enfin, la purification du jus riche en GSL a été étudiée selon deux voies : chromatographie d'échange d'ions (IEC) et ultrafiltration (UF). La récupération des glucosinolates par IEC a été optimisée en batch via l'utilisation d'une résine fortement basique (PA312LOH) qui a permis de séparer les GSL des protéines. 72.9% de la sinigrine a été récupérée après élution avec une solution de NaCl (1.0 M, 30°C, 300 rpm, 40 mL/g résine) avec une pureté 79.6%. Les expériences réalisées en dynamique (purification sur colonne) ont permis la récupération de 28% de la gluconapine (2.6 BV/h, pH 4.0). Le procédé membranaire (UF) a présenté de meilleures performances avec 98% et 60% de sinigrine et gluconapine récupérés respectivement dans un perméat à 90% de pureté (membrane PES 10 kDa, 5 bars, 500 rpm). L'extrait purifié obtenu par UF (90 %) riche en sinigrine (3.36 mg/ml) et en gluconapine (0.16 mg/ml) sera utilisée pour développer une formule phytobiotique qui sera utilisée en biofumigation. Le résidu solide détoxifié (<20 µmol GSL/g MS) et riche en protéines (~40%) pourra être valorisé en alimentation animale.

Mots-clés : moutarde brune, protéines, glucosinolates, myrosinase, huile, bioraffinerie, technologies émergentes, extraction, décharges électriques de haute tension, purification, ultrafiltration, résine échangeuse d'ions

Abstract

This thesis is specifically dedicated to the valorization of B. *juncea* (brown mustard) as catch-crops in order to develop innovative ways of valorization for the different components of mustard seeds (oil, meal, glucosinolates) for industrial and/or food applications according to the principles of biorefinery and in a sustainable development concept. The rich-erucic acid mustard oil could be valorized in oleochemistry for many applications (cosmetics, lubricants, biofuels etc.), the defatted cake could be an alternative and new source of high quality proteins for animal food and the extracted glucosinolates (sinigrin and gluconapin) could be very suitable for the development of a natural bio-pesticide instead of chemical pesticides.

Applications of different pretreatments were firstly applied on seeds in order to perform the intern inactivation of myrosinase, an enzyme that degrades glucosinolates by hydrolysis: conventional heating in bath-water, micro-waves (MW) and supercritical CO_2 (SC-CO_2). Heating seeds at 80°C for 70 min allowed efficient myrosinase inactivation (98%) without impact on other molecules (glucosinolates, proteins). The treatment resulted also in better oil expression performances.

Oil expression from treated seeds was then performed by carring out two successive pressing (80 bar, 60 min) with an hydraulic press to express 84% of oil and obtain a rich in proteins (35.8-40.8%) and intact glucosinolates (144-158 µmol/g) defatted cake.

Intensification of the extraction of glucosinolates was investigated meaning different pretreaments and processes: grinding, high-voltage electric discharges (HVED) and ultrasounds (US). Only green solvents were used for the extraction (water, ethanol). Preliminar optimization of chemical extraction resulted in selective extraction of 90% of GSL using an aqueous ethanol solution (40% v:v) at 40°C without affecting protein content from residual cake (36-40%). These conditions could be claimed as an effective alternative to the conventionel extraction protocol (75% methanol, 75°C). The assisted-extraction of GSL by HVED (U = 40 kV, t_{DEHT} = 3.5 ms) has performed the recovery of 98% of intact GSL in milder conditions (T = 30°C, water, Q_{DEHT} = 233 kJ/kg) by minimizing the co-extraction of proteins from meal.

Purification of crude juice was investigated meaning two different techniques: ion-exchange chromatography (IEC) and ultrafiltration (UF). GSL purification by IEC was preliminarly optimized in batch and proteins and GSL were separated meaning a strong basic resin (PA312LOH). 72.9% of sinigrine recovery was performed bu eluting with a NaCl solution (1.0 M, 30°C, 300 rpm, 40 mL/g resin) with a juice purity of 79.6%. Dynamic experiments allowed recovery of 28% of gluconapin (2.6 BV/h, pH 4.0). Membrane process (UF) showed better performances with the recovery of 98% and 60% of sinigrin and gluconapin respectively with a permeate purity of 90% by using PES membranes of 10 kDa (5 bars, 500 rpm). The purified juice (90%) rich in sinigrin (3.36 mg/ml) and gluconapin (0.16 mg/ml) could be used to develop a phytosanitory product for crop protection. The residual detoxified (<20 µmol GSL/g DM) and rich in proteins meal could be very suitable for animal feeding.

Key-words: brown mustard, proteins, glucosinolates, myrosinase, oil, biorefinery, emerging technologies, extraction, high-voltage electric discharges, purification, ultrafiltration, ion-exchange resin

Sommaire

I. CHAPITRE I 23

I.1. LA BIORAFFINERIE 24

I.1.1. Concept et définition générale 24

I.1.1.1. La biomasse et son potentiel de valorisation 24

I.1.1.2. Le système de bioraffinage 25

I.1.2. Classification générale des bioraffineries 26

I.1.2.1. Nature des produits visés 26

I.1.2.2. Nature de la matière première 26

I.1.2.3. Voies de conversion de la biomasse 27

I.1.3. La bioraffinerie oléagineuse 28

I.2. LA MOUTARDE BRUNE (BRASSICA JUNCEA) 30

I.2.1. Le genre Brassica 30

I.2.2. Caractéristiques de la plante 31

I.2.2.1. Répartition géographique et économie 31

I.2.2.2. Description de la plante 33

I.2.2.3. Ecologie et intérêt agronomique 34

I.2.3. Caractéristiques de la graine 34

I.2.3.1. Composition de l'huile 34

I.2.3.2. Composition en glucosinolates 34

I.2.3.3. Composition du tourteau 35

I.3. LES GLUCOSINOLATES 36

I.3.1. Structure chimique 36

I.3.2. Biosynthèse 37

I.3.3. Hydrolyse et produits de dégradation 39

I.3.4. Effets et utilisations des glucosinolates 40

I.3.4.1. Défense intrinsèques et propriétés biofumigantes 40

I.3.4.2. Effets thérapeutiques 41

I.3.4.3. Effets indésirables 41

I.4. INACTIVATION DE LA MYROSINASE 42

I.4.1. Stabilité thermique de la myrosinase 42

I.4.2. Procédés d'inactivation de la myrosinase 42

I.4.2.1. Traitements thermiques 42

I.4.2.2. Traitement à haute pression hydrostatique et CO_2 supercritique (SC-CO_2) 43

I.4.2.3. Inactivation par ultrasons 44

I.5. EXTRACTION DES GLUCOSINOLATES 46

I.5.1. Procédés conventionnels 46

I.5.2. Procédés alternatifs d'intensification d'extraction 47

I.5.2.1. Extraction assistée par ultrasons 47

I.5.2.2. Extraction assistée par décharges électriques de haute tension (DEHT) 48

I.6. TECHNOLOGIES DE PURIFICATION DES COMPOSES CELLULAIRES 53

I.6.1. Chromatographie échangeuse d'ions 53

I.6.1.1. Généralités 53
I.6.1.2. Principe 54
I.6.1.3. Applications 55
I.6.2. Procédés membranaires de purification 57
I.6.2.1. Principe général 57
I.6.2.2. Modes de filtration 57
I.6.2.3. Mécanismes de transport des solutés 59
I.6.2.4. Colmatage de la membrane 62
I.6.2.5. Stratégies de lutte contre le colmatage et nettoyage des membranes 64
I.7. CONCLUSION ET POSITIONNEMENT DU PROJET 66

II. CHAPITRE 2 69

II.1. SCHEMA GLOBAL DE VALORISATION 70
II.2. MATIERE VEGETALE 71
II.3. INACTIVATION DE LA MYROSINASE 72
II.3.1. Inactivation thermique de la myrosinase 72
II.3.1.1. Etude de la stabilité thermique de l'enzyme 72
II.3.1.2. Inactivation par chauffage conventionnel 72
II.3.1.3. Inactivation par chauffage micro-ondes 72
II.3.2. Inactivation par CO_2 supercritique 73
II.3.3. Mesure de l'activité enzymatique 74
II.3.3.1. Préparation de l'extrait enzymatique 74
II.3.3.2. Mesure de l'activité enzymatique 74
II.3.4. Caractérisation du comportement enzymatique 75
II.3.4.1. Cinétique Michaelienne 75
II.3.4.2. Modélisation des cinétiques d'inactivation 76
II.4. EXTRACTION DE L'HUILE 77
II.5. EXTRACTION DES GLUCOSINOLATES 78
II.5.1. Prétraitements 79
II.5.1.1. Broyage 79
II.5.1.2. Décharges électriques de haute tension (DEHT) 79
II.5.1.3. Extraction assistée par ultrasons 80
II.5.2. Extraction des glucosinolates 81
II.5.3. Cinétiques d'extraction 83
II.5.3.1. Modèle empirique de Peleg 83
II.5.3.2. Coefficient de diffusion 83
II.6. PURIFICATION DES GLUCOSINOLATES 84
II.6.1. Chromatographie d'échange d'ions 84
II.6.1.1. Choix des résines 84
II.6.1.2. Etude en régime statique 84
II.6.1.3. Etude en régime dynamique 88
II.6.2. Filtration membranaire 89
II.6.2.1. Optimisation du procédé 89
II.6.2.2. Détermination du mécanisme de colmatage 91
II.6.2.3. Régénération des membranes 92
II.7. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES 93

II.7.1. Analyse des extraits solides ... *93*
II.7.1.1. Teneur en humidité ... 93
II.7.1.2. Teneur en huile ... 93
II.7.1.3. Teneur en glucosinolates ... 94
II.7.1.4. Teneur en protéines ... 95
II.7.1.5. Caractérisation infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ... 95
II.7.2. Analyses des extraits liquides ... *95*
II.7.2.1. Mesure du pH ... 95
II.7.2.2. Coloration du jus ... 95
II.7.2.3. Quantification des glucosinolates ... 95
II.7.2.4. Quantification en protéines ... 97
II.7.2.5. Quantification des colloïdes ... 97
II.8. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS ... 98

III. CHAPITRE 3 ... 99

III.1. INACTIVATION DE LA MYROSINASE DE *B. JUNCEA* PAR DIFFERENTS TRAITEMENTS THERMIQUES ET HYDROSTATIQUES ... 100
III.1.1. Résumé de l'article ... *100*
III.1.2. Article ... *102*
III.1.3. Vérification de la conservation des glucosinolates dans le tourteau ... *127*
III.2. OPTIMISATION DE L'EXTRACTION DES GLUCOSINOLATES A PARTIR DE TOURTEAU DE *B. JUNCEA* AVEC DIFFERENTS PRETRAITEMENTS ... 129
III.2.1. Extraction des glucosinolates par diffusion avec différents prétraitements ... *129*
III.2.1.1. Résumé de l'article ... 129
III.2.1.2. Article ... 131
III.2.2. Extraction assistée par ultrasons ... *153*
III.2.3. Comparaison des différents procédés d'extraction et bilan ... *155*
III.3. PURIFICATION DES GLUCOSINOLATES ... 157
III.3.1. Purification des glucosinolates par résines échangeuses d'ions ... *157*
III.3.1.1. Résumé de l'article ... 157
III.3.1.2. Article ... 159
III.3.1.3. Bilan ... 181
III.3.2. Purification des glucosinolates par ultrafiltration ... *182*
III.3.2.1. Résumé de l'article ... 182
III.3.2.2. Article ... 183
III.4. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES ... 201
III.5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ... 204

Liste des figures

FIGURE I-1 - DIVERSITE DE LA BIOMASSE DISPONIBLE DANS LA NATURE 25

FIGURE I-2 - PRINCIPE GENERAL DE LA BIORAFFINERIE PAR ANALOGIE AVEC LA RAFFINERIE PETROLIERE 25

FIGURE I-3 - DIAGRAMME GLOBAL DES PROCEDES DE TRANSFORMATION DE LA BIOMASSE (SOLEN-ENERGIE, 2014)..... 27

FIGURE I-4 - SCHEMA SIMPLIFIE DE LA BIORAFFINERIE DES OLEAGINEUX (D'APRES SAS PIVERT, « LA BIORAFFINERIE OLEAGINEUSE »)..... 28

FIGURE I-5 - « TRIANGLE DE U » (1935) REPRESENTANT LES RELATIONS GENETIQUES ENTRE LES ESPECES DIPLOÏDES ET AMPHIDIPLOÏDES DE BRASSICA. « N » REPRESENTE LE NOMBRE DE CHROMOSOMES DE CHAQUE GENOME. 30

FIGURE I-6 - CARTOGRAPHIE MONDIALE DE LA CULTURE ET DE LA PRODUCTION DE LA MOUTARDE BRUNE..... 32

FIGURE I-7 - EVOLUTION TEMPORELLE DE LA SURFACE CULTIVEE (HA) ET DE LA PRODUCTION (T) DE GRAINES DE MOUTARDE DANS LE MONDE (GAUCHE) ET EN FRANCE (DROITE). SOURCE : FAOSTAT. 33

FIGURE I-8 – ILLUSTRATIONS DES DIFFERENTS ORGANES DE LA MOUTARDE BRUNE : 1. PLANTE; 2. FEUILLE; 3. CHAMP DE MOUTARDE DE DIJON; 4. GRAINES..... 33

FIGURE I-9 - REPARTITION DES TENEURS EN SINIGRINE ET GLUCONAPINE DANS DES GRAINES DE MOUTARDES BRUNE ISSUES DE 190 GENOTYPES (MERAH, 2015)..... 35

FIGURE I-10 - STRUCTURE GENERALE DES GLUCOSINOLATES..... 36

FIGURE I-11 - MECANISME GENERAL DE BIOSYNTHESE DES GLUCOSINOLATES..... 37

FIGURE I-12 - HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES GLUCOSINOLATES ET LEURS PRODUITS DE DECOMPOSITION. MODIFIE DE RASK ET AL. (2000)..... 39

FIGURE I-13 - STRUCTURE DE CHIMIQUE DE L'ALLYL-ISOTHIOCYANATE (GAUCHE) ET DU BUT-3-ENYL ISOTHIOCYANATE (DROITE)..... 40

FIGURE I-14 – EFFET DU TRAITEMENT THERMIQUE SUR L'ACTIVITE RESIDUELLE DE LA MYROSINASE DANS LES GRAINES DE MOUTARDE NOIRE (♦), BRUNE (■) ET JAUNE (▲) POUR UNE DUREE D'EXPOSITION DE 10 MIN (OKUNADE ET AL., 2015) 43

FIGURE I-15 – EFFET DU TEMPS ET DU TAUX D'HUMIDITE DES GRAINES DE CANOLA SUR L'ACTIVITE DE LA MYROSINASE (GAUCHE) ET LA TENEUR EN GSL (DROITE) AU COURS DU TRAITEMENT SC-CO_2 A 62.1 MPA ET 75°C 44

FIGURE I-16 – EXTRACTION DE LA SINIGRINE A PARTIR DE GRAINES DE MOUTARDE VIA QUATRE METHODES DIFFERENTES D'EXTRACTION (COOLS AND TERRY, 2012) 47

FIGURE I-17 – PHENOMENE DE CAVITATION ACOUSTIQUE 48

FIGURE I-18 - TYPES DE DECHARGES ELECTRIQUES DANS UNE SOLUTION AQUEUSE (A) ET SCHEMA DU PROCESSUS DE DESINTEGRATION ELECTRO-HYDRAULIQUE (B) (VOROBIEV & LEBOVKA, 2010). 49

FIGURE I-19 – DOMAINES D'APPLICATION DES DEHT (TOUYA, 2005) 50

FIGURE I-20 – EFFET DU TRAITEMENT PAR DEHT (W=80 KJ/KG, D=5 MM, T=20°C, T=20 MIN) SUR L'EXTRACTION DES POLYPHENOLS ET L'ACTIVITE ANTIOXYDANTE EN FONCTION DU RATIO SOLIDE-LIQUIDE (BOUSSETTA, 2010) 51

FIGURE I-21 – CONCENTRATION EN A) PROTEINES, B) CARBOHYDRATE, C) POLYPHENOLS ET D) ACTIVITE ANTIOXYDANTE DES EXTRAITS OBTENUS PAR EXTRACTION CONVENTIONNELLE (T=20, 50, 60°C, T = 1H, PH = 2.5, 7, 11, DECHARGES ELECTRIQUES HAUTE TENSION (DEHT) ET CHAMPS ELECTRIQUES PULSES (CEP) (PARNIAKOV *ET AL*., 2014) 51

FIGURE I-22 – TENEUR TOTALE EN POLYPHENOLS EXTRAITS EN FONCTION PROCEDE D'EXTRACTION : ULTRASONS (US), CHAMPS ELECTRIQUES PULSES (PEF) ET DECHARGES ELECTRIQUES HAUTE TENSION (DEHT) A TAUX D'ENDOMMAGEMENT CELLULAIRE Z EQUIVALENT..... 52

FIGURE I-23 – CONCENTRATION TOTALE EN (A) POLYPHENOLS ET (B) PROTEINES DANS L'EXTRAIT EN FONCTION DE L'ENERGIE APPLIQUEE POUR UN TRAITEMENT CEP (13 KV/CM) ET DEHT (40KV) (SARKIS ET AL. 2015) 52

FIGURE I-24- IMPACT DES PRODUITS LIBERES SUR LE PROCESSUS DE PURIFICATION LORS DU TRAITEMENT DE CELLULES MICROBIENNES (D'APRES BALASUNDARAM ET AL., 2009)..... 53

FIGURE I-25 - SCHEMA D'UN SYSTEME DE CHROMATOGRAPHIE ECHANGEUR D'IONS 55

FIGURE I-26 - SCHEMA STRUCTUREL D'UNE RESINE ECHANGEUSE DE CATIONS (GAUCHE) ET D'ANIONS (DROITE) 55

FIGURE I-27 – PRINCIPE DU PROCEDE D'ADOUCISSEMENT DE L'EAU PAR CHROMATOGRAPHIQUE D'ECHANGE CATIONIQUE IMPLIQUANT LA SUBSTITUTION DES IONS CALCIUM DE L'EAU PAR LES IONS SODIUM APPORTES PAR LA RESINE 56

FIGURE I-28 - DOMAINES D'APPLICATION DES PROCEDES DE FILTRATION MEMBRANAIRES (D'APRES BOUSSETTA, 2010) 57

FIGURE I-29 - SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DE LA FILTRATION FRONTALE 58

FIGURE I-30 - SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DE LA FILTRATION FRONTALE AVEC AGITATION 58

FIGURE I-31 - SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DE LA FILTRATION TANGENTIELLE 58

FIGURE I-32 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE DE POLARISATION DE CONCENTRATION (THEORIE DU FILM) 60

FIGURE I-33 - SCHEMAS DES MECANISMES DE COLMATAGE (D'APRES IRITANI AND KATAGIRI, 2016) 63

FIGURE II-1 – METHODOLOGIE EXPERIMENTALE GLOBALE 71

FIGURE II-2 - PHOTO DES GRAINES DE MOUTARDE BRUNE DE LA VARIETE ETAMINE 71

FIGURE II-3 - APPAREILLAGE UTILISE POUR CHAUFFAGE MICRO-ONDES (GENERATEUR MILESTONE, F = 2.45 GHZ) 72

FIGURE II-4 – (A) EQUIPEMENT D'EXTRACTION DE FLUIDE SUPERCRITIQUE TYPE SFE 200ML (EXTRATEX) 1. GROUPE FROID 2. POMPE 3. SEPARATEUR 4. ETUVE 5. EXTRACTEUR 6. RESERVE CO_2 (B) P&ID GENERAL DE L'INSTALLATION 73

FIGURE II-5 - SCHEMA SIMPLIFIE DE LA PRESSE A PLAQUE (CREUSOT-LOIRE, FRANCE) 78

FIGURE II-6 – SYSTEME DE TRAITEMENT DE DECHARGES ELECTRIQUES HAUTE TENSION (DEHT) : (A) GENERATEUR DE HAUTE TENSION BASIS (SAINT-QUENTIN), (B) CELLULE DE TRAITEMENT ELECTRIQUE 80

FIGURE II-7 – GENERATEUR ULTRASONS UP 400S (HIELSCHER, STUTTGAR, ALLEMAGNE) 81

FIGURE II-8 – (A) REPRESENTATION SYMBOLIQUE DU DISPOSITIF DE DIFFUSION EN DISCONTINU (B) PLAQUE CHAUFFANTE MAGNETIQUE TYPE IKA 81

FIGURE II-9 – STRUCTURE CHIMIQUE D'UNE RESINE ECHANGEUSE D'IONS FORTEMENT BASIQUE TYPE I (GAUCHE) ET D'UNE RESINE FAIBLEMENT BASIQUE TYPE AMINE TERTIAIRE (DROITE) 84

FIGURE II-10 – DISPOSITIF DE PURIFICATION SUR COLONNE PAR RESINE ECHANGEUSE D'ANION 88

FIGURE II-11 – DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE FILTRATION MEMBRANAIRE PAR LA CELLULE AMICON 8200 (MILLIPORE, FRANCE) 89

FIGURE II-12 – STRATEGIE EXPERIMENTALE POUR LE NETTOYAGE CHIMIQUE DES MEMBRANES PES VIA LA CELLULE AMICON 92

FIGURE II-13 – SCHEMA EXPERIMENTAL D'EXTRACTION DE L'HUILE PAR L'HEXANE (SOXHLET) 94

FIGURE II-14 – CHROMATOGRAMME HPLC (229 NM) D'UN EXTRAIT DE B. JUNCEA D'APRES LA PROCEDURE DE WHATELET ET AL. EN UTILISANT LA GTL COMME STANDARD INTERNE. LES TEMPS DE RETENTION DE LA SIN, GNA ET GTL SONT RESPECTIVEMENT 5.3, 6.9 ET 7.9 MIN. 94

FIGURE II-15 – A) COURBE D'ETALONNAGE EXTERNE HPLC DE LA SINIGRINE (STANDARD), B) CHROMATOGRAMME HPLC DE LA SINIGRINE MONOHYDRATE UTILISEE COMME STANDARD AVEC UN TEMPS D'ELUTION DE 5.3 MIN. 96

FIGURE II-16 - COURBE D'ETALONNAGE DE L'ALBUMINE DE SERUM BOVINE POUR LE DOSAGE DES PROTEINES 97

FIGURE III-1 – CIENTIQUES D'EXTRACTION DE L'HUILE OBTENUES PAR PRESSAGE MECANIQUE REALISE A 100 BARS ET (■) 30°C VIA UN ECHANTILLON TEMOIN (GRAINES NON TRAITEES), (▲) 30°C VIA LES GRAINES TRAITEES (80°C, 70 MIN), (▼) 80°C VIA LES GRAINES TRAITEES..... 127

FIGURE III-2 - CINETIQUES D'EXTRACTION DE A) SINIGRINE B) GLUCONAPINE EN FONCTION DE LA PUISSANCE DES ULTRASONS (■) SANS TRAITEMENT (TOURTEAU BRUT) (▲) 200, (▼) 400W. CONDITIONS OPERATOIRES : 40% ETHANOL, 40°C, 10G DE SOLVANT PAR G DE MATIERE..... 153

FIGURE III-3 - CINETIQUES D'EXTRACTION DE A) SINIGRINE B) GLUCONAPINE AU COURS DE L'EXTRACTION ASSISTEE PAR US EN FONCTION DE LA PUISSANCE (■) SANS TRAITEMENT (▲) 100 W, (▼) 200 W, (►) 400 W. L'INSERT REPRESENTE L'ELEVATION DE TEMPERATURE AU COURS DU TEMPS EN FONCTION DE LA PUISSANCE. 154

FIGURE III-4 - CINETIQUES D'EXTRACTION DES PROTEINES AU COURS DE L'EXTRACTION ASSISTEE PAR US EN FONCTION DE LA PUISSANCE (■) SANS TRAITEMENT (▲) 100 W, (▼) 200 W, (►) 400 W. 155

FIGURE III-5 – RENDEMENT EN A) SINIGRINE B) GLUCONAPINE, C) SELECTIVITE GLOBALE D'EXTRACTION ET D) PARAMETRE D'EFFICACITE ENERGETIQUE, OBTENUS PAR EXTRACTION CONVENTIONNELLE E (T=20-60°C) AVEC BROYAGE, EXTRACTION ASSISTEE PAR US (P=100-400W) ET EXTRACTION ASSISTEE PAR DEHT (40 KV)..... 155

FIGURE III-6 – A) TOURTEAU BRUT B) ASPECT DU TOURTEAU RESIDUEL APRES UN TRAITEMENT DEHT (40 KV) DE 5 MS..... 156

Liste des tableaux

TABLEAU I-1 - CLASSIFICATION DES BIORAFFINERIES SELON LEURS MATIERES PREMIERES (D'APRES RAKOTOVAO *ET AL.*,2017) 26
TABLEAU I-2 - DIVERSITE DU GENRE BRASSICA : ESPECES ET SOUS ESPECES 31
TABLEAU I-3 - COMPOSITION EN ACIDES GRAS D'UNE HUILE DE MOUTARDE TRADITIONNELLE (PROTA, 2007)..... 34
TABLEAU I-4 - COMPOSITION CHIMIQUE DE TOURTEAU (2.4% D'HUILE) ET DES PROTEINES DE *BRASSICA JUNCEA* (SOURCE : FEEDBASE) 35
TABLEAU I-5 - LISTE DE GLUCOSINOLATES COMMUNS. R REPRESENTE LA STRUCTURE DE LA CHAINE CARBONEE LIEE A LA STRUCTURE GENERALE X (D'APRES FIGURE I-10)..... 38
TABLEAU I-6 - STABILITE THERMIQUE DE LA MYROSINASE ISSUE DE DIFFERENTES SOURCES DE BRASSICA 42
TABLEAU I-7 - ETUDES PORTANT SUR L'INACTIVATION DE LA MYROSINASE 45
TABLEAU I-8 – BREVETS PORTANT SUR L'INACTIVATION DE LA MYROSINASE 45
TABLEAU I-9 – BREVETS PORTANT SUR L'EXTRACTION DES GSL 47
TABLEAU I-10 – VALORISATION DE BIO-COMPOSES MOYENNANT L'UTILISATION DES ULTRASONS DANS L'EQUIPE TAI 48
TABLEAU I-11 - NATURE DU SUPPORT DE LA PHASE STATIONNAIRE SELON LE TYPE DE CHROMATOGRAPHIE 54
TABLEAU I-12 - CARACTERISTIQUES DU SUPPORT SELON LE TYPE DE CHROMATOGRAPHIE 54
TABLEAU I-13 - TYPES DE RESINES SELON LA NATURE DE LEUR GROUPE FONCTIONNEL 55
TABLEAU I-14 - MODELES SIMPLES DE COLMATAGE LORS DE FILTRATION A PRESSION CONSTANTE (BOLTON *ET AL.*, 2006) 63
TABLEAU I-15 - CATEGORIES ET EXEMPLES TYPIQUES D'AGENTS CHIMIQUES POUR LE NETTOYAGE DES MEMBRANES 64
TABLEAU II-1 –CARACTERISTIQUES DE L'EQUIPEMENT SFE 200 ML (EXTRATEX)..... 73
TABLEAU II-2 - MODELES CINETIQUES UTILISES POUR LA DESCRIPTION DE L'INACTIVATION DE LA MYROSINASE..... 77
TABLEAU II-3 – CARACTERISTIQUES DU GENERATEUR ELECTRIQUE (BASIS, SAINT-QUENTIN) 79
TABLEAU II-4 – CARACTERISTIQUES DU GENERATEUR D'ULTRASONS UP 400S..... 80
TABLEAU II-5 – CARACTERISTIQUES DES RESINES ANIONIQUES UTILISEES POUR LA PURIFICATION DE JUS 84
TABLEAU III-1- COMPARAISON DE LA TENEUR EN GLUCOSINOLATES AU COURS DU PROCEDE DE TRANSFORMATION DES GRAINES DE MOUTARDE 127
TABLEAU III-2 – INFLUENCE DU TRAITEMENT US SUR LES RENDEMENTS INFINIS ET LES COEFFICIENTS DE TRANSFERT DES GSL..... 154

Acronymes & Abréviations

AIE	Agence Internationale de l'Energie
AITC	Allyl-isothiocyanate (prop-2-enyl-glucosinolate)
BITC	But-3-enyl-glucosinolate
CC	Chauffage conventionnel
CEP	Champs Electriques Pulsés
CIPAN	Culture Intermédiaire Piège à Nitrates
CMC	Concentration Micellaire Critique
DEHT (*HVED*)	Décharges Electriques de Haute Tension (*High Voltage Electric Discharges*)
GES	Gaz à effet de serre
GNA	Gluconapine
GTL	Glucotropaeoline
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance
IEC	Chromatographie d'échange d'ions (*Ion-exchange chromatography*)
ITC	Isothiocyanate
MO (*MW*)	Micro-ondes (*Microwaves*)
MS (*DM*)	Matière Sèche (*Dry Matter*)
OT	Oxazolidine-2-thione
PIVERT	Picardie Innovations Végétales Enseignements et Recherches Technologiques
PPO	Polyphénol oxydase
SIN	Sinigrine
SC-CO_2	CO_2 supercritique
US	Ultrasons
UF	Ultrafiltration
UV	Ultraviolet
Vis	Visible

Nomenclature

Dénomination grecque

α	Ratio liquide-solide
α	Résistance spécifique du gâteau
μ	Viscosité dynamique du jus
ρ	Masse volumique du jus
τ	Taux de rétention
ΔP	Pression transmembranaire
ΔQ	Chaleur de sorption (constante de Temkin)

Dénomination latine

A_0	Activité enzymatique initiale
A_t	Activité enzymatique après traitement
A_{rf}	Activité enzymatique de la fraction résistante
A_L	Activité de la fraction thermolabile de l'enzyme
A_S	Activité de la fraction thermostable de l'enzyme
A_1	Activité de la forme native de l'enzyme
A_2	Activité de la forme intermédiaire de l'enzyme
A_{max}	Activité maximale de la myrosinase
B	Taux normalisé d'extraction des GSL
C	Constante de Webber and Moris (paramètre indicateur de l'épaisseur de la couche limite)
C_i, C_0	Concentration initiale
C_c	Concentration des composes indésirables dans la couche de dépôt
C_{co}	Concentration des substances colloïdales
C_d	Concentration du soluté dans l'éluant
C_e	Concentration à l'équilibre
C_f	Concentration du soluté dans le jus initial
C_h	Teneur en huile des graines
C_p	Concentration du soluté dans le perméat
C_{pr}	Concentration des protéines
C_s	Fraction massique en composés solides du jus
C_{cs_0}	Concentration initiale des impuretés
C_∞	Concentration de soluté pour un temps infini
C_{GSL}	Concentration en GSL au cours de l'extraction
C_{GSL_0}	Concentration initiale en GSL
D	Coefficient de diffusion
D	Taux de désorption
E	Taux d'adsorption
E_{ex}	Consommation énergétique de l'extraction par diffusion

E_p	Energie d'une impulsion du générateur DEHT
E_{pr}	Consommation énergétique du broyage
E_t	Consommation énergétique totale de l'extraction solide-liquide (prétraitement+diffusion)
F_R	Taux de récupération de flux
H	Taux d'humidité des graines
k_i, K_i	Constantes cinétiques
K_{ii}	Constante de diffusion intraparticulaire
K_F	Constante de Freundlich
K_L	Constante de Langmuir
K_T	Constante de Temkin
K_M	Constante de Michaelis
J	Flux de filtration
J_{w_0}	Flux de filtration de l'eau de la membrane neuve
J_{wf}	Flux de filtration de l'eau de la membrane colmatée
J_{wc}	Flux de filtration de l'eau de la membrane après nettoyage
m	Masse de suspension
m_g	Masse de graines
m_t	Masse d'huile récoltée au cours du pressage
m_i	Quantité d'huile disponible dans les graines
m_{pr}	Masse de protéines extraites
m_{pr_0}	Masse de protéines initiale
m_r	Masse de résine
M	Masse molaire
n	Nombre d'impulsions du générateur DEHT
n	Constante de Freundlich
n	Paramètre caractéristique de colmatage
P_r	Pureté du jus
P_{US}	Puissance du générateur US
q_e	Capacité d'adsorption à l'équilibre
q_0	Capacité maximale d'adsorption
Q_{DEHT}	Energie spécifique massique du traitement DEHT
Q_{US}	Energie spécifique massique du traitement US
r	Rayons de particules
R	Constante universelle des gaz parfaits
R_L	Facteur de séparation de Langmuir
R_m	Résistance de la membrane
R_{m_0}	Résistance de la membrane neuve
R_{mc}	Résistance de colmatage résiduelle après traitement
R_{mf}	Résistance de colmatage
R_R	Taux d'élimination de la résistance de colmatage
s	Paramètre de compressibilité du gâteau
S	Surface de filtration
S_{GSL}	Sélectivité d'extraction
t	Temps

T	Température
V	Volume
V_d	Volume d'éluant
V_0	Volume initial de jus
Y_h	Rendement d'extraction de l'huile par pressage
Y_{GSL}	Rendement d'extraction des GSL
Y_{pr}	Rendement d'extraction des protéines

Introduction générale et contexte

Le paysage socio-économique mondial a été bouleversé en quelques années par de nombreuses problématiques liées à l'utilisation des ressources fossiles. L'évolution chaotique du prix du pétrole, l'amoindrissement des réserves mondiales, l'incertitude quant à sa disponibilité à long terme et les nouvelles préoccupations environnementales (lutte contre le réchauffement climatique, contrôle et réduction drastiques des émissions de gaz à effet de serre etc.) ont relancé les bases de l'instauration d'une bioéconomie censée répondre de manière globale à ces défis socio-économiques interconnectés. La bioéconomie est fondée sur l'exploitation, la transformation intelligente et respectueuse de l'environnement et l'utilisation intelligente et durable de la biomasse pour fournir des biens et des services qui répondent aux besoins de la société. Le pilier fondamental de la bioéconomie en est incarné par la bioraffinerie, un modèle industriel de production miroir et alternatif à la raffinerie pétrolière valorisant toute la biomasse pour générer des produits biosourcés de haute valeur ajoutée (industrie alimentaire, biomolécules, biomatériaux, bioénergie etc.). Les enjeux de la bioraffinerie reposent sur le développement des procédés de fractionnement et de transformation efficaces techniquement, viables économiquement et respectueux de l'environnement, reposant sur les principes de la chimie verte et du développement durable.

Le concept de bioraffinerie s'adapte particulièrement aux oléagineux de par leur composition riche en matière grasse, protéines et fibres très recherchées dans plusieurs domaines industriels : l'industrie agroalimentaire (huiles et protéines végétales), l'alimentation animale (tourteaux riches en protéines et en minéraux), les biocarburants (diesters) et les débouchés issus de la chimie du végétal (cosmétiques, applications pharmaceutiques, détergents, lubrifiants, fluidifiants, plastifiants, solvants, encres et peintures etc.).

Les huiles et les protéines végétales sont utilisées en alimentation humaine mais aussi en industrie pour des applications multiples et diverses. De nos jours, la demande globale en huiles et protéines d'origine végétale ne cesse d'augmenter. Dans ce contexte, l'enjeu principal est de pouvoir répondre à cette demande croissante sans impacter la production destinée à l'alimentation. Ainsi, pour éviter une compétition dans l'affectation des terres et préserver l'agriculture à finalité alimentaire, les recherches en agronomie se sont notamment orientées vers le développement et la sélection de variétés de plantes oléagineuses adaptées à un environnement plutôt aride et/ou caractérisées par une croissance rapide permettant une rotation rapide des cultures. Dans cette perspective, la culture de *B. Juncea* (moutarde brune) suscite un intérêt croissant en raison de ses caractéristiques agronomiques. En effet, cette plante est caractérisée par une bonne adaptation aux conditions climatiques semi-arides, une forte résistance aux insectes ravageurs et aux maladies, une croissance rapide (60-70 jours), la richesse de ses graines en protéines, en huile. La moutarde brune est cultivée essentiellement dans les pays ayant un climat subtropical et tempéré. Les principaux pays producteurs sont le Canada, le Népal, la Russie, les USA, la Birmanie et la Chine. En France, la culture de *B. Juncea* est concentrée en Bourgogne. Elle occupe une surface de 5000 ha avec une implantation des usines de transformation pour produire la moutarde de Dijon. Les graines de moutarde ont une saveur piquante, légèrement poivrée et sont utilisées dans la fabrication industrielle de condiments du type moutarde. Le tourteau (résidu solide après extraction de l'huile) est riche en protéines et peut être conventionnellement valorisé en

alimentation animale. Actuellement, les tourteaux d'oléagineux (colza, tournesol, soja) produits en France couvrent environ 35% des besoins de l'élevage en protéines. Cependant, on estime que la France doit encore importer 37% de matières riches en protéines, principalement du tourteau de soja, pour répondre à la demande nationale. Dans ce contexte, la valorisation du tourteau de *B. juncea* en alimentation pourrait réduire cette dépendance au soja importé. Cependant, cette valorisation est pour l'instant problématique à cause de la richesse du tourteau de *B. juncea* en glucosinolates et de ses dérivés (≈ 100 µmol/g tourteau). En effet, les dérivés des glucosinolates donnent un goût et une odeur particulière induisant un effet d'inappétence et goitrigène notamment sur les monogastriques. A l'heure actuelle, les glucosinolates et leurs dérivés sont connus pour leurs propriétés antifongiques, insecticides et anti-cancérigènes intéressantes pour la protection des plantes contres les agressions. Cette plante présente donc un réel potentiel pour une implantation bioraffinerie.

La problématique développée dans cette thèse s'inscrit ainsi dans une démarche de recherche scientifique et de développement technologique du schéma de la bioraffinerie du futur, lancée par l'institut P.I.V.E.R.T. (Picardie Innovations Végétales, Enseignements et Recherches Technologiques). Unique Institut de Transition Energétique (ITE) en chimie végétale et sélectionné dans le cadre du Programme Investissements d'Avenir, l'ITE PIVERT s'assigne entre autres la mission de contribuer dans une logique de bioraffinerie à la substitution des matières premières d'origine fossile, le développement de la chimie du végétal et la valorisation de la biomasse, en particulier oléagineuse (colza, lin, tournesol etc.). Ce projet de thèse s'inscrit dans le cadre du programme de recherche GENESYS lancé en 2011 par la SAS PIVERT dans le contexte d'une stratégie de valorisation optimale et raisonnée des agro-ressources dans un concept de bioraffinerie et de développement durable. Le travail présenté est porté par le projet BRASSICA qui est rattaché essentiellement au sous-programme « Procédés de fractionnement et de thermochimie » SP2 et a un lien direct avec les SP1, 5,6 et 7 des thématiques de recherche développées dans le programme (voir figure ci-après).

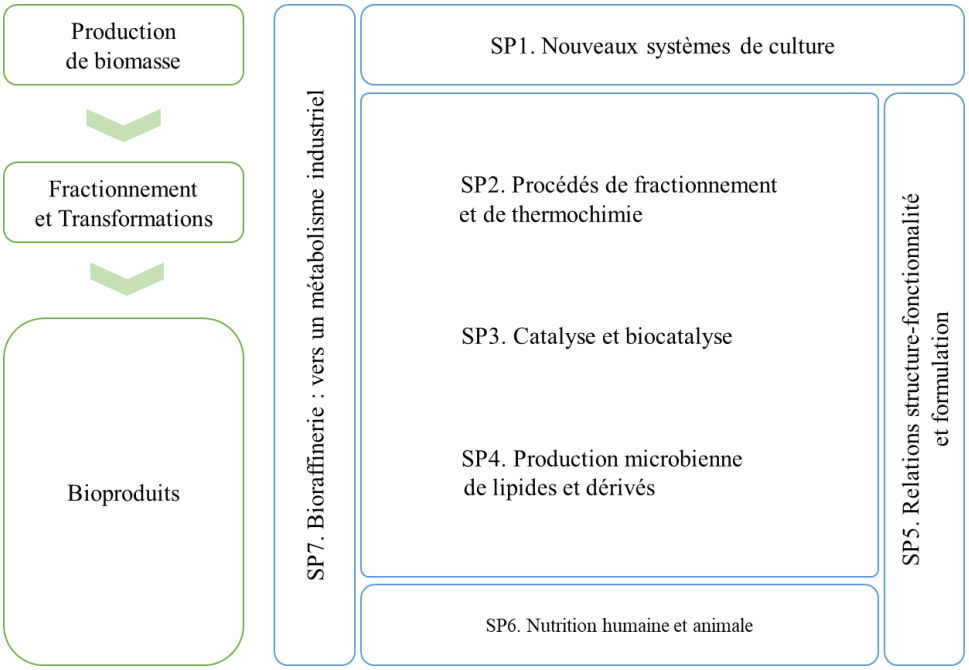


Figure 1 – Thématiques de recherche du programme GENESYS

L'enjeu de ce projet est de démontrer la profitabilité économique et environnementale de la culture de *B. juncea* grâce au développement de nouveaux débouchés de valorisation des différentes fractions de la graine dans une démarche de bioraffinerie. L'originalité de ce projet consiste à coupler la récupération de glucosinolates pour détoxifier le tourteau au développement d'une formule phytosanitaire réactive à base de glucosinolates pour lutter contre certains microorganismes pathogènes de cultures végétales. L'organisation synoptique du projet est présentée via la figure ci-dessous.

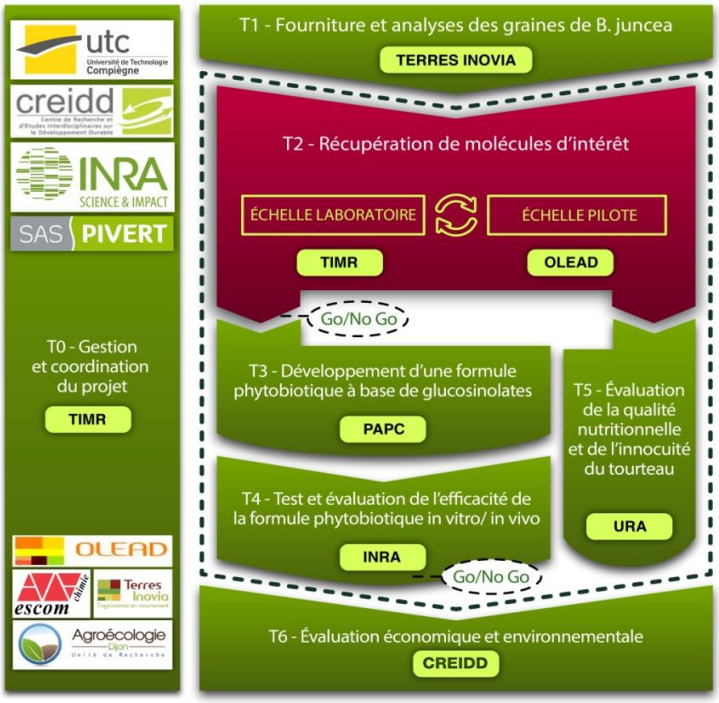


Figure 2 - Synoptique organisationnel du projet BRASSICA

Réalisée au sein du laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR) de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC), cette thèse a porté sur la tache 2 « Récupération des molécules d'intérêt à l'échelle laboratoire ». Elle vise à mettre en place des procédés viables pour fractionner les graines en trois fractions : une huile riche en acide érucique, un extrait actif et purifié riche en glucosinolates et un tourteau délipidé, riche en protéines et appauvri en glucosinolates. L'objectif est de coupler les procédés conventionnels d'extraction et de purification (diffusion, pressage, filtration) avec des technologies émergentes (US, Microondes, CEP, DEHT) pour intensifier les phénomènes de transfert, améliorer les rendements, réduire la consommation énergétique et l'utilisation des produits chimiques.

Ce mémoire de thèse s'articule autour de trois chapitres. Le **premier chapitre** est consacré à une revue bibliographique liée aux problématiques abordées. Le concept de la bioraffinerie ainsi que des informations détaillées sur le genre *Brassica* et la moutarde brune y seront explicités. La suite de ce chapitre porte sur l'intérêt des propriétés biologiques des glucosinolates et sur le système glucosinolate-myrosinase. Des travaux concernant l'inactivation spécifique de l'enzyme seront abordés ainsi que les méthodes d'extraction conventionnelles des glucosinolates présentées en littérature.

Le **deuxième chapitre** exposera les dispositifs, les stratégies expérimentales ainsi que les méthodes analytiques mises en œuvre autour des différents axes de travail de cette thèse : l'inactivation de la myrosinase, l'extraction de l'huile, l'extraction et la purification des glucosinolates intacts. Les modèles utilisés seront également présentés dans cette partie.

Le **troisième chapitre** présentera les résultats obtenus à travers trois parties.

La **première partie** sera portée sur l'étude de la stabilité thermique de la myrosinase et l'inactivation intrinsèque de l'enzyme dans les graines via différents prétraitements : chauffage conventionnel (bain-marie), micro-ondes et CO_2 supercritique. Les effets de chaque traitement sur l'activité de l'enzyme, la teneur en glucosinolates et en protéines ont été étudiés.

La **seconde partie** est consacrée à l'étude d'intensification de l'extraction des glucosinolates à partir du tourteau après extraction de l'huile. Une étude préliminaire pour optimiser les paramètres opératoires (composition d'un solvant eau/éthanol, température, ratio liquide-solide) d'extraction a dans un premier temps été effectuée. Cette optimisation est réalisée par rapport au rendement d'extraction des glucosinolates ainsi que la sélectivité d'extraction par rapport aux protéines. L'étude porte ensuite sur l'effet des prétraitements par broyage et décharges électriques de hautes tensions sur l'extraction des glucosinolates.

La **troisième partie** est centrée sur la purification des extraits riches en glucosinolates :
Le premier volet porte sur la purification des glucosinolates par résines échangeuses d'anions. L'étude est dans un premier temps réalisée en batch et deux types de résines (fortement et faiblement basique) ont été étudiés. La sélection de la résine pour la suite des travaux a été réalisée d'après les taux et la capacité d'adsorption par rapport aux glucosinolates. L'étude est réalisée d'après la masse de résine, la température, le temps etc. L'optimisation de la désorption a ensuite été menée en étudiant le type de sel, le temps, le ratio liquide-solide etc. L'étude a ensuite été portée en dynamique via l'utilisation d'une colonne chargée avec la résine et l'effet du débit d'élution ainsi que le pH ont été étudiés sur le taux de désorption des glucosinolates.
Le deuxième volet est dédié à la purification des extraits par ultrafiltration. Les effets du seuil de coupure de membranes PES, la pression et l'agitation sont étudiés sur le taux de récupération des glucosinolates, le taux de rétention des impuretés de la suspension (protéines, colloïdes), les caractéristiques du gâteau et de la membrane, le flux de filtration et le colmatage de la membrane. Un nettoyage chimique de la membrane après purification du jus a été effectué afin de régénérer la membrane et réaliser plusieurs cycles de filtration : le type d'agent chimique, la concentration de l'agent, la pression et le temps ont été optimisés par rapport au taux de récupération du débit de filtration et l'élimination de la résistance de colmatage.

CHAPITRE I

Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre présentera le concept de la bioraffinerie du végétal et son applicabilité pour la culture de la moutarde brune. Les aspects économiques et techniques de la culture de cette plante seront présentés ainsi que les différents procédés de transformation et de valorisation. Le schéma de bioraffinage proposé sera présenté et discuté. L'intérêt sera porté en particulier sur le potentiel des glucosinolates en biofumigation. Une analyse critique de la littérature permettra de relever les inconvénients des procédés de fractionnement, extraction et purification actuels pour proposer des techniques d'intensification alternatives et des voies de purification adaptées. Les objectifs scientifiques et techniques de la thèse seront enfin annoncés.

I.1. La bioraffinerie

Les problématiques environnementales et économiques liées à l'utilisation des ressources fossiles ont considérablement bouleversé l'économie de l'énergie et les stratégies de production à l'échelle mondiale. L'augmentation drastique du prix des ressources pétrolières, l'incertitude sur leur disponibilité dans le futur et leur impact direct dans le réchauffement climatique ont poussé les autorités, les scientifiques et les industriels à chercher d'un côté des ressources renouvelables pour satisfaire les besoins humains en énergie et en matière et développer d'un autre coté des procédés de transformation verts moins énergivores et plus respectueux de l'environnement. De ce constat est né le concept de la bioraffinerie comme pilier fondamental de la bioéconomie. Le bioraffinage pose les bases et les enjeux de l'économie du futur en prônant l'utilisation rationnelle et durable de la biomasse pour générer des produits à haute valeur ajoutée pour le secteur énergétique mais également pour l'industrie chimique, cosmétique et des matériaux (Kamm *et al*., 2004, 2006; Briens *et al*., 2008; Demirbas, 2009, 2010; Demirbas, 2009).

I.1.1. Concept et définition générale

I.1.1.1. La biomasse et son potentiel de valorisation

La biomasse représente l'ensemble de la matière organique, terrestre et marine, d'origine végétale ou animale. Elle désigne un champ de matières très large pouvant être issues des cultures saisonnières, de forêts, des plantes aquatiques et terrestres, des déchets domestiques et industriels ou encore des co-produits générés par l'industrie (Osamu *et al*., 1989) (Figure I-1). Elles incarnent de ce fait une source d'énergie et de matières premières inépuisables et renouvelables contrairement aux ressources fossiles polluantes et non renouvelables. A travers le procédé de photosynthèse, les plantes convertissent le dioxyde de carbone et l'eau en métabolites primaires et secondaires : les premiers sont des carbohydrates (sucres, cellulose, hémicellulose, etc.) à fort potentiel de valorisation énergie et matière. Les métabolites secondaires sont des molécules d'intérêts (composés phénoliques, terpènes, molécules azotées) qui peuvent être utilisés produire de composés à haute valeur ajoutée dans le secteur alimentaire, pharmaceutique, chimique et des matériaux. Le concept de la bioraffinerie vise à valoriser toutes les composantes de la biomasse ainsi que les coproduits générés lors des procédés de transformation.

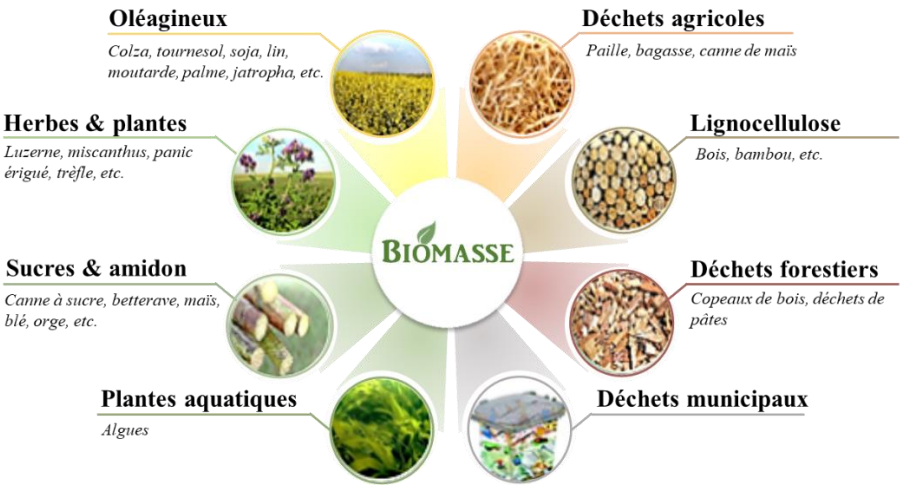


Figure I-1 - Diversité de la biomasse disponible dans la nature

I.1.1.2. Le système de bioraffinage

Le bioraffinage est défini selon la commission de l'Agence Internationale de l'énergie (AIE) comme « le processus de transformation durable de la biomasse en bioénergie (biocarburant, chaleur, électricité) et en une gamme de produits bio-basés (produits chimiques, biomatériaux et produits alimentaires) ». La bioraffinerie repose sur le même modèle que la raffinerie pétrolière, qui convertit le pétrole brut en carburants, en molécules intermédiaires pour l'industrie pétrochimique et en produits spécialisés. Par analogie, la bioraffinerie transforme la biomasse pour la convertir en biocarburants, en molécules plateformes pour la chimie verte, en produits destinés au secteur alimentaire et à l'agrochimie et en spécialités chimiques, tout en assurant une minimisation de la production de déchets (ou leur valorisation le cas échéant) et des émissions de GES (Figure I-2). La conversion de la biomasse en bioproduits a fait l'objet de nombreuses revues et articles (Kamm *et al.*, 2004,2006; Fernando *et al.*, 2006; Koutinas *et al.*, 2007). En pratique, les bioraffineries sont des installations qui produisent, via de nombreux procédés et technologies durables, des substances énergétiques (biocarburants & biocombustibles), chimiques (alcools & solvants, intermédiaires, huiles et lubrifiants, tensioactifs, principes actifs), des matériaux (dérivés cellulosiques, polymères, composites) et des composés destinés à l'alimentation humaine et animale en valorisant toutes les composantes de la biomasse traitée. Ces dernières sont classiquement classées en fonction de leurs produits ou de la nature de leurs matières premières.

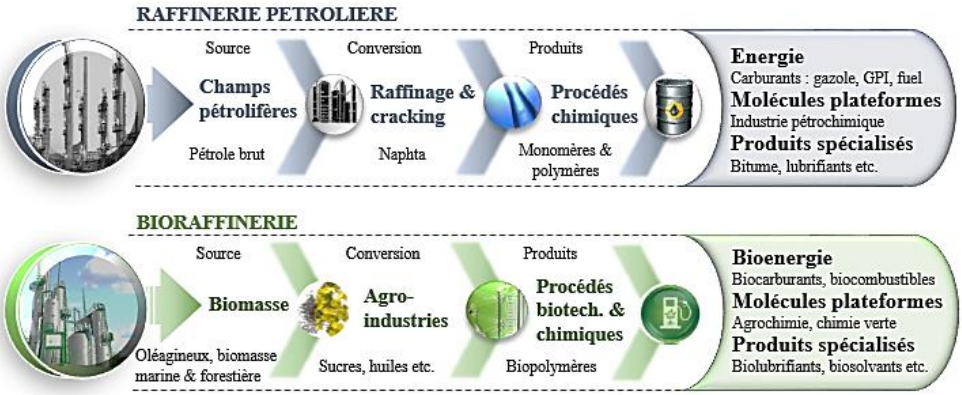


Figure I-2 - Principe général de la bioraffinerie par analogie avec la raffinerie pétrolière

I.1.2. Classification générale des bioraffineries

Différentes approches de classification consistent à analyser, identifier et décrire les systèmes de bioraffineries en fonction de leurs produits, de leurs intermédiaires - ou matières plateformes, de leurs matières premières d'entrée ou de leurs procédés de conversion.

I.1.2.1. Nature des produits visés

Les bioraffineries sont dans ce cas classées dans deux catégories en fonction des produits visés : on distingue la bioraffinerie axée sur la production de composés biobasés et celle axée sur la production de bioénergie. Dans le premier cas, la biomasse en fractionnée en de multiples produits biobasés à haute valeur ajoutée et avec un impact environnemental réduit. Dans le second cas, l'exploitation de la biomasse est d'abord centrée sur des applications énergétiques via la production de biocarburants, des biogaz, de chaleur et/ou d'électricité.

I.1.2.2. Nature de la matière première

Une autre typologie consiste à définir les bioraffineries d'après la nature des ressources utilisées : les bioraffineries vertes (Mandl, 2010) les bioraffineries céréalières (Kamm *et al*., 2006), les bioraffineries oléagineuses (Demirbas, 2010), les bioraffineries lignocellulosiques (Carvalheiro *et al*., 2008;Cheng *et al*., 2009;Luo *et al*., 2010) et les bioraffineries marines (Wijffels *et al*., 2010) et la bioraffinerie d'insectes (Tableau I-1).

Tableau I-1 - Classification des bioraffineries selon leurs matières premières *(*d'après Rakotovao *et al*.,2017)

Type de bioraffinerie	Matières premières	Produits
Bioraffinerie verte	Herbe, luzerne, trèfle etc. Céréales immatures, ressources périssables (pommes de terre, betteraves)	Biocarburants
Bioraffinerie céréalière	Maïs, blé, riz etc.	Bioéthanol, amidon et dérivés
Bioraffinerie oléagineuse	Colza, tournesol, soja etc.	Biodiesel, huiles végétales Tourteau
Bioraffinerie lignocellulosique	Bois, paille, bambou etc.	Biocarburants, biomolécules, biopolymères
Bioraffineie marine	Micro et macro algues	Biocarburants
Bioraffinerie d'insectes	Larves d'insectes	Biocarburants, biomolécules, biopolymères

De manière commune, on distingue : les bioraffineries dites de première génération qui génèrent essentiellement des biocarburants via l'utilisation directe des produits et résidus de la biomasse agricole (betterave, soja, tournesol, colza, sources d'amidon, etc.) et les bioraffineries de deuxième génération exploitant la biomasse lignocellulosique pour proposer des biocarburants de deuxième génération (éthanol cellulosique) et de nombreuses molécules plateformes.

I.1.2.3. Voies de conversion de la biomasse

Deux types de bioraffineries sont également définies selon les procédés de transformation de la biomasse utilisée : la plateforme thermochimique et la plateforme sucre ou biologique (Figure I-3).

La voie thermochimique comprend des procédés tels que la pyrolyse, la liquéfaction et la gazéification, destinés à transformer la biomasse solide et hétérogène en composés type syngas, utilisés soit directement pour la production d'électricité et de chaleur soit comme précurseurs à la synthèse de nouveaux composés.

La voie biochimique s'intéresse à l'extraction des sucres par hydrolyse enzymatique (saccharification) suivie d'une fermentation pour les utiliser directement comme précurseurs de synthèse.

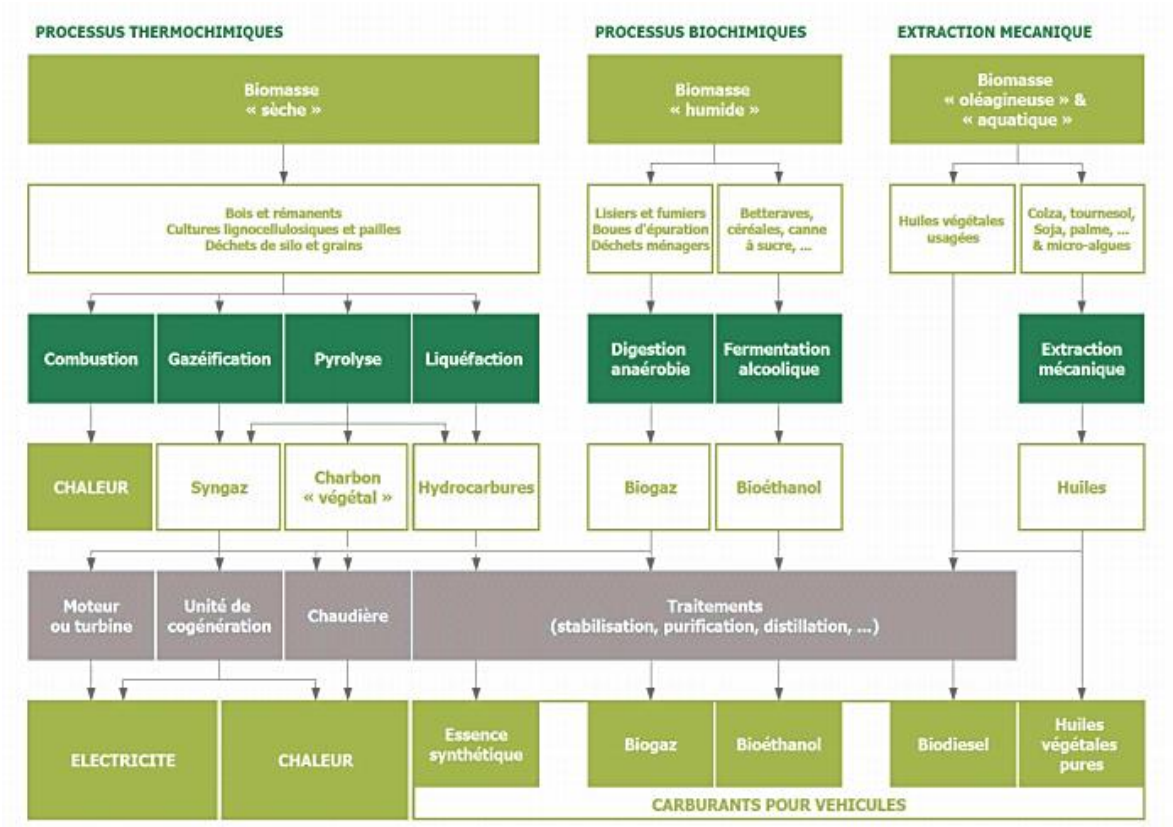


Figure I-3 - Diagramme global des procédés de transformation de la biomasse (SOLEN-ENERGIE, 2014)

Dans le cadre de cette thèse, le principe et les enjeux d'une bioraffinerie type oléagineuse seront davantage explicités.

I.1.3. La bioraffinerie oléagineuse

La bioraffinerie oléagineuse a pour but de valoriser la biomasse oléagineuse en produits chimiques renouvelables et en énergie. Ces produits trouvent des applications en chimie en tant que molécules plateformes et précurseurs de synthèse, de polymères, solvants et produits spécialisés, dans le développement de matériaux, dans le secteur alimentaire, médical ou encore énergétique. Les sous-produits générés servent de matière première pour un autre processus ou installation. La bioraffinerie du futur s'engage à recycler l'eau, l'énergie et les déchets.

La bioraffinerie oléagineuse repose sur la valorisation de différentes fractions et composantes de la plante (Figure I-4). En pratique, la graine est d'abord séparée du reste du matériel lignocellulosique de la plante qui lui est destiné à une bioraffinerie lignocellulosique (ou bioraffinerie de 2nde génération). Le processus de transformation de la graine oléagineuse appelé "trituration" permet d'en extraire d'une part l'huile et d'obtenir ainsi une fraction solide appauvrie en huile appelé tourteau. La fraction huile pourrait être utilisée en alimentation humaine et/ou pour des applications industrielles dans les secteurs des détergents, des lubrifiants, des carburants, des plastifiants et des produits cosmétiques (Soon, 2000; Kazmi, 2011). La fraction tourteau quant à elle est valorisée essentiellement en alimentation animale pour sa haute valeur protéique.

La fraction lignocellulosique pourrait être transformée en biomatériaux ou subir elle aussi une série d'opérations réactives et séparatives pour en extraire des molécules à haute valeur ajoutée pour des applications industrielles comme le montre la Figure I-4.

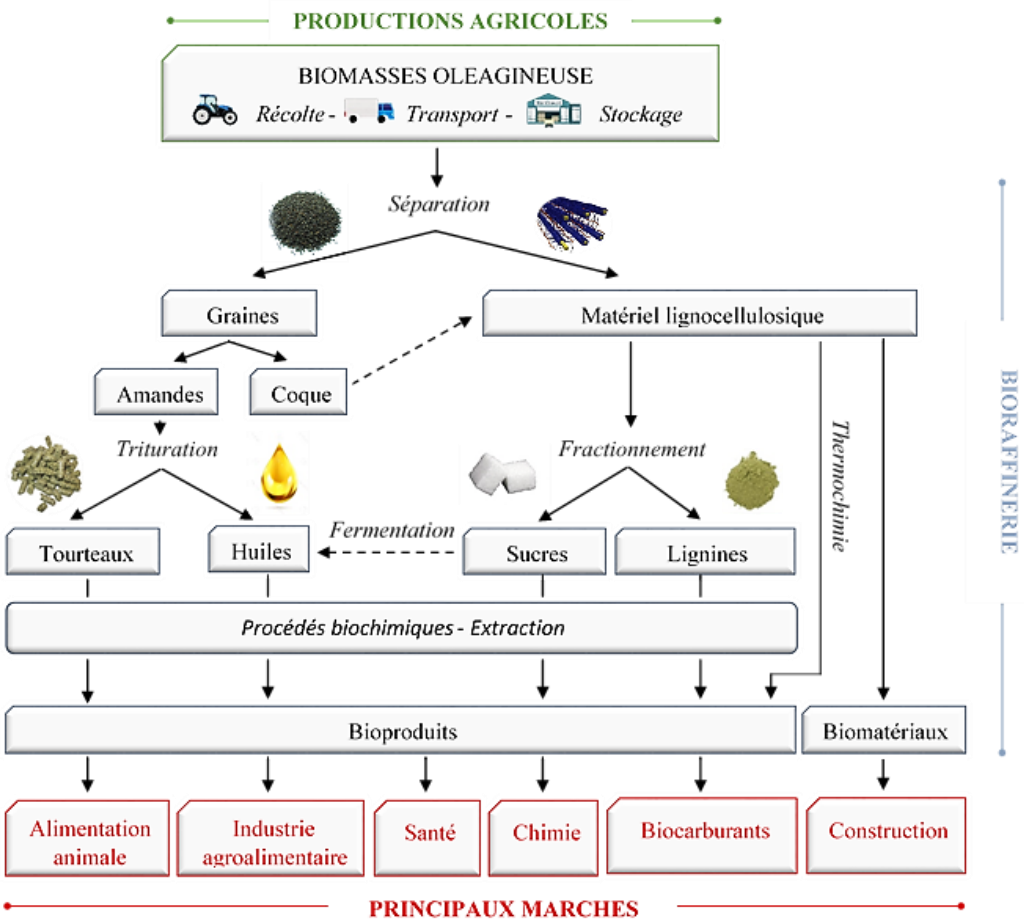


Figure I-4 - Schéma simplifié de la bioraffinerie des oléagineux (d'après SAS PIVERT, « la bioraffinerie oléagineuse »)

En France, la bioraffinerie des oléagineux a été retenu dans le cadre des investissements d'avenir et un grand programme de recherche a été lancé pour promouvoir cette filière. En 2012, l'Institut pour la Transition Energétique P.I.V.E.R.T. a été créé afin de développer une filière française compétitive dans le secteur de la chimie du végétal à base de la biomasse d'origine oléagineuse. A l'interface de la recherche académique et du monde industriel, PIVERT s'articule autour de quatre grands axes stratégiques :

- La recherche, avec le programme GENESYS
- Le développement et démonstration, avec le BIOGIS Center
- L'industrialisation, avec les projets de maturation
- Le développement des compétences via la formation

Le Programme GENESYS est un programme de recherche œuvrant pour le développement de la bioraffinerie oléagineuse. Il porte sur tout le cycle de la biomasse, depuis la production agricole jusqu'aux bioproduits, en utilisant des procédés de transformation (fractionnement, chimie, biotechnologie…). Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet BRASSICA qui a été retenu et financé dans le cadre de l'appel à projet AAP PIVERT 2016, un vaste programme de recherche compétitif visant à déterminer les bases de la bioraffinerie oléagineuse du futur en explorant et en développant de nouvelles voies de valorisation des différentes fractions de la graine de moutarde brune (*B. juncea*) conformément aux principes de la bioraffinerie et de la chimie verte.

Rattaché principalement au SP2 du programme GENESYS, portant sur "les procédés de fractionnement et de thermochimie", et en lien direct avec les autres sous programmes, le projet BRASSICA est un projet transversal qui vise à exploiter les cultures intermédiaires piège à nitrates (CIPAN) de *Brassica juncea* (moutarde brune). Cette moutarde génère des graines riches en huile (>35%) mais également en glucosinolates (≈ 100 µmol/g), facteurs antinutritionnels que l'on retrouve dans les tourteaux qui, de ce fait, deviennent impropres à l'alimentation du bétail alors qu'ils sont riches en protéines de qualité. Le projet BRASSICA a pour ambition de lever ce verrou en extrayant les facteurs antinutritionnels de la graine pour exploiter leur activité biologique en biofumigation comme agent de contrôle des ennemis de cultures.

Les glucosinolates majoritaires de *B. juncea* sont la sinigrine et la gluconapine, précurseurs d'isothyocianates-alkenyl aliphatique un pesticide naturel à large spectre. Dans un contexte de réduction des pesticides de synthèse, la formulation d'un complexe réactif à base de glucosinolates pourrait trouver sa place sur un marché en demande de solutions efficaces et acceptables pour l'environnement. Par ailleurs, le choix d'une extraction des glucosinolates pour améliorer la qualité des tourteaux permettra de fournir une nouvelle source de protéines pour l'alimentation animale. Enfin, l'huile de cette moutarde est riche en acide érucique à fort potentiel d'application en lipochimie. Le schéma de bioraffinage proposé intègre les acteurs en amont et en aval de la chaîne de transformation. Le projet BRASSICA est un projet transversal qui réunit des compétences complémentaires en termes d'expertise au niveau biologique, agronomique, procédés, chimique et économique. Le partenariat intègre **TERRES INOVIA** pour la sélection des variétés, la fourniture des graines et l'analyse chimique des solides (graines et tourteaux), le laboratoire **TIMR (UTC/ESCOM)** pour la mise en œuvre et l'optimisation des procédés d'inactivation de l'enzyme, d'extraction d'huile et de glucosinolates, **OLEAD** pour la validation de ces procédés à l'échelle pilote, l'**INRA** de Nouzilly pour tester les tourteaux obtenus sur les volailles, **l'UMR PAM (AgroSup Dijon)** pour la formulation de produits phytosanitaires à partir des glucosinolates produits, **l'UMR Agroécologie (INRA de Dijon)** pour tester l'efficacité des glucosinolates extraits et formulés sur les cultures et leur impact environnemental, enfin le **CREIDD**

(UTT) pour l'évaluation environnementale et économique en vue de la valorisation industrielle de ces composés.

Ce travail de thèse est dédié à la mise en place et l'optimisation des procédés viables et efficaces pour inactiver la myrosinase dans les graines avant d'en extraire l'huile, extraire et purifier les glucosinolates pour fournir un extrait actif et purifié pour la formulation du produit phytosanitaire. Nous présenterons dans la suite de ce chapitre l'état de l'art en lien avec ces points qui seront traités dans le cadre de cette thèse.

I.2. La moutarde brune (Brassica juncea)

I.2.1. Le genre Brassica

Le genre Brassica appartient à la famille des Brassicaceae (brassicacées) qui regroupe environ 3700 espèces réparties dans plus de 350 genres ayant une diversité génétique considérable et d'intérêt agronomique et alimentaire (Dixon, 2007;Warwick *et al.*, 2009;Hayward, 2011). Brassica est le genre le plus diversifié comprenant une cinquantaine d'espèces et de nombreuses sous-espèces et variétés dont on peut citer notamment le colza, le chou et ses variétés (chou-fleur, chou de Bruxelles, chou rouge etc.) le brocoli, la navette, le navet et les moutardes que l'on retrouve abondamment dans notre alimentation. Cette diversité s'explique par des siècles d'évolution et d'adaptation face aux conditions environnementales et à l'intervention de l'Homme dans sa volonté de culture. Dans la nature, *B. nigra* (moutarde noire), *B. oleracea* (chou commun) et *B. rapa* sont les trois espèces diploïdes et ancestrales du genre Brassica qui, par des combinaisons génétiques, ont donné naissance à leurs hybrides amphidiploïdes : *B. carinata* (moutarde éthiopienne), *B. juncea* (moutarde brune) et *B. napus* (colza) (Dixon, 2007; Ostergaard & King, 2008; Hayward 2011). L'ensemble s'organise selon le « Triangle de U » (U, 1935) (Figure I-5) qui illustre les relations entre ces espèces.

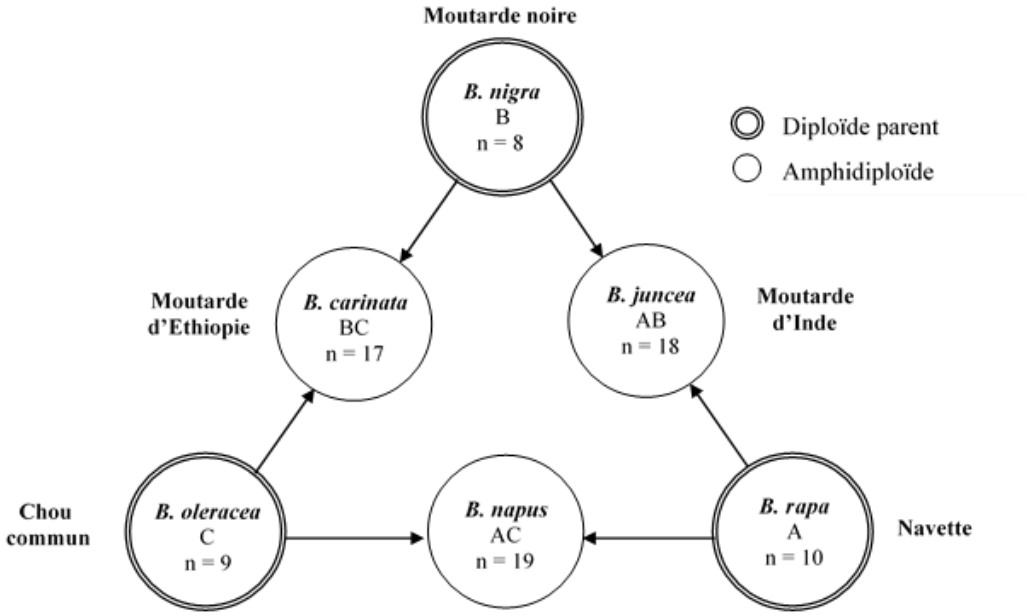


Figure I-5 - « Triangle de U » (1935) représentant les relations génétiques entre les espèces diploïdes et amphidiploïdes de Brassica. « n » représente le nombre de chromosomes de chaque génome.

Les génomes de *B. rapa*, *B. nigra* et *B. oleracea* ont été nommés A, B et C respectivement. Ceux de leurs amphidiploïdes sont par conséquent représentés par AB, AC et BC pour *B. juncea*, *B. napus* et *B. carinata* respectivement. Leurs populations respectives ont été amenées à se différencier et à évoluer via des hybridations spécifiques du fait de leur éloignement géographique et des conditions climatiques, donnant naissance à de nombreuses sous-espèces (Tableau I-2).

La moutarde brune, appelée aussi moutarde indienne ou moutarde chinoise (*B. juncea*) est un amphidiploïde dont le génome résulte d'une hybridation naturelle entre *B. rapa* (syn. *Brassica campestris*) et *B. nigra*. Celui-ci combine le cycle de croissance rapide propre à *B. rapa* et les caractéristiques oléagineuses de *B. nigra*.

Tableau I-2 - Diversité du genre Brassica : espèces et sous espèces

Espèce	**Sous-espèces**	**Nom commun**
B. oleracea	*alboglabra*	Brocoli chinois
	botrytis	Chou-fleur
	capitata	Chou blanc
	gemmifera	Chou de Bruxelles
	gongylodes	Chou-rave
	italica	Brocoli
	sabauda	Chou de Milan
	sabellica	Chou frisé
	viridis	Chou cavalier
B. rapa	*chinensis*	Chou de Chine
	oleifera	Navette
	pekinensis	Chou chinois
	rapa	Navet
	ruvo	Brocoli-rave
B. napus	*napus*	Colza
	rapifera	Rutabaga
B. juncea	-	Moutarde d'Inde
B. nigra	-	Moutarde noire
B. carinata	-	Moutarde d'Ethiopie

I.2.2. Caractéristiques de la plante

I.2.2.1. Répartition géographique et économie

La moutarde brune trouve ses origines dans les terres d'Asie centrale et orientale et est cultivée en Asie et en Europe depuis des milliers d'années La plante peut être encore trouvée à l'état sauvage dans le sud de l'Iran et au Proche Orient. *B. juncea* a de nombreux usages : principalement en alimentation où les feuilles sont consommées comme légumes, dans l'industrie alimentaire pour la production d'huile végétale et la préparation de condiments via les graines, l'alimentation animale où on l'utilise comme fourrage ou encore à des fins médicinales.

Du fait de sa résistance naturelle à la chaleur et à la sécheresse, la moutarde brune est essentiellement cultivée dans des pays ayant un climat subtropical et tempéré (Barbetti *et al*., 2012). Cette bonne adaptabilité permet de la substituer aux cultures de colza dans les régions où les variations

climatiques entrainent des baisses de performances. Les graines ont une saveur piquante et légèrement poivrée. Elles sont essentiellement utilisées pour l'extraction de l'huile et la fabrication de la moutarde. Dans de nombreuses régions du globe comme en Inde, au Pakistan au Bangladesh et dans les régions voisines de la Russie où son goût piquant est très apprécié, la consommation d'huile de moutarde se place même devant celle de l'huile d'olive. En 2016, plus de 95% de la production mondiale de graines de moutarde brune était assurée par une dizaine de pays (Figure I-6), avec le Canada en principal pays exportateur (35.8% de la production mondiale). En Inde, les cultures de *B. juncea* représente plus de 80% de la production oléagineuse totale. La Chine quant à elle représente le foyer où l'espèce y présente le plus de variétés (PROTA, 2007).

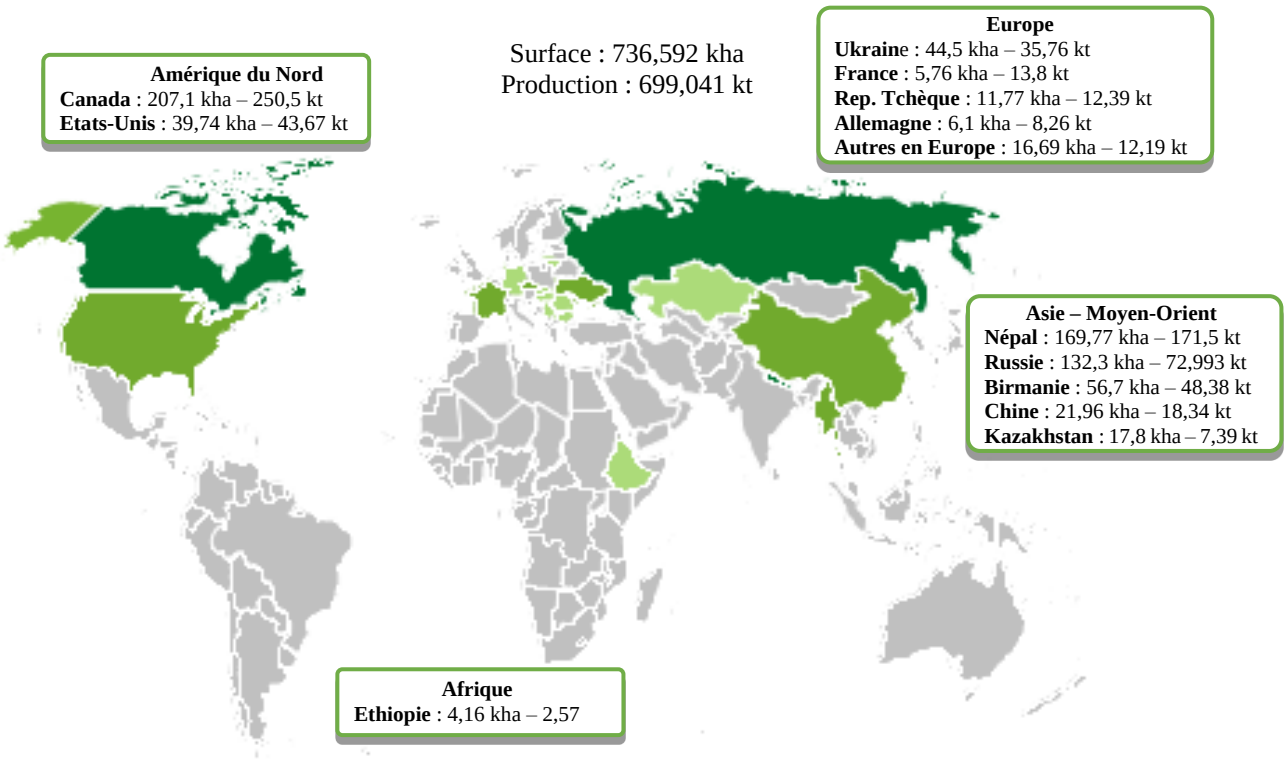


Figure I-6 - Cartographie mondiale de la culture et de la production de la moutarde brune

En raison de son utilisation traditionnelle pour la production de condiments, les variétés présentent la plupart du temps de hautes teneurs en acide érucique ($C_{22}H_{12}O_2$), et en glucosinolates, molécules responsables de la saveur piquante de la moutarde. Dans les pays occidentaux, l'emploi de *B. juncea* comme huile alimentaire est restreint en raison de sa teneur élevée en acide érucique ; le tourteau de graines de moutarde est riche en protéines mais est rendu impropre à la consommation animale à cause de sa forte teneur en glucosinolates, facteurs antinutritionnels qui le rendent toxique et inappétent. En France, la culture de *B. juncea* se concentre en Bourgogne où sa production a été massivement relancée à la fin des années 1990 pour se détacher entre autres de la dépendance canadienne et pour développer de nouvelles variétés plus productives et de meilleures qualités. La surface cultivée a été ainsi multipliée par dix en l'espace d'une vingtaine d'années, passant de 565 ha en 1994 à 5760 ha en 2016 (Figure I-7) avec une implantation des usines de transformation significative pour la production de la moutarde de Dijon. On distingue la moutarde d'hiver et la moutarde de printemps selon la saison de semis. La culture donne des meilleures performances en hiver avec des rendements en graines variant de 1000 à 2500 kg/ha en fonction des conditions climatiques, de la qualité des sols et de la variété. Cette

récente spécialisation s'observe par une productivité bien supérieure pour la France avec un ratio production/surface (t/ha) de 2.4 contre en moyenne 0.9 pour les pays leaders (1.2 pour le Canada).

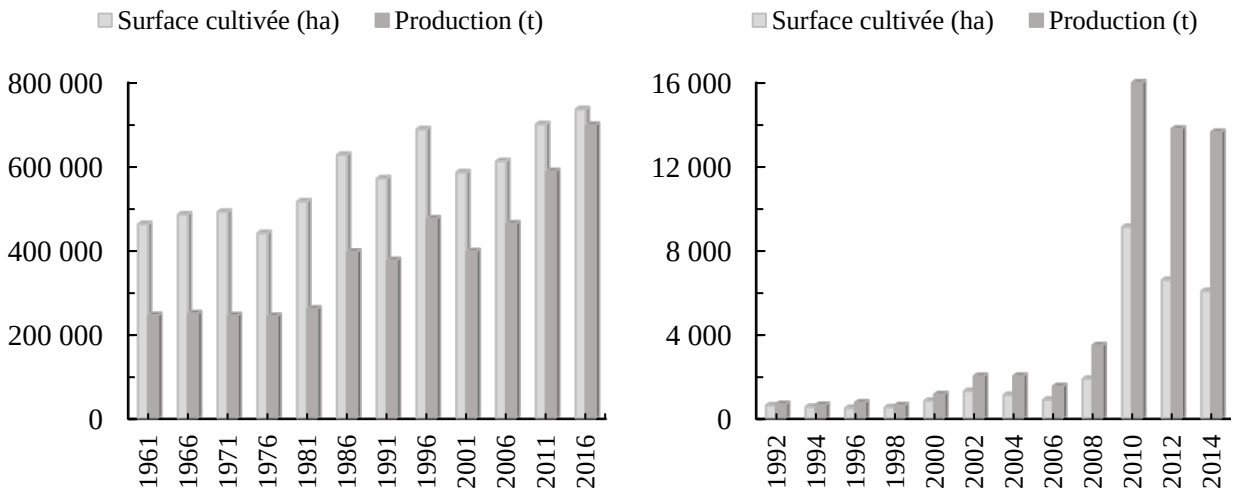


Figure I-7 - Evolution temporelle de la surface cultivée (ha) et de la production (t) de graines de moutarde dans le monde (gauche) et en France (droite). Source : FAOSTAT.

I.2.2.2. Description de la plante

Brassica juncea se présente sous la forme d'une plante herbacée érigée dont la tige peut atteindre une hauteur de 0.40 à 1.60 m à la floraison, souvent non ramifiée. Elle possède des racines tubéreuses et de larges feuilles alternes, entières, ovales et dentées. La tige se termine classiquement par une inflorescence qui se présente sous la forme d'une grappe simple, terminale portant des fleurs jaune clair à quatre pétales. Les graines brunes, rondes, sont enfermées dans des siliques de 5 cm de long.
La moutarde se caractérise par un cycle de croissance rapide en 60-70 jours. La germination se produit en général dans les cinq jours après le semis à 20-25°C. Avec des températures et des conditions d'humidité adaptées, les feuilles peuvent pousser très rapidement en trois semaines. Dans des conditions tropicales, la floraison peut également avoir lieu très rapidement ; un stress hydrique, ou un sol peu fertile, favorisant une floraison précoce. Les graines peuvent être prêtes pour la récolte dans les quatre semaines à partir de la floraison (PROTA, 2007).

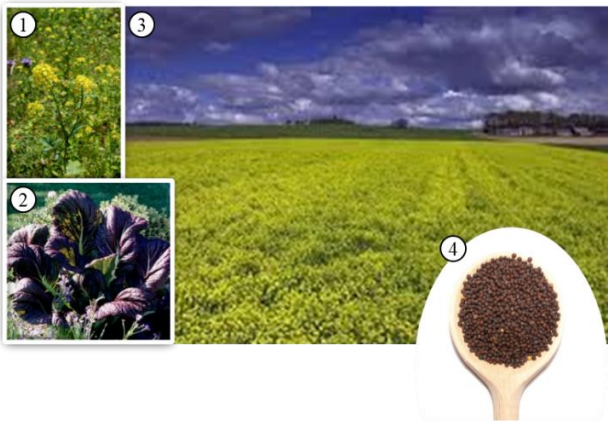


Figure I-8 – Illustrations des différents organes de la moutarde brune : 1. Plante; 2. Feuille; 3. Champ de moutarde de Dijon; 4. Graines

I.2.2.3. Ecologie et intérêt agronomique

Les avantages agronomiques de la plante sont considérables en raison de sa résistance à des conditions climatiques défavorables ou extrêmes et aux ravages d'insectes : elle est capable de tolérer des températures de 6 à 37°C, un stress hydrique, un pH élevé ou bas, la salinité des sols…etc. ainsi que sa résistance aux agressions d'insectes et autres herbivores. Par ailleurs, l'intérêt de *B. juncea* réside dans sa capacité à résister à de multiples agents pathogènes et champignons. Ces propriétés couplées à son cycle de croissance rapide font de *B. juncea* une plante oléagineuse adaptée aux cultures intermédiaires piège à nitrates (CIPAN) pour protéger les parcelles entre deux cultures de vente et permettre la reconstitution de la fertilité du sol (Barbetti *et al*., 2012).

I.2.3. Caractéristiques de la graine

Les graines de *B. juncea* sont de forme et de taille similaire à celle du colza. Leur composition est susceptible de varier en fonction de la variété et des conditions pédoclimatiques. Elles présentent en moyenne une teneur de 36% en huile et de 28% en protéines (Duke, 1983 ; USDA, 2002) et une teneur en glucosinolates autour de 100 µmol/g MS.

I.2.3.1. Composition de l'huile

L'huile de moutarde est très riche en acide gras insaturés (Tableau I-3) avec environ 60% d'acides gras monosaturés, 21% d'acide gras polyinsaturés et 12% de graisses saturées (USDA, 2002). L'huile est principalement riche en acide érucique, chaîne de 22 atomes de carbone, avec une teneur pouvant dépasser les 50% lui permettant d'afficher de hautes performances dans un marché à valeur ajoutée pour l'oléochimie avec des débouchés en lubrification, tensioactifs, cosmétique, parfums, production de nylon et biocarburants.

Tableau I-3 - Composition en acides gras d'une huile de moutarde traditionnelle (PROTA, 2007)

Acides gras	Teneur (%)
Acide érucique (C22:1)	25-55
Acide oléique (C18:1)	8-33
Acide linoléique (C18:2)	12-21
Acide linolénique (C18:3)	8-14
Acide eicosénoïque (C20:1)	6-12
Acide palmitique (C16)	2-4
Acide stéarique (C18)	0.8-1.5
Acide arachidique (C20)	0.5-1.2
Autres*	0.2-4.5

* Acide palmitoléique (16:1), acide nervonique (24:1), acide béhénique (C22), acide lignocérique (C24)

I.2.3.2. Composition en glucosinolates

La nature des glucosinolates est relativement constante en dépit des variétés. En 2015, la détermination de la variabilité en teneur des GSL dans les graines de moutarde a été étudiée sur un ensemble de 190 génotypes (Merah, 2015). *B. juncea* contient généralement deux glucosinolates majeurs : la sinigrine (allyl- ou prop-2-enylglucosinolate) et la gluconapine (but-3-enyl-glucosinolate)

avec une forte dominance de la sinigrine chez la plupart des espèces (> 90 µmol/g MS contre 10 µmol/g MS de gluconapine dans plus de 120 espèces).

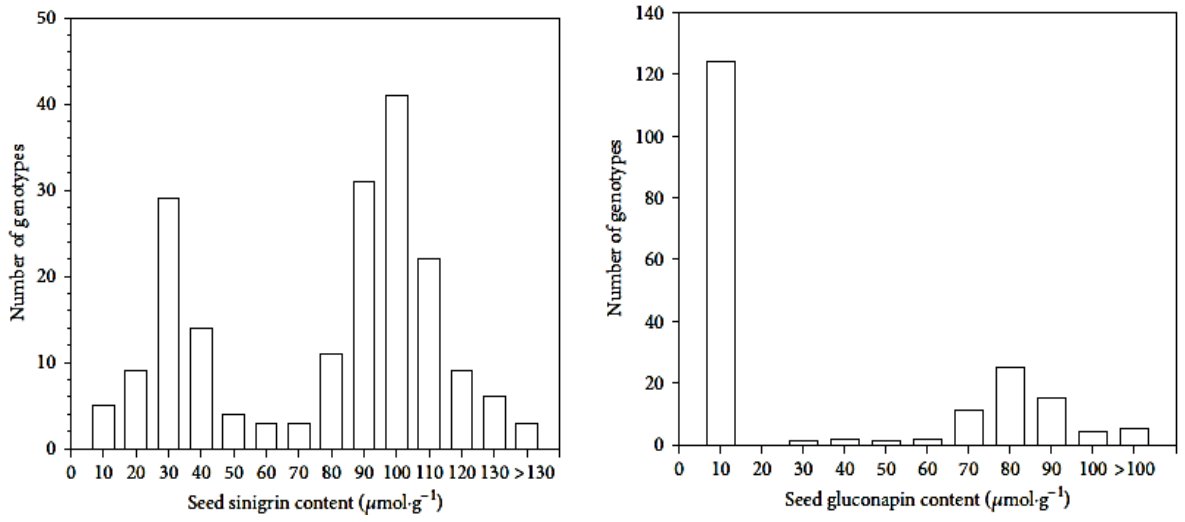


Figure I-9 - Répartition des teneurs en sinigrine et gluconapine dans des graines de moutardes brune issues de 190 génotypes (Merah, 2015)

I.2.3.3. Composition du tourteau

En raison de la faible proportion en composés pariétaux, le tourteau de *B. juncea* présente une forte teneur en protéine (~40%), teneur intermédiaire entre le tourteau de colza (34%) et celui de soja (46%). Celui-ci constitue une source tant pondérable que qualitative de protéines au vu d'un profil d'acides animés diversifié, riche en lysine et en acides aminés soufrés (Tableau I-4) qui en font une denrée alimentaire à haute valeur nutritionnelle adaptée aux besoins des éleveurs et dont l'équilibre en acide aminés peut permettre la réduction des effluents azotés des animaux. Cependant, sa richesse en glucosinolates (>100 µmol/g de tourteau) interdit sa valorisation en alimentation animale (Merah, 2015).

Tableau I-4 - Composition chimique de tourteau (2.4% d'huile) et des protéines de *Brassica juncea* (source : FeedBase)

Composition du tourteau			
Matière sèche (%)		*10*	
Matières grasses (%)		*2.4*	
Protéines (% MS)		*40.6*	
Cendres (% MS)		*6.9*	
Sinigrine (µmol/g MS)		*118*	
Gluconapine (µmol/g MS)		*44*	
Profil d'acides aminés (en % des protéines)			
Lysine	*4.3*	*Arginine*	*2.4*
Thréonine	*4.9*	*Alanine*	*4.5*
Méthionine	*2.7*	*Acide aspartique*	*11.4*
Isoleucine	*3.8*	*Acide glutamique*	*30*
Valine	*4.0*	*Glycine*	*5.1*
Leucine	*7.8*	*Sérine*	*5.5*
Phénylalanine	*4.4*	*Proline*	*7.7*
Histidine	*1.4*		

I.3. Les glucosinolates

Les glucosinolates (GSL), β-thioglucoside-*N*-hydroxysulfates (ou,1-thio-β-D-glucopyranosidiques), sont des métabolites secondaires présents presque exclusivement dans les plantes crucifères et que l'on trouve couramment en hautes concentrations dans de nombreuses espèces de la famille des Brassicaceae (Fahey *et al*, 2001). Les premières observations relatives à leur existence remontent au XIXème siècle où les GSL sont identifiés comme étant responsables de la saveur piquante des graines de moutarde. Aujourd'hui, plus de 120 GSL ont été identifiés (Fahey *et al.*, 2001) mais seul un nombre restreint se retrouve essentiellement dans les plantes issues des Brassicacées et dont les organes sont couramment consommés (moutarde, chou, chou-fleur, brocoli, radis, cresson etc.). La composition et la concentration en GSL est extrêmement variable d'une espèce à l'autre mais également au sein d'une même espèce en fonction du type de tissu, des conditions environnementales, des conditions de culture, et le stade de développement de la plante (Bennet *et al.*, 2004; Bhandari *et al.*, 2015). Pour la majorité des plantes du genre Brassica, la majorité des GSL se retrouve dans les fleurs et les graines (Gupta *et al.*, 2012; Bhandari *et al.*, 2015).

Les GSL jouent un rôle important dans la protection de la plante. En effet, les plantes utilisent des substances dérivées des GSL comme mécanisme de défense contre les agressions externes (organismes pathogènes, ravages des insectes et herbivores), agissant comme des pesticides naturels et de formidables agents de biofumigation (Sarwar *et al.* 1998; Holst *et al.* 2004).

I.3.1. Structure chimique

Les glucosinolates présentent la structure illustrée en Figure I-10 d'après les travaux de Etlinger (1956, 1957) et de Marsh & Waser (1970) réalisés sur la sinigrine. Celle-ci a été confirmée et généralisée pour l'ensemble des glucosinolates par spectroscopie 1H et 13C-NMR (Olsen and Sørensen, 1981).

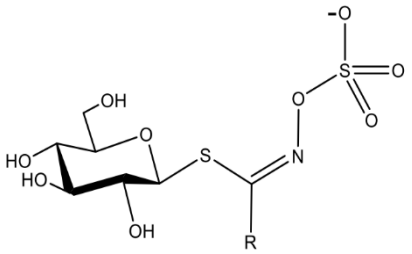


Figure I-10 - Structure générale des glucosinolates

Les GSL appartiennent aux glucosides et contiennent basiquement trois groupes liés à un carbone central : un glucose via un atome de soufre (groupe thioglucose), un groupe sulfate via un atome d'azote (formant un aldoxime sulfaté), et un groupe latéral R caractéristique du glucosinolate et responsable de la variation de ses propriétés biologiques. Fahey et ses collaborateurs (2001) ont ainsi établi une liste des 120 GLS les plus communs en les classant en fonction de la structure chimique du groupe R qui peut être de nature aliphatique (alkyl, alkenyl, hydroxyalkenyl, ω-methylthioalkyl, ω-sulfinyl-, and ω-sulfonylalkyl), aromatique (benzyl, substituted benzyl) ou heterocyclique (indolyl) (Halkier and Gershenzon, 2006; Agerbirk *et al.*, 2012). Les GSL sont pour la plupart désignés d'après le nom chimique de la chaîne latérale R comme préfixe du terme glucosinolate (Tableau I-5). Certains GSL cependant ont une appellation triviale spécifique pour des raisons historiques, comme la sinigrine et la sinalbine (4-hydroxybenzylglucosinolate) qui ont été les premiers GSL isolés respectivement à

partir des graines de moutarde blanche (*Sinapis alba*) (Robiquet *et al*. 1831) et des graines de moutarde noire (*Brassica nigra*) (Bussy 1840).

I.3.2. Biosynthèse

La grande diversité des GSL est liée à celle des acides aminés précurseurs de ces composés. Les GSL sont synthétisés majoritairement à partir de 8 acides aminés – alanine, valine, leucine, isoleucine, phénylalaline, méthionine, tyrosine et tryptophane. La nature de l'acide aminé parent conditionne le glucosinolate bio-synthétisé. Les GSL sont ainsi groupés en trois catégories : les GSL aliphatiques synthétisés à partir d'acides aminés aliphatiques, les GSL aromatiques synthétisés à partir de la phénylalanine ou la tyrosine et les GSL indoliques synthétisés à partir du tryptophane (Tableau I-5).

Le mécanisme de biosynthèse des GSL peut être conventionnellement divisé en trois phases (Mikkelsen *et al*., 2002; Glawischnig *et al.*, 2003) illustrées en Figure I-11 : La première étape conduit à la formation du groupe aldoxime par hydroxylation puis décarboxylation d'un acide aminé. La deuxième étape est l'introduction d'un atome de soufre sous l'action de la cystéine pour former l'acide thiohydroxamique. Ce dernier est ensuite transformé en thioglucoside en réagissant avec l'uridine. Une réaction de sulfatation menée par l'enzyme PAPS conduit finalement à l'introduction de l'anion sulfate sur l'oxygène du groupement thiohydroximate, donnant ainsi le cœur de la structure du GSL. Le GSL global formé lors de la biosynthèse est enfin susceptible de subir des réactions de transformations supplémentaires sur la chaîne latérale telles que des élongations de chaine par addition de groupement methyle, des oxydations, élimination, hydroxylation etc. (Graser *et al.*, 2000) expliquant ainsi la grande diversité des GSL.

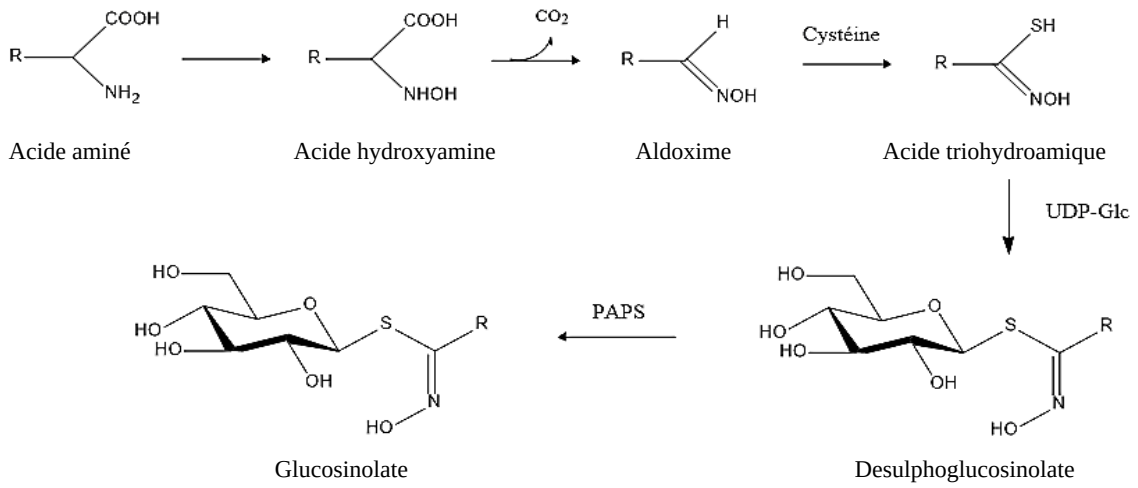
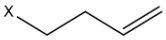
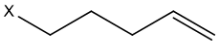
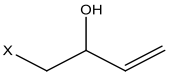
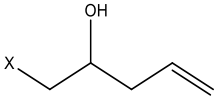
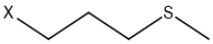
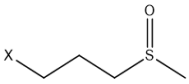
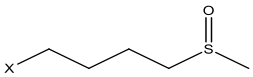
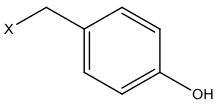
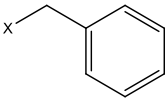
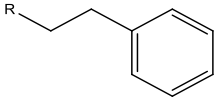
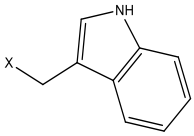
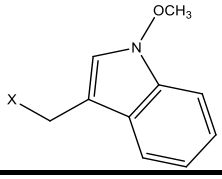


Figure I-11 - Mécanisme général de biosynthèse des glucosinolates

Tableau I-5 - Liste de glucosinolates communs. R représente la structure de la chaine carbonée liée à la structure générale X (d'après Figure I-10).

Nom chimique	Nom commun	R	Plantes sources
		Type I. Alkyle	
2-Propenyl (allyl)-GSL	Sinigrin		Chou blanc, moutarde, raifort
3-Butenyl-GSL	Gluconapin		Chou de Chine, brocoli, navet
4-Pentenyl-GSL	Glucobrassicanapin		Chou de Chine, brocoli
2-Hydroxy-3-butenyl-GSL	Progoitrin		Navet, brocoli, chou blanc
2-Hydroxy-4-pentenyl-GSL	Napoleiferin		Brocoli, chou de Bruxelles, chou-fleur
3-Methylthiopropyl-GSL	Glucoibervirin		Chou frisé, chou blanc, chou-fleur
3-Methylsulfinylpropyl-GSL	Glucoiberin		Brocoli, chou-fleur
4-Methylsulfinylbutyl-GSL	Glucoraphanin		Brocoli, chou blanc
		Type II. Aromatique	
4-Hydroxybenzyl-GSL	Sinalbin		Moutarde
Benzyl-GSL	Glucotropaeolin		Cresson
2-Phenylethyl-GSL	Gluconastrutiin		Cresson, brocoli, navet
		Type III. Indolyle	
Indol-3-ylmethyl-GSL	Glucobrassicin		Brocoli, chou-fleur, chou blanc, navet
1-Methoxyindol-3-ylmethyl-GSL	Néo-Glucobrassicin		Brocoli, chou-fleur, navet

I.3.3. Hydrolyse et produits de dégradation

Bien que les GSL soient des composés relativement stables chimiquement (dans leur état intact) et thermiquement, ils sont sensibles à une hydrolyse enzymatique induite par la myrosinase - ß-thioglucosidase (E.C. 3.2.1.147) (Bones *et al*, 1996; Karcher *et al.*, 1999), une enzyme endogène qui co-existe avec les GSL dans la plante mais respectivement stockés dans des compartiments cellulaires différents (Fahey *et al*, 2001; Bones *et al*., 2006). La réaction d'hydrolyse se produit uniquement après une lésion/dommage (blessure, mastication, congélation ou pâturage) qui permet de mettre en contact l'enzyme et le substrat. Lors de la réaction, le clivage de la liaison thioglycoside conduit à la libération d'une molécule de glucose et d'un aglycone instable, le thiohydroximate-O-sulfonate instable.

En fonction des conditions de la réaction, en particulier le pH, la présence d'ions ferreux et la nature de la chaîne latérale du GSL parent (Rask *et al.*, 2000; Fahey *et al.*, 2001; Grubb and Abel, 2006) ce dernier va être amené à se réarranger en différents produits de décomposition (Figure I-12) : les isothiocyanates (ITC), les nitriles, les thiocyanates, epithionitriles, et les oxazolidine-2-thiones (OT). (Cole, 1976; Daxenbichler and Vanetten, 1974; Gil and MacLeod, 1980; Fenwick *et al.*, 1983; Uda *et al.*, 1986)

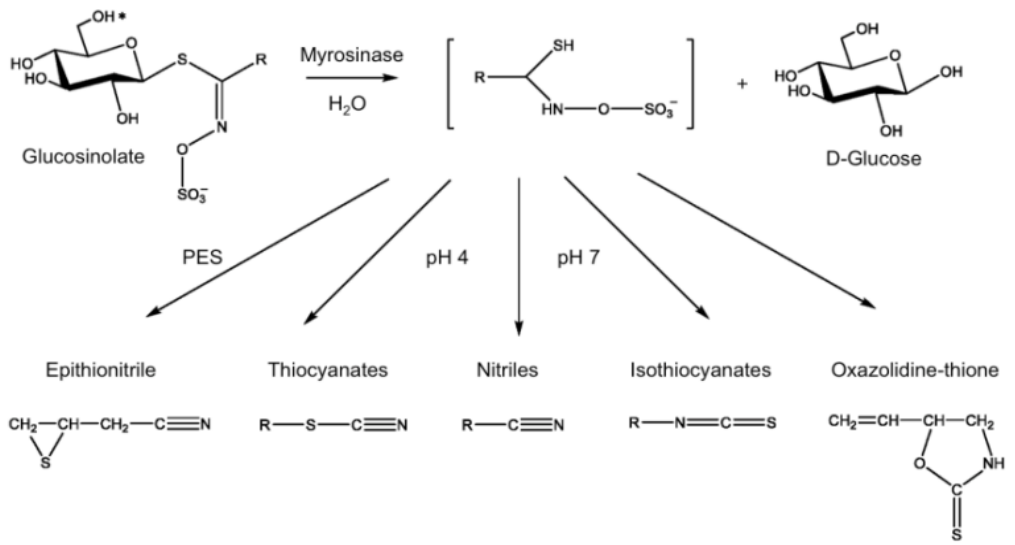


Figure I-12 - Hydrolyse enzymatique des glucosinolates et leurs produits de décomposition. Modifié de Rask *et al*. (2000)

Dans des conditions de pH neutre entre 6 et 7, les ITC sont les composés d'hydrolyse majoritaires. Pour les GSL parents possédant un ß-hydroxyle sur sa chaîne latérale, l'ITC correspondant formé est instable et se cyclise spontanément en oxazolidine-2-thione (OT) (Fahey *et al.*, 2001; Holst *et al.*, 2004;Grubb *et al.*, 2006). En présence d'acide ascorbique, l'ascorbigene et les thiocyanates sont les produits majeurs des GSL entre un pH de 4 à 7. Les conditions et le mécanisme au cours duquel sont formés les thiocyanates ne sont toutefois pas encore clairement définis. Dans des conditions acides, les nitriles sont les produits majeurs de dégradation. Les epithionitriles sont formés en présence d'une epithiospecifier protein (ESP) et d'ions Fe^{2+}.

Les GSL majoritaires de la moutarde brune sont la gluconapine (but-3-enyl-glucosinolate) et la sinigrine (prop-2-enyl-glucosinolate). En France, une étude, menée sur divers génotypes de *B. juncea* cultivés à Dijon, a montré que la teneur en GSL dans les graines variait de 68 à 153 µmol/g MS avec une moyenne de 103 µmol/g. Les analyses ont montré que la sinigrine est le composé majoritaire,

représentant plus de 65% des GSL totaux. Dans une autre étude, Merah (2015) a relevé 73 µmol/g de sinigrine et 27 µmol/g de gluconapine. Ces deux GSL libèrent des ITC volatiles suite à leur hydrolyse enzymatique par la myrosinase. Le but-3-enyl isothiocyanate (BITC) et le prop-2-enyl isothiocynate (ou allyl-isothiocyanate AITC) sont les principaux produits d'hydrolyse respectivement, de la gluconapine et de la sinigrine (Al-Gendy *et al*., 2003). Leur structure chimique est illustrée Figure I-13.

Alors que les GSL ne présentent qu'une faible activité biologique, leurs produits de dégradation révèlent des activités biofumigantes intéressantes comme anti-antifongiques, antibactériens, antioxydants et antimutagéniques agissant pour la plante comme un formidable mécanisme de défense contre les agressions externes. Leur occurrence dans le tourteau de pressage se révèle en revanche néfaste pour les animaux qui le consomment.

Figure I-13 - Structure de chimique de l'allyl-isothiocyanate (gauche) et du but-3-enyl isothiocyanate (droite)

I.3.4. Effets et utilisations des glucosinolates

I.3.4.1. Défense intrinsèques et propriétés biofumigantes

En général, les produits de décomposition des GSL ont un caractère néfaste et agissent comme des poisons contre la plupart des prédateurs, herbivores et insectes. En effet, plusieurs études rapportent leurs effets nocifs sur de nombreux herbivores, comme les oiseaux, mammifères, insectes, mollusques et nématodes (Mawson *et al*., 1994; Giamoustaris et Mithen, 1995). Il a été prouvé que les plantes ont tendance à répondre aux agressions répétées des insectes et des herbivores en augmentant systématiquement la biosynthèse de GSL pour ainsi augmenter leur résistance. Ce système naturel de défense inerte à la plante et ses effets toxicologiques sur la plupart des herbivores démontrent le potentiel des GSL en tant que pesticides naturels.

De plus, les produits d'hydrolyse des GSL sont reconnus pour leurs propriétés fongicides, nématicides et bactéricides (Sarwar *et al.*, 1998;Díaz *et al.*, 2013;Sotelo *et al.*, 2015) d'après leurs effets inhibitoires sur les agents pathogènes (Angus *et al*., 1994;Brown *et al*., 1996). Il a été par exemple démontré l'efficacité des cultures de moutarde pour éliminer des nématodes terricoles, des pathogènes et les mauvaises herbes, tout en promouvant la résistance et la croissance des plantes (Kirkegaard *et al.*, 1994; Boydston, 2004). Il a été démontré que l'AITC (à partir de la sinigrine) est un fumigant efficace contre l'élimination de pathogènes fongiques (Manici *et al.*, 1997; Rosa and Rodrigues, 1999). D'après les travaux de Mayton *et al.* (1996), l'utilisation d'un extrait de *B. juncea* a permis d'inhiber la croissance d'un champignon (*Fusarium sambucinum*) à plus de 50%. Chung *et al.* (2003) ont réussi à atteindre 100% d'inhibition de la croissance des différents organismes pathogènes testés par traitement avec des graines moulues de *Brassica juncea*.

Ce sont ces raisons pour lesquelles la moutarde est introduite comme culture intermédiaire à vocation assainissante du sol (Njoroge *et al*., 2008). En pratique, la plante est broyée et immédiatement enfouie dans les couches superficielles du sol afin d'assurer sa bio-désinfection et la protection phytosanitaire de la culture à venir pendant les premiers stades de son développement (Larkin *et al.*, 2007; Friberg *et al.*, 2009). Holst et Williamson (2004) ont publié une revue sur la biodisponibilité des GSL et de leurs produits d'hydrolyse. De tels effets démontrent et révèlent l'importance des GSL en

biofumigation (Sarwar *et al.*, 1998) en tant qu'agents de contrôle des ennemis de cultures grâce à l'exploitation de leur activité biologique.

I.3.4.2. Effets thérapeutiques

Certains produits de dégradation tels que les indoles et les isothiocyanates sont reconnus pour leurs propriétés anticancérigènes à faible concentration (Conoway *et al.*, 2002). Des études épidémiologiques estiment en outre qu'une consommation abondante de fruits et de légumes crucifères permettrait la réduction drastique du risque d'apparition de cancer (Higdon *et al.*, 2007). Le potentiel de la sinigrine comme agent préventif de la croissance de cellules cancérigènes a été mis en avant notamment d'après les travaux de Bhattacharya (2010). La sinigrine a empêché la croissance du cancer de la vessie chez le rat et bloqué sa prolifération dans d'autres muscles. Jie *et al.* (2014) ont également démontré son activité antiproliférative des agents cancérogènes de l'hépatocarcinogénèse chez le rat et relèvent son potentiel en tant qu'agent anticancérigène pour le foie. Cependant de tels effets restent controversés, d'autant plus que le mécanisme d'action des isothiocyanates demeure inconnu (Hayes *et al.* 2008).

La sinigrine est également reconnue pour ses propriétés anti-inflammatoires. Historiquement la moutarde a été en effet brièvement utilisée à des fins médicinales pour soigner les inflammations et soulager la congestion de certains organes. De tels effets ont été notamment examinés par Lee *et al.* (2014, 2017) qui ont révélé le pouvoir inhibiteur de la sinigrine sur la production de médiateurs inflammatoires.

I.3.4.3. Effets indésirables

Cependant les glucosinolates et leurs dérivés sont controversés dans l'exploitation des cultures oléagineuses à cause de leur occurrence dans le tourteau de graines normalement destiné à l'alimentation animale. En effet de par leur caractère ionique, les GSL ne sont pas extraits avec l'huile et restent dans le tourteau. Les différentes opérations qui ont lieu lors du processus de trituration (prétraitements, pressage mécanique) ont pour effet d'hydrolyser une partie notable des GSL et de libérer leurs produits d'hydrolyse très actifs. Les composés les plus indésirables comprennent les ITC, thiocyanates, les nitriles et les OT. Leurs effets chez les monogastriques sont particulièrement importants et s'exercent sur le métabolisme thyroïdien (Halkier and Gershenzon, 2006) (OT, ITC, thiocyanates) et sur le foie (nitriles). Il a été révélé que les ions thiocyanathes et les nitriles étaient favorables à l'hypertrophie de la thyroïde, affectait les organes reproductifs et ralentissait la croissance (Mawson *et al.*, 1994). Le 5-vinyl-oxazolidinethione, connu couramment sous le nom de goitrine, est également favorable au goitre en inhibant la synthèse de la thyroxine, une hormone de la thyroïde. Par conséquent en raison de leur impact délétère sur la croissance, la fertilité, la performance (production d'œufs et de lait) et leurs effets toxicologiques (Fenwick *et al*, 1983; Verkerk *et al.*, 1998), ils sont considérés comme des facteurs antinutritionnels pour l'alimentation animale (Fahey *et al.*, 2001; Bellostas *et al.*, 2007; Mawson *et al.*, 1994).

Dans ces conditions et pour éviter la dégradation des GSL, une étape d'inactivation de la myrosinase avant l'extraction d'huile est essentielle. Notre idée dans le projet BRASSICA est de désactiver la myrosinase pour éviter la dégradation des GSL et de pouvoir ensuite les extraire sous leur forme native (intacte) pour détoxifier le tourteau et le rendre utilisable en alimentation animale. De plus, les ITC étant des composés extrêmement volatils, l'enjeu est en effet de pouvoir récupérer les GSL dans

leur forme intacte non hydrolysée (la sinigrine et la gluconapine) pour pouvoir exploiter en aval leur propriétés fongicides et bactéricides dans le cadre du développment d'une formule phytosanitaire active pour protéger les cultures végétales (biofumigant). Dans la partie qui suit, nous allons détailler les procédés utilisés pour inactiver la myrosinase ainsi que pour l'extraction et la purification des GSL.

I.4. Inactivation de la myrosinase

I.4.1. Stabilité thermique de la myrosinase

La myrosinase est une enzyme typique des espèces de la famille des Brassicacées qui est impliquée et participe avec les GSL dans le mécanisme de défense de la plante via la réaction d'hydrolyse précédemment décrite. La distribution et la concentration de cette enzyme varient au même titre que les GSL en fonction de la plante, de l'espèce et du tissu. Il a été révélé que la moutarde blanche (*Sinapis alba*) offre la myrosinase la plus active (Barba, 2005), avec une activité spécifique parfois dix fois plus élevée que chez *B. napus* et B. *campestris* (Bones, 1990).

Dans le schéma conventionnel de trituration des graines oléagineuses, la myrosinase est libérée lors du floconnage de la graine et lors de la désolvatation du tourteau à cause de la condensation de la vapeur utilisée. Par conséquent afin d'assurer la récupération et l'exploitation des GSL dans leur état intact, une étape de désactivation de la myrosinase avant l'extration de l'huile est nécessaire. Les conditions de stabilité de la myrosinase sont spécifiques à l'espèce (Ghawi *et al*., 2012). Le Tableau I-6 montre que la myrosinase du brocoli est la moins stable thermiquement par opposition à celle du colza qui reste stable jusqu'à une température de 65°C (extraits bruts).

Tableau I-6 - Stabilité thermique de la myrosinase issue de différentes sources de Brassica (Ghawi *et al*., 2012)

Source de myrosinase	Stabilité limite
Brocoli (extrait brut)	30°C
Brocoli (jus)	40°C
Chou rouge (extrait brut)	40°C
Chou blanc (extrait brut)	50°C
Moutarde (extrait brut)	60°C
Colza (extrait brut)	65°C
Colza (graines entières et flocons)	90°C

I.4.2. Procédés d'inactivation de la myrosinase

I.4.2.1. Traitements thermiques

Du fait de la résistance thermique de l'enzyme, son inactivation met en jeu des traitements à haute température. Pour la moutarde brune, des études ont montré que l'activité de la myrosinase est optimale à un pH de 4-6 et à une température de 40-50°C, diminue à partir de 60°C et disparait totalement après un traitement de 10 min à 80°C (Björkman *et al*., 1973 ; Okunade *et al*., 2015). Dans le cadre de la trituration des graines de colza, une cuisson sur les flocons à 80-90°C (en moyenne d'une trentaine de minutes, le temps de traitement variant selon les espèces et variétés traitées) est mise en œuvre pour faciliter la libération de l'huile lors du pressage. Cependant, les conditions opératoires et l'intervalle de temps entre la libération de l'enzyme et son inactivation sont suffisants pour initier l'hydrolyse des GSL dont on retrouve les produits de dégradation dans le tourteau.

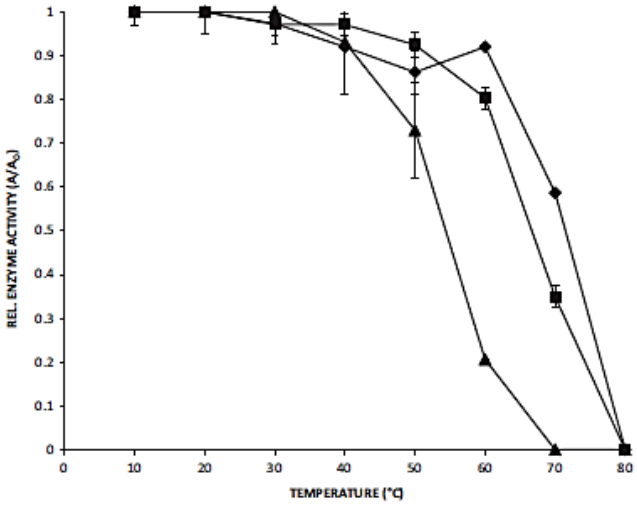


Figure I-14 – Effet du traitement thermique sur l'activité résiduelle de la myrosinase dans les graines de moutarde noire (♦), brune (■) et jaune (▲) pour une durée d'exposition de 10 min (Okunade *et al*., 2015)

Le traitement thermique par chauffage est néanmoins controversé. Tsao *et al*. (2002) ont souligné que le traitement thermique avant l'extraction ne permet qu'une désactivation partielle de la myrosinase, en particulier lorsque la teneur en eau est inférieure à 8%. De nombreuses études confirment que le traitement de la myrosinase est plus rapide avec l'augmentation de l'humidité (Maheswari *et al*., 1980; Oliviero *et al*., 2014). Cependant, la présence d'eau accélère aussi la cinétique d'hydrolyse enzymatique des GSL durant le traitement (Dougherty, 1971).

D'autre part, l'utilisation des micro-ondes (MO) permet un traitement plus rapide et plus ciblé par rapport aux traitements thermiques traditionnels. Contrairement au chauffage conventionnel par conduction pour lequel le transfert de chaleur se fait à partir de la surface du matériau, les micro-ondes sont capables de pénétrer directement au cœur de la matrice permettant au transfert de chaleur de s'effectuer de l'intérieur vers l'extérieur. Il en résulte un échauffement quasi-instantané de la matière caractéristique de l'action des micro-ondes via les phénomènes d'arrangement/réarrangements des molécules soumises au champ électrique alternatif. Il a été prouvé qu'un traitement aux micro-ondes permet non seulement d'inactiver l'enzyme mais également d'améliorer l'extractibilité des GSL et de l'huile (Verkerk et Dekker, 2004; Niu *et al*., 2015). De nombreuses études menées sur la myrosinase de *B. napus* et *B. juncea* se rejoignent quant aux conditions optimales d'inactivation, à savoir l'application des micro-ondes à une puissance induite intermédiaire (500-900 W) durant quelques minutes pour des échantillons de quelques centaines de grammes (300 à 500 g) ajustés préalablement à des taux d'humidité autour de 10% (Maheshwari *et al*., 1980; Owusu-Ansah and Marianchuk, 1991; Niu *et al*., 2015). Dans tous les cas un compromis entre la puissance induite et la durée d'exposition est nécessaire pour limiter la décomposition thermique des GSL. Afin de palier à ces inconvénients du traitement thermique, des procédés alternatifs ont été testés.

I.4.2.2. Traitement à haute pression hydrostatique et CO_2 supercritique (SC-CO_2)

Les traitements à haute pression, les champs électriques pulsés (CEP), le CO_2 supercritique et les ultrasons sont considérés comme des techniques innovantes alternatives aux procédés thermiques conventionnels qui ont montré leur efficacité pour l'inactivation des enzymes tout en préservant la bioactivité des composés d'intérêts (Wimmer et Zarevúcka, 2010; Islam *et al*., 2014). Dans une étude

récente, Okunade *et al*. (2015) ont montré un effet synergique pression-température sur l'activité de la myrosinase de *B. juncea* : pour un traitement de 10 min à 15°C, l'activité de l'enzyme diminue à partir de 400-500 MPa et chute drastiquement après 600 MPa. Frandsen et ses collaborateurs (2014) ont montré qu'un traitement à froid (20°C) et à haute pression (700 MPa) est capable d'inactiver la myrosinase dans le brocoli tout en conservant la quasi-totalité des GSL.

Un traitement au CO_2 supercritique permet de travailler dans des conditions plus douces de température et de pression. L'état supercritique du CO_2 est obtenu lorsqu'il est maintenu au-dessus de sa température et pression critiques respectivement 31°C et 74 bars. Dans sa nature supercritique, il est considéré comme un solvant « vert » neutre, non toxique, non polluant et non inflammable. Le fait de travailler en condition supercritique augmente la diffusivité du CO_2 et facilite sa capacité de pénétration dans le matériel cellulaire. Son acidité provoque une diminution du pH qui a un effet inhibiteur et dénaturant de l'enzyme (Wimmer et Zarevúcka, 2010). Dunford et Temelli (1996) ont pu atteindre 90% d'inactivation de la myrosinase à partir de 35g flocons de colza conditionnés à 20% d'humidité pour un traitement à 75°C, 62.1 MPa en 3h (débit constant de CO_2 à 2.5 g/min). 44% d'inactivation a été constaté dans les mêmes conditions à partir de graines entières (Figure I-15). Le même traitement a cependant eu peu d'effet sur des graines à 8.5% d'humidité. Les auteurs proposent ces conditions pour coupler l'inactivation de la myrosinase avec l'extraction de l'huile. En revanche, ils soulignent l'inconvénient de travailler à taux d'humidité élevé, malgré l'effet positif sur l'inactivation de la myrosinase, du fait de la co-extraction de l'huile et de l'eau durant l'opération.

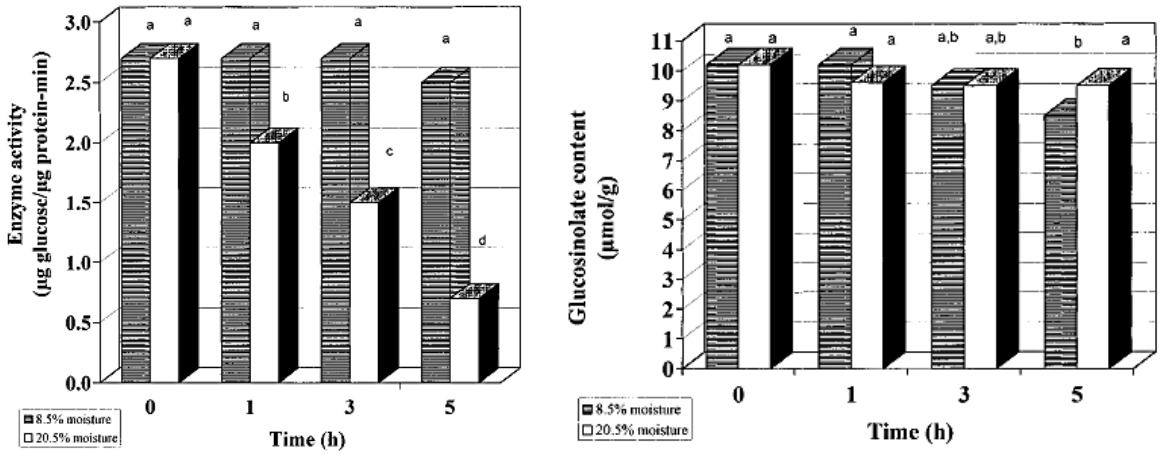


Figure I-15 – Effet du temps et du taux d'humidité des graines de canola sur l'activité de la myrosinase (gauche) et la teneur en GSL (droite) au cours du traitement SC-CO_2 à 62.1 MPa et 75°C

I.4.2.3. Inactivation par ultrasons

Les ultrasons ont également révélé leur potentiel dans l'inactivation des enzymes. Bien qu'aucune étude ne ressorte en ce qui concerne la myrosinase, les ultrasons ont prouvé leur efficacité sur d'autres enzymes telles que le polyphénol oxydase (PPO) (Baltacıoğlu *et al*., 2013), l'alpha-amylase (Yaldagard *et al*., 2008) et la peroxidase (Cruz *et al*., 2006). Pongmalai *et al*. (2013) ont de plus montré qu'un traitement aux ultrasons améliore l'extractibilité des GSL.

Les tableaux suivants condensent la plupart des travaux scientifiques (Tableau I-7) et brevets (Tableau I-8) portés sur l'inactivation de la myrosinase issus de diverses plantes sources.

Tableau I-7 - Etudes portant sur l'inactivation de la myrosinase

Type de traitement	Référence	Matière première
Thermique classique	Björkman *et al*. (1973) Taso *et al*. (2002) Ludikhuyze *et al*. (1999) Van Eylen *et al*. (2006) Van Eylen *et al*. (2008) Ghawi *et al*. (2012) Oliviero *et al*. (2014) Okunade *et al*. (2015)	*Sinapis Alba* & *Brassica napus* *Brassica juncea* *Brassica oleracea* *Sinapis Alba* *Brassica oleracea* *Brassica oleracea* *Brassica oleracea* *Brassica juncea, Brassica nigra, Sinapis Alba*
Micro-ondes*	Maheshwari *et al*. (1980) Kozlowska *et al*. (non daté) Owusu & Marianchuk (1991) Verkerk & Dekker (2004) Niu *et al*. (2015)	*Brassica napus* *Brassica napus* *Brassica napus* (Canola) *Brassica oleracea* *Brassica napus & Brassica juncea*
Hautes pressions	Ludikhuyze *et al*. (1999) Van Eylen *et al*. (2006) Van Eylen *et al*. (2008) Ghawi *et al*. (2012) Frandsen *et al*. (2014) Okunade *et al*. (2015)	*Brassica oleracea* *Sinapis Alba* *Brassica oleracea* *Brassica oleracea* *Brassica oleracea* *Brassica juncea, Brassica nigra, Sinapis Alba*
SC-CO_2	Dunford & Temelli (1996)	*Brassica napus* (Canola)

*Les équipements travaillent à une fréquence de 2.45 GHz

Tableau I-8 – Brevets portant sur l'inactivation de la myrosinase

Référence	Titre	Description
US 3574640 A	*Treatment of mustard seed*	Inactivation de la myrosinase des graines de moutarde par injection de vapeur saturée
US 6517885 B2	*Process for preparing mustard flour*	Traitement par chauffage (60-200°C) et sous pression (0.2-4.0 kg/cm²) pendant 1-60 min après délipidation des graines de moutarde
WO/2012/149941A1	*A process for the manufacture of products from cruciferous crops*	Inactivation de la myrosinase et extraction des GSL par immersion dans une solution aqueuse acide (pH 2.2-2.3 à 0-25°C) après broyage appliqué aux graines de la famille des Capparales (dont Brassicaceae).
US 3732108	*Recovery of and seed meat from thioglucoside-containing oilseed*	Inactivation de la myrosinase à 85°C dans l'eau (ratio solide/eau 1:4, durée 0.5-5 min), et extraction des GSL par macération à 60°C dans l'eau avant séchage et extraction de l'huile
US 4083836 A	*Production of rapeseed protein concentrate for human consumption*	Décorticage, inactivation de la myrosinase par trempage dans l'eau (80-100°C) puis extraction aqueuse des GSL
US 4244973 A	*Process for producing a detoxified rapeseed protein concentrate*	Détoxification du tourteau après hydrolyse enzymatique enzymatique des GSL par la myrosinase
CN 102754682	*Inactivation de la myrosinase par MO*	Inactivation des maca (famille des Brassicaceae) par MO
GB 1241078	*Oilseed floor and meal preparation*	Inactivation par trempage dans l'eau à 185°C, 0.5-5 min puis extraction aqueuse des GSL

La plupart de ces travaux se concentraient sur le traitement de l'enzyme après son extraction du tissu végétal, par trempage du végétal dans l'eau, ou de la matière conditionnée à des taux d'humidités élevés. Ces procédés ne conviennent pas au schéma de valorisation proposé dans le cadre de cette étude. En effet l'extraction de l'enzyme va induire la co-extraction des molécules d'intérêt comme les GSL et les protéines. A cela s'ajoute le coût énergétique des étapes d'extraction et de purification de l'enzyme ainsi que le séchage des graines en vue d'extraire l'huile. Il en résulte une complication du schéma de valorisation. De plus malgré l'effet positif sur l'inactivation de la myrosinase, le traitement de la matière avec un taux d'humidité initial élevé a montré dans tous les cas une forte dégradation des glucosinolates par hydrolyse lors du traitement. Dans ce contexte, il est plus pratique d'inactiver l'enzyme directement dans les graines. Dans le cadre de cette étude, nous testerons plusieurs traitements (chauffage, micro-ondes, CO_2 supercritique) pour inactiver la myrosinase dans les graines sans avoir besoin de l'extraire. L'efficacité de l'inactivation, la consommation énergétique et la préservation des GSL et des protéines seront les critères de choix entre les différents traitements.

I.5. Extraction des glucosinolates

I.5.1. Procédés conventionnels

Les GSL sont ioniques et hydrosolubles. Pour cette raison ils sont récupérés dans l'eau ou dans des solvants polaires types méthanol, éthanol, acétone ou isopropanol. Les procédures mettent en jeu la plupart du temps des solutions bouillantes. L'efficacité de l'extraction est influencée par la température, le solvant d'extraction, le ratio volumique solvant/matériel, l'agitation, la pression et le temps d'extraction.

Les protocoles varient sensiblement en fonction de la méthode analytique. Une procédure commune et générale a été mise en place par l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO, 1992) impliquant une double extraction par une solution aqueuse de méthanol (70% v/v) à 75°C. Wathelet et ses collaborateurs ont simplifié ce dernier protocole (ISO 9167-1) en proposant une seule extraction dans les mêmes conditions. Tsao *et al*. (2002) ont comparé cinq techniques d'extraction de la sinigrine à partir de la moutarde (*B. juncea*) via une solution aqueuse d'ACN à 50% (A-D) ou d'eau (E) avec un ratio solide liquide 1:100 :

- (A) Extraction par soxhlet, durée 24h
- (B) Extraction à reflux, durée 30 min
- (C-D) Extraction par trempage dans solvant bouillant ou froid (température ambiante) respectivement, durée 30 min
- (E) Extraction à température ambiante (22°C), sous agitation, 2 min

Ils ont montré que l'utilisation d'une solution aqueuse d'acétonitrile (50%) bouillante à reflux est la méthode la plus efficace pour la récupération de la sinigrine. Cools and Terry (2012) confirmèrent également ces conditions (ratio solide liquide 1:20, 30 min) sur l'extraction de la sinigrine en comparant quatre techniques d'extraction (Figure I-16). D'autres solvants tels que l'éthanol aqueux, l'eau bouillante, un tampon phosphate, l'acide phosphorique et une solution de méthanol-eau-ammonium ont été également étudiés pour l'extraction de GSL (Clarke, 2010). L'auteur a cependant recommandé l'utilisation du méthanol à 70% comme solvant de choix (par défaut) pour l'extraction des GSL. Les brevets portants sur l'extraction des GSL (voir Tableau I-9) proposent la plupart du temps une extraction aqueuse ou hydro- alcoolique.

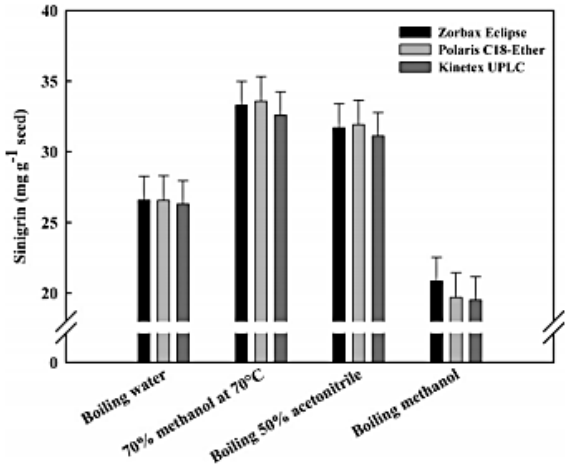


Figure I-16 – Extraction de la sinigrine à partir de graines de moutarde via quatre méthodes différentes d'extraction (Cools and Terry, 2012)

Malgré son efficacité, cette technique d'extraction présente plusieurs limitations. Tout d'abord, l'extraction n'est pas sélective à cause de la co-extraction des molécules polaires telles que les protéines, induisant des étapes supplémentaires de séparation et de purification. Ensuite, l'utilisation de méthanol est vouée à l'abandon en raison de son caractère toxique (classé CMR). Enfin l'application des hautes températures pourraient dégrader la qualité des protéines et des GSL. Dans ce contexte, il est nécessaire de mettre en place une nouvelle méthode d'extraction utilisant des solvants verts dans des conditions plus douces tout en assurant une extraction sélective et efficace. Des techniques alternatives d'intensification de l'extraction (CEP, DEHT, US) pourraient permettre d'atteindre cet objectif. Dans le cadre de cette étude, nous proposons de tester les US et les DEHT pour une extraction sélective des GSL dans des conditions douce (température modérée) et en utilisant uniquement des solvants verts (eau et éthanol).

Tableau I-9 – Brevets portant sur l'extraction des GSL

Référence	Matière première	Procédé d'extraction
EP 23115596	Graines de brocoli	Extraction hydro-alcoolique
EP 2014670	Sous-produits de la culture des brassicacées	Extraction aqueuse
CN 102302532	Tourteau de colza	Extraction hydro-alcoolique
CN 103815129	Tourteau de colza	Extraction par explosion à la vapeur

I.5.2. Procédés alternatifs d'intensification d'extraction

I.5.2.1. Extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes sonores capables de générer des vibrations mécaniques dans un liquide, un solide ou un gaz et qui possèdent la capacité de se déformer. L'action des ultrasons dans des milieux liquides repose sur le phénomène de cavitation : le déplacement des ondes à travers le milieu provoque la formation de zones de compression et de détente due aux oscillations des molécules (Figure I-17), ce qui peut créer la formation de bulles de cavitation dans le liquide. Ces bulles se comportent comme des microréacteurs thermochimiques dont la taille augmente sous l'effet de la pression acoustique jusqu'à implosion. Il en résulte un choc de pression au voisinage de la bulle qui produit un jet de liquide à grande vitesse. Au contact de composés cellulaires, l'intérêt des ultrasons réside dans la

production de ces micro-jets dirigés vers la cellule lors de l'effondrement de la cavitation permettant un endommagement membranaire facilitant la libération des composés intra-cellulaires.

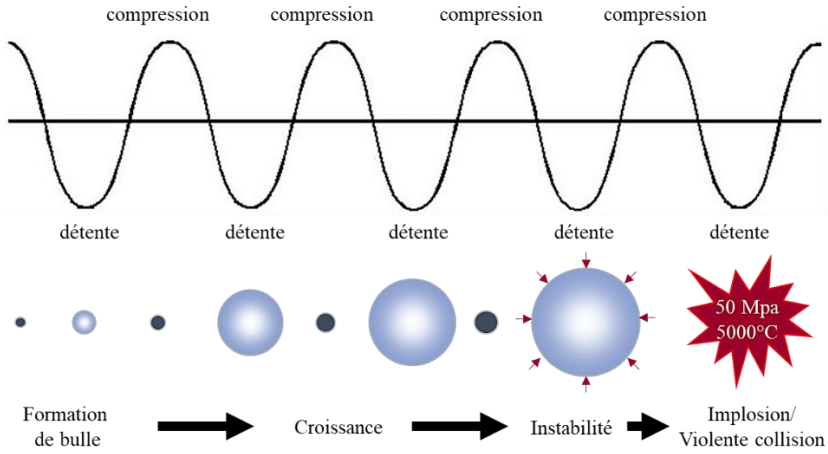


Figure I-17 – Phénomène de cavitation acoustique

Les ultrasons sont utilisés dans de nombreuses applications telles que l'homogénéisation, la désintégration, la stérilisation, le nettoyage, la cristallisation, l'inactivation etc. mais aussi l'extraction de composés d'intérêts à partir de matrice végétale. L'équipe TAI s'est spécialisée dans la désintégration des structures cellulaires par ondes ultrasonores pour l'extraction de composés intra-cellulaires (protéines, polyphénols) à partir de la biomasse cellulosique, végétale et des microalgues. Le Tableau I-10 donne un aperçu des composés valorisés en fonction de la biomasse étudiée.

Tableau I-10 – Valorisation de bio-composés moyennant l'utilisation des ultrasons dans l'équipe TAI

Composé d'intérêt	Produit	Auteur
Polyphénols	Marc de raisin	Boussetta, 2010
Polyphénols	Marc de raisin	Liu, 2012
Lignine	Colza	Brahim, 2016
Polyphénols	Marc de pomme	Wang *et al.*, 2018

L'extraction assistée par ultrasons est une technique simple, efficace et peu coûteuse par rapport aux techniques conventionnelles. Il en résulte des cinétiques d'extraction plus rapides avec de meilleurs rendements et ses principaux avantages résident dans le faible coût d'appareillage, la facilité de faisabilité opératoire un processus écologique. Cependant les effets mécaniques et physiques des ondes ultrasonores sont étroitement liés à la nature de la matrice. L'efficacité des ultrasons dépend également d'autres facteurs comme la puissance de sonification, la fréquence, le mode de diffusion (pulsé ou continu), le temps, la pression et la température. De plus l'utilisation d'une puissance élevée en continu est susceptible d'altérer la qualité des produits.

I.5.2.2. Extraction assistée par décharges électriques de haute tension (DEHT)

Le traitement par décharges électriques de haute tension consiste à appliquer un champ électrique de forte intensité entre deux électrodes immergées dans un liquide ou un gaz.

I.5.2.2.a. Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action des décharges électriques dépend du milieu dans lequel elles sont appliquées : milieu gazeux ou aqueux. Cette thèse se focalisera uniquement sur le traitement par DEHT dans un milieu liquide. Lors du traitement électrique, le type de décharge générée va essentiellement dépendre de la géométrie des électrodes utilisées (pointe-plane, pointe-pointe). L'utilisation d'un système pointe-plane conduit à la formation d'un arc électrique dû au renforcement du champ électrique au sommet de l'électrode pointe. Même si l'interprétation de ce phénomène reste aujourd'hui encore assez discutée, de nombreuses théories ont été développées pour expliquer la formation de l'arc électrique dans les liquides. La plus répandue a été avancée par Jones *et al*. (1995) qui ont supposé l'existence de quatre étapes pour créer un arc électrique dans un liquide avec un champ uniforme :

- La nucléation d'un site de faible densité dans le liquide à proximité de l'électrode
- L'apparition de l'ionisation
- La croissance de l'avalanche électronique
- La propagation du front ionisant

Selon cette théorie, l'application d'une tension élevée entre les deux électrodes entraîne une avalanche d'électrons, ou « streamer » avec une énergie suffisante pour exciter les molécules d'eau. Le streamer qui se propage entre les deux électrodes provoque un claquage responsable de l'apparition de l'arc électrique. Ce claquage provoque une cavitation des bulles, une turbulence de liquide et des ondes de choc de haute amplitude de pression capables de fragmenter le solide présent dans le solvant (Figure I-18). La génération d'une décharge électrique dans l'eau s'accompagne et produit également des rayons UV, des rayons IR et des espèces chimiques actives (radicaux $H^{\cdot}$, $OH^{\cdot}$, $O^{\cdot}$, O_2 et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2), des électrons hautement énergétiques et de l'ozone (O_3) qui sont susceptibles de dégrader les composés en présence.

Un générateur de haute tension et une chambre de traitement sont nécessaires afin de créer les DEHT. L'énergie fournie par le générateur est emmagasinée dans un condensateur puis rapidement déchargée par un commutateur au niveau des électrodes. Le principal frein au développement industriel de cette technologie est la génération des puissances pulsées. La difficulté dans l'élaboration de ces générateurs réside dans les performances des commutateurs qui y sont associés (Pecastaing, 2001).

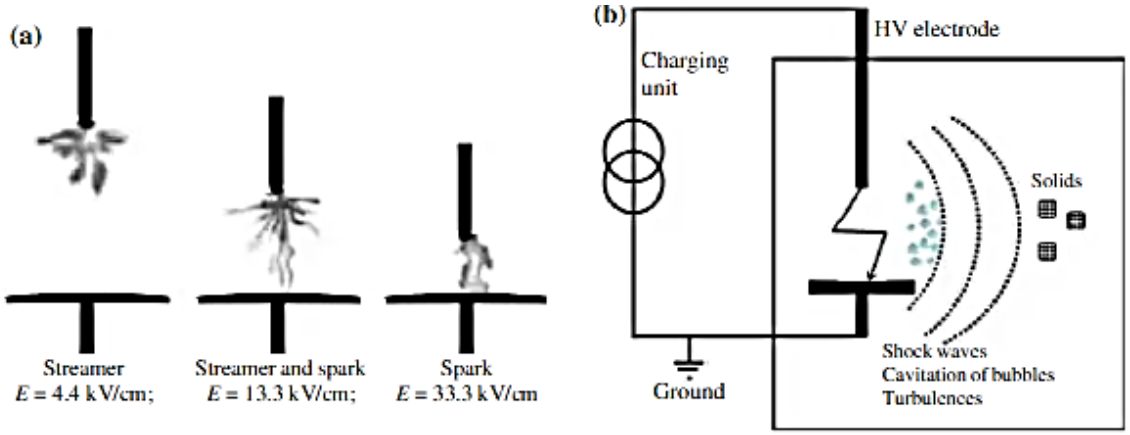


Figure I-18 - Types de décharges électriques dans une solution aqueuse (a) et schéma du processus de désintégration électro-hydraulique (b) (Vorobiev & Lebovka, 2010)

I.5.2.2.b. Champs d'application des DEHT

Les applications des DEHT couvrent des domaines très larges et divers qui peuvent être classées selon la nature du produit de traitement :

- Traitement des gaz : NOx, SOx, dépoussiérage de fumée etc.
- Traitement des liquides : débactérisation, pasteurisation à froid, extraction de composés cellulaires, floculation des boues etc.
- Traitement des solides : séparation puis concassage de déchets, réduction en poudre de produits, écroutage de béton, frittage de céramique etc.

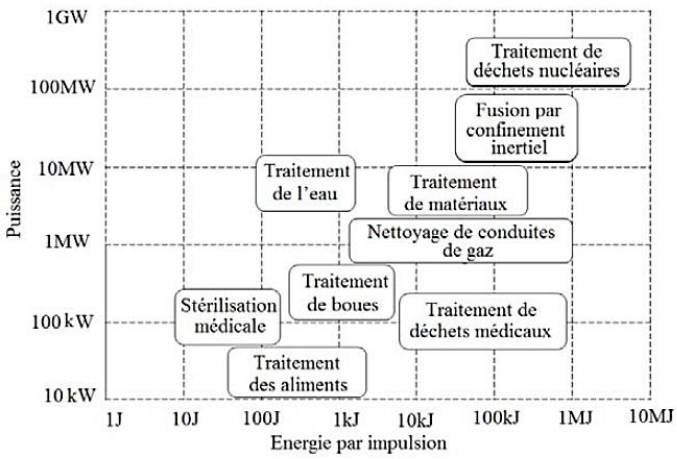


Figure I-19 – Domaines d'application des DEHT (Touya, 2005)

Dans le cadre de cette thèse, l'application des DEHT a été portée sur l'intensification de l'extraction des GSL.

I.5.2.2.c. Intensification de l'extraction de biocomposés cellulaires par application des DEHT

Dans une même logique que pour les ultrasons, les DEHT peuvent être appliquées pour entraîner la fragmentation du produit et accélérer les phénomènes de transfert. L'arc électrique entraîne la formation de zones de très fortes pressions dans le milieu d'extraction qui entraînent la formation de bulles de gaz ainsi que des ondes de choc. Au contact des cellules, les parois et les membranes cellulaires s'effondrent permettant la libération du contenu intracellulaire. De plus, la propagation rapide des bulles dans le milieu crée des turbulences au niveau de l'interface solide-liquide. Ces turbulences provoquent l'agitation du milieu d'extraction, ce qui facilite et accélère davantage le transfert des solutés milieu intracellulaire au milieu extracellulaire.

Les performances d'un traitement par DEHT sur l'intensification de l'extraction de composés cellulaires ont été montrées par de nombreux auteurs. L'efficacité du traitement dépend de l'intensité, du nombre d'impulsions et de la conductivité électrique du milieu d'extraction. Par exemple, les DEHT ont montré leur efficacité pour l'extraction aqueuse des polyphénols et d'antioxydants à partir de marc de raisin (Boussetta, 2010, Figure I-20).

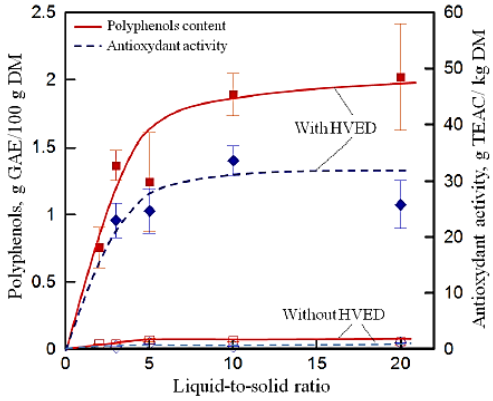


Figure I-20 – Effet du traitement par DEHT (W=80 kJ/kg, d=5 mm, T=20°C, t=20 min) sur l'extraction des polyphenols et l'activité antioxydante en fonction du ratio solide-liquide (Boussetta, 2010)

Vorobiev et Lebovka (2010) ont utilisé ce traitement pour accélérer l'extraction de solutés de soja, de pomme de terre, de feuilles de thé, de fenouil et de graines oléagineuses. Le rendement d'extraction de ces composés après le traitement par DEHT était nettement supérieur par rapport à un essai témoin sans DEHT. Parniakov *et al.* (2014) ont exploité l'effet des DEHT sur l'extraction de composés à haute valeur ajoutée (protéines, glucides, polyphenols) à partir de pelures de papayes (Figure I-21). L'extraction assistée par DEHT a montré les meilleures performances d'extraction comparées à une extraction par CEP et une extraction conventionnelle menée à différentes températures (40-60°C) et pH (2.5-11).

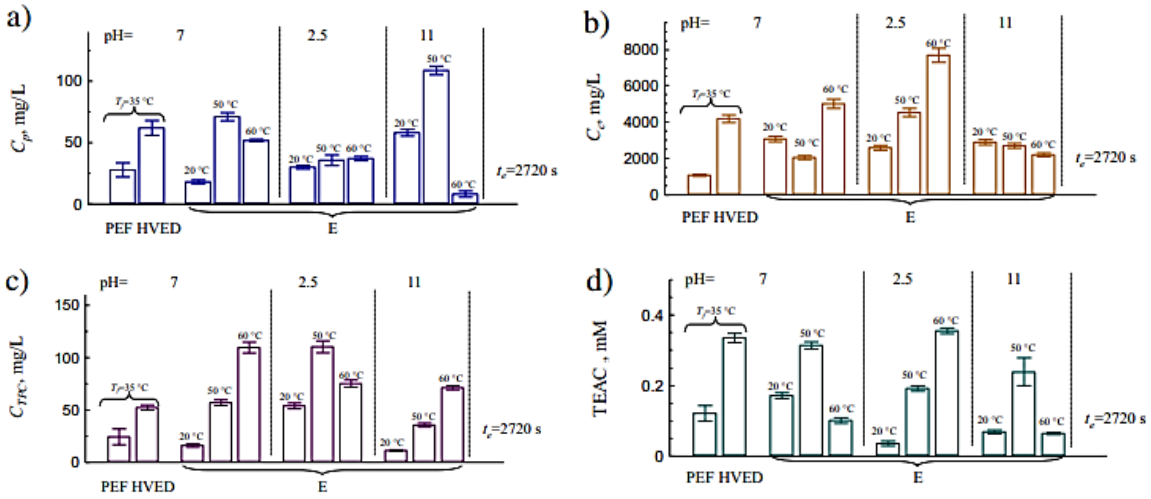


Figure I-21 – Concentration en a) protéines, b) carbohydrate, c) polyphénols et d) activité antioxydante des extraits obtenus par extraction conventionnelle (T=20, 50, 60°C, t = 1h, pH = 2.5, 7, 11, décharges électriques haute tension (DEHT) et champs électriques pulsés (CEP) (Parniakov *et al.*, 2014)

Barba *et al.* (2015) ont étudié l'effet de différents traitements physiques (DEHT, CEP et ultrasons) sur l'extraction de biocomposés à partir de marcs de raisin fermentés (Figure I-22). Ils ont conclu que les DEHT représentent la technique la plus intéressante pour la récupération de composés phénoliques avec une exigence d'énergie moindre que les CEP ou les ultrasons.

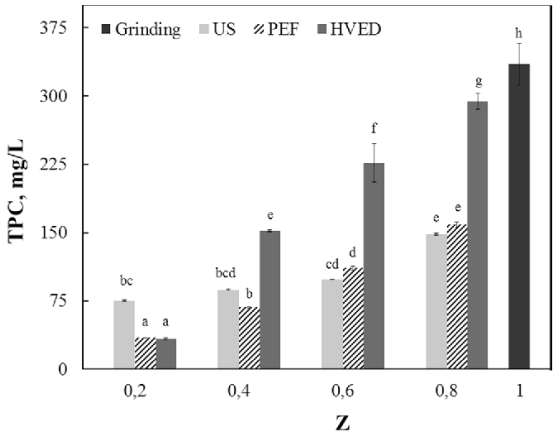


Figure I-22 – Teneur totale en polyphénols extraits en fonction procédé d'extraction : ultrasons (US), champs électriques pulsés (PEF) et décharges électriques haute tension (DEHT) à taux d'endommagement cellulaire Z équivalent

Une autre étude a été menée par Sarkis *et al.* (2015) pour comparer l'efficacité des CEP et des DEHT sur l'extraction des polyphénols et des protéines à partir de tourteaux de sésame. Ils ont remarqué que les décharges électriques de haute tension permettaient une meilleure extraction des protéines et polyphénols que les champs électriques pulsés.

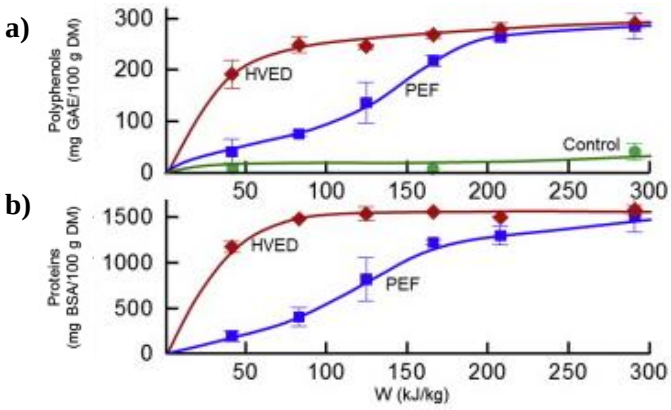


Figure I-23 – Concentration totale en (a) polyphénols et (b) protéines dans l'extrait en fonction de l'énergie appliquée pour un traitement CEP (13 kV/cm) et DEHT (40kV) (Sarkis et al. 2015)

Dans une étude récente, la combinaison d'un prétraitement par DEHT avec une diffusion en milieu acide a permis d'améliorer les rendements d'extraction des pectines à partir de la pulpe de betterave à sucre (Almohammed *et al*., 2017).

Une partie de cette thèse est consacrée à l'application des décharges électriques pour intensifier l'extraction des GSL à partir de tourteau de la moutarde dans l'eau. L'objectif est d'arriver à extraire efficacement et d'une manière sélective les GSL à moindre cout énergétique et en utilisant un solvant vert.

I.6. Technologies de purification des composés cellulaires

La récupération de la ou les molécules d'intérêt lors de l'étape d'extraction est souvent associée à la co-extraction des molécules indésirables. Malgré les efforts pour améliorer la sélectivité de l'extraction, l'extrait récupéré est souvent impur et doit être purifié en aval de l'extraction.

De nos jours les procédés de séparation et de purification sont multiples et divers : précipitation, centrifugation, cristallisation, filtration, évaporation, adsorption, granulation, etc. Le choix du procédé de purification et ses performances sont impactés par les caractéristiques physiques de l'extrait brut comme l'illustre la Figure I-24. Dans le cadre de cette étude, nous nous focaliserons sur la filtration membranaire et la chromatographie échangeuse d'ions qui seront testées et étudiées pour la purification des GSL.

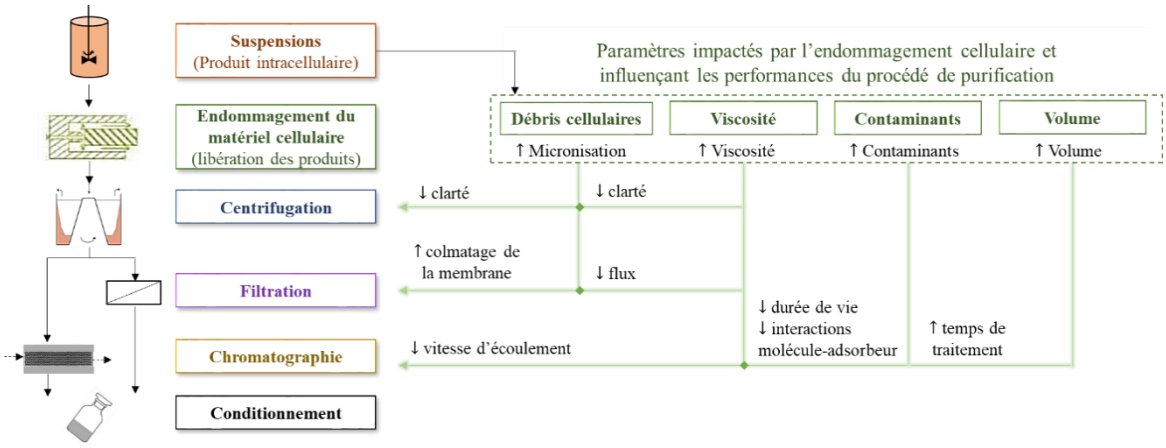


Figure I-24- Impact des produits libérés sur le processus de purification lors du traitement de cellules microbiennes (d'après Balasundaram *et al.*, 2009)

I.6.1. Chromatographie échangeuse d'ions

I.6.1.1. Généralités

La chromatographie fait partie des principales techniques de purification des extraits cellulaires. Elle permet de séparer les constituants d'un mélange en fonction des affinités et des interactions entre une phase stationnaire (support solide) et les solutés entrainés par une phase mobile (solvant). En fonction des charges, les molécules présentes dans un mélange à purifier présentent généralement une affinité préférentielle pour l'une et l'autre des deux phases, permettant ainsi leur séparation. Un appareil chromatographique inclue un système d'injection permettant d'apporter l'échantillon vers l'élément de séparation (colonne) jusqu'à un système de détection.

La composition matricielle d'une colonne est caractéristique du type de chromatographie (Tableau I-11). De nombreux types de matrices sont disponibles en support pour phase stationnaire et leur choix dépendra principalement de la nature des constituants à séparer.

Ces matrices se présentent généralement sous la forme d'un gel constitué de granulés ou d'une résine à l'intérieur d'une colonne et diffèrent selon leur nature poreuse, leur charge électrique ou la nature de leur site d'affinité (Tableau I-12). Ces différences de paramètres physico-chimiques résultent d'une sélection optimale de la nature de la matrice pour une séparation efficace des composés cellulaires d'après leurs caractéristiques physico-chimiques, leur composition moléculaire et leur polarité.

Tableau I-11 - Nature du support de la phase stationnaire selon le type de chromatographie

Type de chromatographie	**Nature du support**	**Domaine d'application (nature des composés à séparer)**
Adsorption	Gel de silice Oxyde d'aluminium	Molécules organiques simples; molécules polaires; molécules électrophiles; polymères Vitamines; alcaloïdes; colorants; composés nucléophiles
Partage	Gel de silice/Oxyde d'aluminium Kieselguhr	Molécules très polaires Sucres et composés amphotères; acides aminés
Partage en phase inverse	Polyamide Cellulose Film E.C.S. 511/541 V	Phénols et dérivés nitrés aromatiques Acides gras et leurs esters méthyliques Composés hydrophiles de séries homologues
Electrophorèse	Gel de silice Oxyde d'aluminium Kieselguhr	Amines; acides aminés et peptides; colorants Hétérocycles azotés polynucléaires Acides nucléiques
Echange d'ion	DEAE/Sephadex/Dowex/ Ecteola	Molécules pour lesquelles le pH modifie la nature de la charge électrique

Tableau I-12 - Caractéristiques du support selon le type de chromatographie

Type de chromatographie	**Caractéristique des granulés**	**Paramètres de séparation**
Exclusion stérique	Poreux (réticulés)	Taille et forme des pores
Echangeuse d'ion	Charge électrique	Nature de la charge
Adsorption	Site d'affinité	Affinité préférentielle du composant avec la phase adsorbante

I.6.1.2. Principe

Cette technique est basée sur les interactions électrostatiques d'un soluté avec la matrice. Elle permet la séparation de molécules chargées et s'applique plus spécifiquement aux espèces ionisées ou ionisables. La phase stationnaire appelée échangeur d'ions est en général représentée par des macromolécules portant des groupements ionisés positivement ou négativement ayant la capacité d'échanger de façon réversible certains de leurs ions au contact d'autres ions provenant d'une solution. Cette technique comprend ainsi une étape d'adsorption au cours de laquelle les contre-ions échangeables de la matrice (résine) sont remplacés par les ions du soluté, puis une étape de désorption permettant de détacher et éluer ces ions en modifiant le pH ou la force ionique de la phase éluante et enfin une étape de régénération du support.

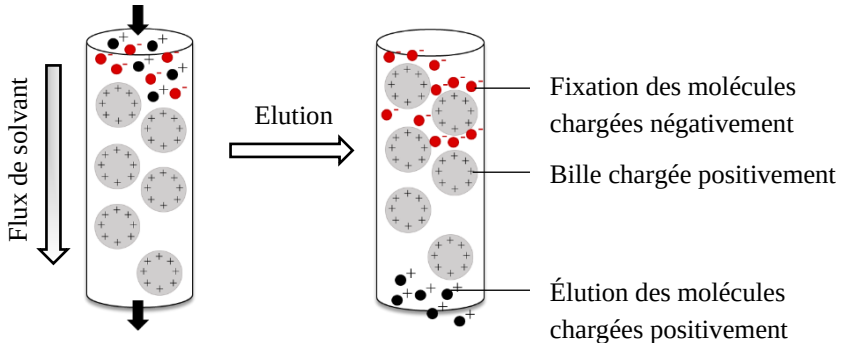


Figure I-25 - Schéma d'un système de chromatographie échangeur d'ions

Les échangeurs d'ions sont catégorisés en deux groupes selon la nature du groupement fonctionnel : les résines échangeuses de cations possédant un groupe fonctionnel anionique et les résines échangeuses d'anions un groupe fonctionnel cationique.

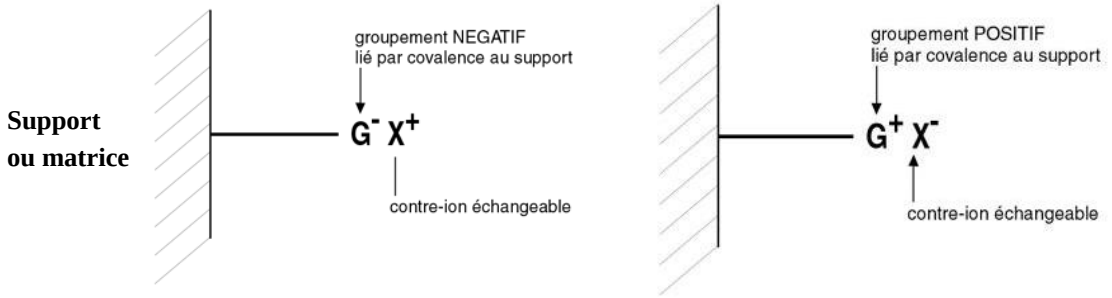


Figure I-26 - Schéma structurel d'une résine échangeuse de cations (gauche) et d'anions (droite)

Les caractéristiques chimiques du groupe fonctionnel déterminent leur pouvoir d'ionisation (Tableau I-13).

Tableau I-13 - Types de résines selon la nature de leur groupe fonctionnel

Type de résine	Capacité d'ionisation	Nature du groupe fonctionnel
Échangeuse de cations	Forte	Sulfonique
	Intermédiaire	Phosphorique
	Faible	Carboxylique
	Très faible	Phénolique
Échangeuse d'anions	Forte	Amine quaternaire
	Faible	Amine primaire, secondaire et/ou tertaire

I.6.1.3. Applications

La chromatographie d'échange d'ions est devenue une technique analytique indispensable en laboratoire, tendant à remplacer les techniques chimiques conventionnelles pour l'analyse ionique (titration, colorimétrie). Les applications de la chromatographie ionique concernent notamment les analyses environnementales, en particulier le traitement de l'eau (adoucissement (

Figure ***I-27***), déminéralisation), la séparation et la purification de métaux ainsi que certains actinides et lanthanides pour des applications nucléaires civiles ou militaires (procédé PUREX), la

synthèse organique – estérification et hydrolyse, la purification de jus de fruits, et l'isolation de molécules actives pour l'industrie pharmaceutique.

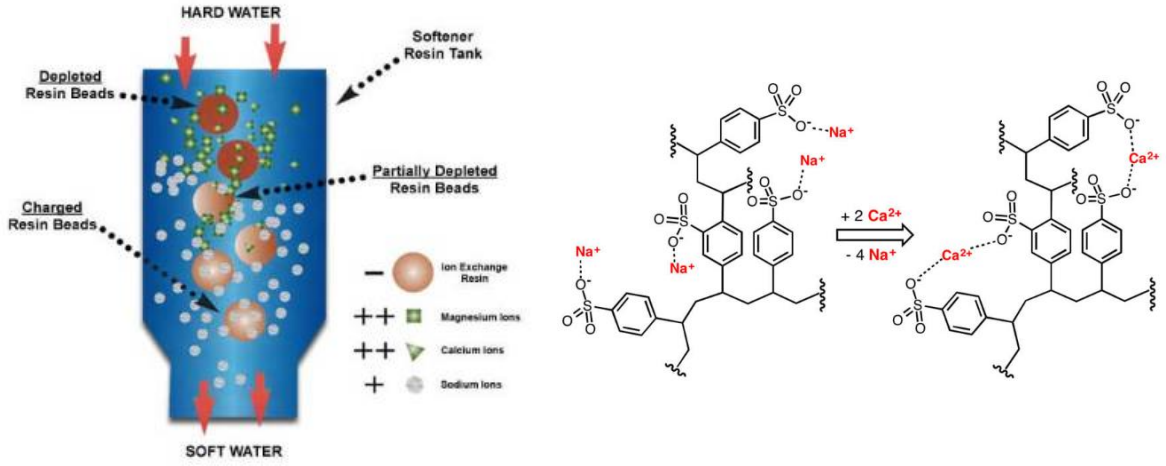


Figure I-27 – Principe du procédé d'adoucissement de l'eau par chromatographique d'échange cationique impliquant la substitution des ions calcium de l'eau par les ions sodium apportés par la résine

La norme ISO 9167-1 propose une méthode de purification ionique via l'utilisation d'une résine type DEAE Sephadex qui implique la désulfatation des glucosinolates pour faciliter leur analyse par HPLC. Cependant il est clair que cette technique ne convient pas à notre schéma de valorisation envisagé puisque les GSL ne sont pas récupérés dans leur forme intacte, ce qui peut sensiblement impacter leur activité biologique. Wang *et al*. (2014) se sont intéressés à la purification de la sinigrine et la gluconapine via l'utilisation de différents supports d'adsorption de capacités d'ionisation différentes - résines fortement et faiblement basiques, charbons actifs, parmi lesquels une résine fortement anionique libellée D261 a montré les taux d'adsorption et de désorption les plus satisfaisants (de l'ordre de 75%) et a permis de récupérer la sinigrine et la gluconapine intacts avec un faible rejet des contaminants. La différence de résultats entre les résines étudiées s'explique notamment par la nature du groupe fonctionnel échangeur.

Ce type de chromatographie présente cependant plusieurs limitations : la difficulté de trouver un support sélectif du composé à isoler du fait de la présence de potentiels nombreux contaminants dans la solution d'alimentation (sucres, protéines, polyphénols, colloïdes etc.), les taux de récupération des composés d'intérêt insatisfaisants, l'utilisation de grands volumes de solvants pour la désorption et la régénération des résines controversables sur le plan environnemental et la durée de vie des colonnes.

Les procédés membranaires constituent une alternative technologique efficace et fiable pour la séparation et la clarification d'extraits et considérés comme plus flexibles et écologiques sans utilisation subsidiaire de substances chimiques, ce qui leur procure un avantage économique certain sur les méthodes chromatographiques conventionnelles.

I.6.2. Procédés membranaires de purification

I.6.2.1. Principe général

La filtration sur membrane est un procédé physique qui permet de séparer les constituants d'une suspension selon leur taille moléculaire en utilisant un média filtrant. La filtration consiste à appliquer une différence de pression sur une membrane pour faire passer la solution à filtrer à travers de celle-ci. En théorie, les particules possédant une taille supérieure à celle des pores de la membrane seront retenues à la surface de la membrane tandis que les particules les plus petites pourront passer à travers. On récupère ainsi deux fractions : le filtrat qui traverse la membrane et le retentât qui est retenu per la membrane. Les techniques de filtration sont classées selon la nature et le poids moléculaire des composants à séparer, permettant leur application via de nombreuses déclinaisons et domaines comme l'illustre la Figure I-28 allant de la microfiltration pour la filtration de particules de l'ordre du micromètre à l'osmose inverse pour la purification de l'eau et la séparation d'ions.

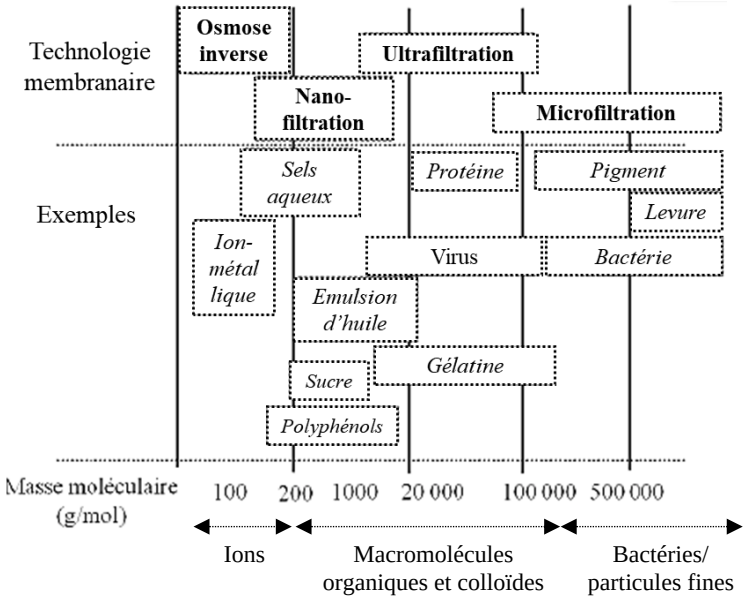


Figure I-28 - Domaines d'application des procédés de filtration membranaires (d'après Boussetta, 2010)

On distingue différents modes de filtration en fonction de la direction d'écoulement du fluide d'alimentation.

I.6.2.2. Modes de filtration

I.6.2.2.a. Filtration frontale

Il s'agit du mode de filtration au cours duquel la solution à filtrer s'écoule perpendiculairement à la surface de la membrane. Les particules dont la taille est supérieure aux pores sont retenues et s'accumulent à la surface de la membrane, formant un gâteau surfacique dont l'épaisseur limite est déterminée par la chute de pression ou la vitesse d'écoulement. Ce mode filtration n'est pas bien adapté à une utilisation industrielle de la filtration membranaire à cause de la baisse rapide du débit de filtration. Il est utilisé principalement dans les laboratoires pour la compréhension des phénomènes et les études préliminaires de faisabilité de la filtration membranaire.

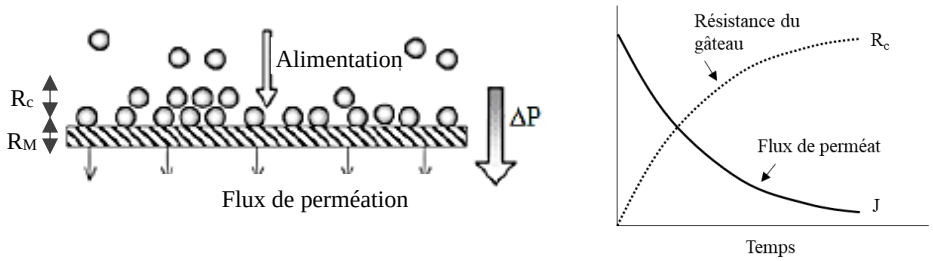


Figure I-29 - Schéma de fonctionnement de la filtration frontale à pression constante

Certains modules de filtration frontale membranaire sont équipés d'un système d'agitation. Ceci assure un écoulement tangentiel de la solution présente entre l'agitateur et la surface de la membrane ainsi que la mise en suspension des particules en solution permettant de retarder leur dépôt à la surface de la membrane. Les flux de filtration en sont ainsi théoriquement grandement améliorés par rapport à la filtration frontale sans agitation où les flux diminuent drastiquement avec l'accumulation des particules sur la membrane.

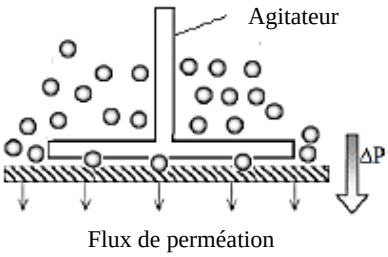


Figure I-30 - Schéma de fonctionnement de la filtration frontale avec agitation

I.6.2.2.b. Filtration tangentielle

En filtration tangentielle, le fluide s'écoule parallèlement à la surface de la membrane, ce qui permet de limiter l'accumulation des particules par rapport à la filtration frontale grâce à des taux de cisaillement plus élevés. Ce mode de filtration est davantage prisé en industrie car il assure des flux de filtration beaucoup plus élevés et stables sur de longues durées qu'en filtration frontale, où un état stationnaire au cours duquel un flux de traitement constant peut être atteint.

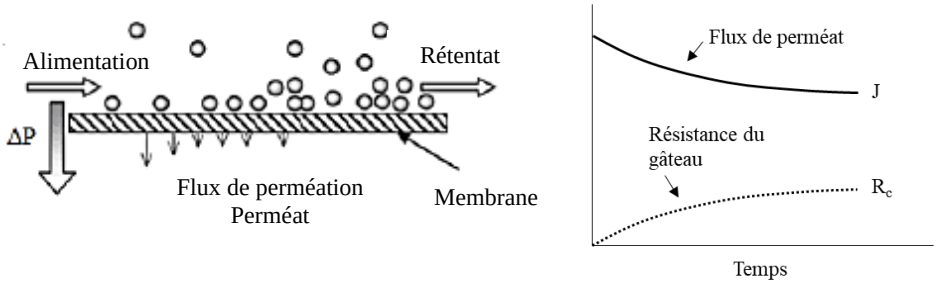


Figure I-31 - Schéma de fonctionnement de la filtration tangentielle

I.6.2.2.c. Filtration dynamique

De manière générale, la principale solution pour limiter le colmatage consiste à augmenter les contraintes de cisaillement. Le principe de la filtration dynamique est de créer un mouvement relatif entre la membrane et le carter afin de produire des taux de cisaillement élevés, ce qui augmente considérablement et de manière stable le flux de perméat. Son principal avantage par rapport à la filtration tangentielle est qu'elle permet d'opérer à de faibles pressions transmembranaires, ce qui par combinaison avec des taux de cisaillements élevés, permet de limiter l'expansion et la compression de la couche de gel. Le cisaillement peut être crée de différentes manières soit par des membranes tournantes, soit par rotor ou disques rotatifs (Wakeman *et al*., 2002). L'équipe TAI dispose d'un module à disque rotatif qui a montré son efficacité pour la purification par micro et ultrafiltration de bio-suspensions (Zhu *et al*., 2013), permettant d'opérer à de très hauts débits (jusqu'à 450 L/m².h) pour des pressions relativement faibles (75-150 kPa).

I.6.2.2.d. Filtration assistée par ultrasons

L'utilisation des ultrasons en micro et ultrafiltration a été introduite par Pirkonen (2001). Les ultrasons permettent d'augmenter sensiblement le flux ainsi que la durée de vie des membranes. La dispersion des ondes sonores permet de maintenir les particules du rétentat en suspension et d'éviter ainsi l'agglomération des fines particules et l'obstruction des pores, aussi bien en filtration frontale qu'en filtration tangentielle (Kobayashi *et al*., 1999; Simon *et al*., 2000; Cai *et al*., 2009). Kobayashi *et al* (1999) ont montré que les ultrasons amélioraient la vitesse de filtration et limitaient la formation de la couche de gel sans influence sur la perméabilité de la membrane. Dans certains cas, le phénomène de cavitation peut cependant être contre-productif et dégrader des composés d'intérêts tel que les protéines comme l'a montré Brans *et al*. (2004) lors de la purification du lait. Dan Liu (2012) a montré qu'une puissance acoustique élevée améliore considérablement la vitesse de filtration (avec des flux presque deux fois plus grands qu'une filtration avec agitation) mais peut engendrer une dégradation des produits. La cavitation est également susceptible d'impacter la membrane mais ses effets sur ses propriétés physiques et structurelles ne sont pas encore bien connus.

I.6.2.2.e. Filtration assistée par champs électriques

Les champs électriques permettent d'améliorer la filtration membranaire. L'application de champs électriques à la surface de la membrane permet d'en éloigner les particules chargées et de diminuer ainsi la polarisation de gel et d'augmenter les flux. Leur application a été répertoriée en particulier pour la séparation de protéines par microfiltration (Chuang *et al*., 2008) et l'ultrafiltration de jus de fruits (Sarkar *et al*., 2008).

I.6.2.3. Mécanismes de transport des solutés

Le phénomène le plus rencontré en filtration est le phénomène de polarisation qui limite le flux de filtration au cours du temps suite à la formation d'une couche de macromolécules à la surface de la membrane. Différents modèles mathématiques ont été développés pour décrire le mécanisme de transport des solutés vers la membrane. Nous en décrirons ci-dessous les plus communs.

I.6.2.3.a. Modèle de transfert de matière

Il s'agit du modèle le plus simple décrivant le transport des solutés vers la membrane par convection. Le flux massique J_s est décrit tel que :

$$J_s = JC \qquad \text{Eq. I.1.}$$

Avec J le flux de perméat ($m^3.s^{-1}.m^{-2}$) et C la concentration du soluté ($kg.m^{-3}$). A l'approche de la couche limite, une différence de concentration engendre par effet diffusionnel une rétrodiffusion du flux de soluté vers la solution d'alimentation. En régime stationnaire, le flux de soluté vers la membrane et le flux repartant par diffusion s'équilibrent tel que :

$$JC - JC_F = D\frac{dC}{dy} \qquad \text{Eq. I.2.}$$

Avec C_F la concentration du soluté au travers de la membrane (perméat), D ($m^2.s^{-1}$) le coefficient de diffusion et dC/dy le gradient de concentration dans la couche limite.
Dans le cas d'un rejet complet, la concentration du soluté dans le perméat devient négligeable et l'intégration de l'équation dans la couche limite donne :

$$J = \frac{D}{\delta}\ln\frac{C_w}{C} = k\ln\frac{C_w}{C} \qquad \text{Eq. I.3.}$$

Où $k = \frac{D}{\delta}$ est le coefficient de transfert de matière, δ l'épaisseur de la couche limite de concentration et C_w la concentration « gel » à la surface de la membrane.

L'augmentation de la concentration du soluté impliquera la diminution du flux de filtration. On remarque que le flux est indépendant de la pression. En mesurant la valeur du flux à diverses concentrations, on peut obtenir en traçant $J=f(ln(C))$ une droite dont la pente est égale au coefficient de transfert de masse et permettant d'obtenir par extrapolation lorsque le flux devient nul la valeur de C_w.

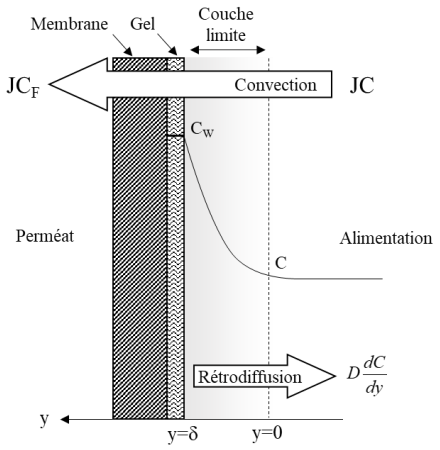


Figure I-32 - Représentation schématique du modèle de polarisation de concentration (théorie du film)

Les caractéristiques physico-chimiques de la solution (viscosité dynamique, coefficient de diffusion etc.) et les paramètres hydrodynamiques du module (taux de cisaillement, vitesse d'écoulement tangentiel etc.) sont autant des paramètres qui permettent de limiter l'accumulation de soluté dans la couche limite et donc d'améliorer la valeur du coefficient de transfert parallèlement au flux de filtration. L'augmentation de la température de la solution, qui réduit alors la viscosité du fluide, peut également présenter un effet favorable si les propriétés de la membrane et du soluté le permettent.

I.6.2.3.b. Modèle de résistance en série et colmatage

Le modèle précédent ne permet pas cependant pas une description fiable du flux lors d'une filtration classique qui comprend successivement un régime dépendant de la pression et le régime de transfert de masse. Dans le cas de la filtration d'un solvant pur et pour une membrane neuve, la description du flux peut être régie par la loi de Darcy :

$$J = \frac{\Delta P}{\mu R_m} \qquad \text{Eq. I.4.}$$

Avec ΔP (Pa) la pression transmembranaire, μ (Pa.s) la viscosité dynamique de l'alimentation et R_m (m^{-1}) la résistance hydraulique de la membranaire, inversement proportionnelle à la perméabilité de la membrane déterminée à partir de l'eau pure.

Dans le cas d'une filtration frontale, la résistance membranaire ne représente qu'une faible partie de la résistance totale engendrée par l'ensemble des phénomènes physico-chimiques dus à la présence de solutés et qui sont responsables de la réduction du flux : le phénomène de polarisation de gel, le colmatage de la membrane due à l'accumulation des particules à la surface de la membrane, et le phénomène d'adsorption due aux interactions solutés-membrane. L'équation devient alors :

$$J = \frac{\Delta P}{\mu (R_m + R_T)} \qquad \text{Eq. I.5.}$$

Avec R_T (m^{-1}) la résistance totale de filtration telle que $R_T = R_P + R_G + R_A$, où R_P (m^{-1}) représente la résistance de polarisation de concentration, R_G la résistance du gâteau, et R_A la résistance d'adsorption. Lors d'une filtration frontale, l'accumulation des particules à la surface de la membrane entraîne la formation d'une couche solide, ou gâteau, caractérisé par sa résistance spécifique. Une résistance conséquente du gâteau se traduit par des flux de plus en plus faibles. L'équation de Ruth-Carman décrit la filtration avec formation d'un gâteau à pression constante :

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha C s \rho \mu}{2 S^2 \Delta P} V + R_m \frac{\mu}{S \Delta P} \qquad \text{Eq. I.6.}$$

Avec α (m/kg) la résistance spécifique du gâteau et C_s (kg/m^3) la fraction massique solide dans le jus, S (m^2) la surface membranaire, t (s) le temps de filtration et V (m^3) le volume de filtrat.

En filtration frontale à pression constante, la description de $t/V = f(V)$ donne une droite dont la pente et l'ordonnée permettent d'atteindre respectivement la résistance spécifique du gâteau et la résistance membranaire. En régime dynamique, l'expansion du gâteau est limitée par le rapport entre les

forces de cisaillements et les mécanismes d'adsorption des particules à la membrane. L'évolution *t/V = f(V)* en phase stationnaire n'est plus linéaire.

I.6.2.3.c. Modèle de la pression osmotique

Les particules rejetées par la membrane créent une différence de pression osmotique $\Delta\pi$ (Pa) à la surface de la membrane qui se retranche de la pression transmembranaire. L'équation devient alors :

$$J = \frac{\Delta P - \Delta\pi}{\mu(R_m + R_T)} \qquad \text{Eq. I.7.}$$

I.6.2.4. Colmatage de la membrane

I.6.2.4.a. Définition

Le colmatage peut être défini comme l'ensemble des phénomènes se déroulant à la surface de la membrane et dans le volume poreux. Il en résulte une diminution du flux de perméat due à l'accumulation de molécules retenues à la surface de la membrane. Une augmentation de la pression peut en outre augmenter la résistance spécifique du gâteau qui peut s'opposer toujours plus significativement à l'écoulement. Le colmatage peut significativement impacter la durée de vie de la membrane en empêchant sa réutilisation. N'importe quel phénomène susceptible d'augmenter la résistance de la membrane est considéré comme un mécanisme de colmatage.

I.6.2.4.b. Types de colmatage

Le colmatage de la membrane résulte généralement d'une combinaison de plusieurs mécanismes comprenant l'adsorption, la polarisation de gel et le blocage des pores. Ces phénomènes peuvent être de nature réversible ou irréversible.

Le colmatage réversible apparaît du fait du dépôt de la matière ou de la concentration des particules sur la membrane. Ce colmatage se produit très rapidement (quelques secondes) et peut être évité ou supprimé par des traitements physico-chimiques appropriés comme un rétrolavage (méthode de lavage à contre-courant par inversion de la pression transmembranaire) ou un décolmatage hydraulique (traitement de surface) permettant d'éliminer les particules accumulées à la surface et restaurer la membrane.

Le colmatage irréversible se présente à cause des phénomènes d'adsorption dus aux interactions électrostatiques ou à l'affinité des molécules avec la membrane, ainsi que les mécanismes de blocage des pores qui modifient les propriétés filtrantes de la membrane et provoquent une diminution progressive (sur quelques heures) du flux au cours de la filtration. Ce type de colmatage ne peut pas être éliminé par les techniques conventionnelles et nécessite un nettoyage chimique.

I.6.2.4.c. Mécanismes de colmatage

La nature de la membrane, les caractéristiques de la solution à filtrer et les conditions opératoires mettent en jeu des mécanismes divers et complexes de colmatage qui sont difficilement prévisibles. A partir de diverses études en filtration frontale, plusieurs mécanismes de colmatage type illustrés ci-dessous ont été identifiés et définis :

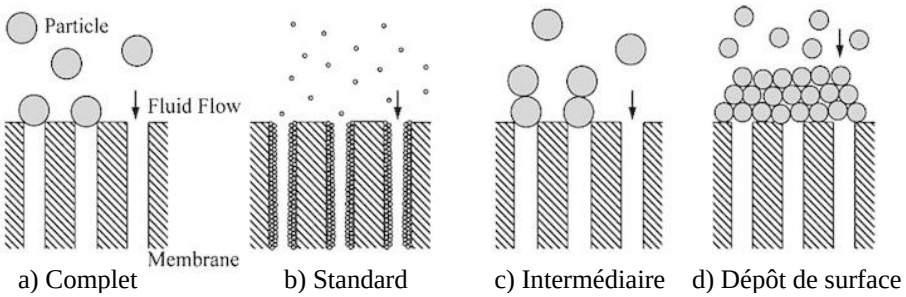


Figure I-33 - Schémas des mécanismes de colmatage (d'après Iritani and Katagiri, 2016)

a) Blocage complet : Une particule dont la taille est supérieure à celle du pore et rejetée par la membrane bloque totalement le pore.
b) Blocage standard : Ce modèle décrit un rétrécissement progressif et uniforme du volume du canal poreux dû à l'accumulation de particules qui sont plus petites que la taille du pore.
c) Blocage intermédiaire : Il s'agit d'un modèle intermédiaire aux mécanismes précédents supposant une probabilité de blocage partiel des pores. Les particules peuvent également se superposer les unes sur les autres.
d) Dépôt de surface : Ce modèle suppose un empilement des particules les unes sur les autres conduisant à la formation d'un gâteau surfacique.

Chaque modèle est traduit par une expression mathématique qui permet de prédire la cinétique de filtration. Toutefois, ces quatre lois peuvent être décrites avec une équation caractéristique commune qui permet la représentation de ces modèles dans un système unique :

$$\frac{d^2t}{dV^2} = k\left(\frac{dt}{dV}\right)^n \qquad \text{Eq. I.8.}$$

Avec t (s) le temps de filtration, V (m^3) le volume de filtrat et k et n des constantes. La représentation logarithmique de l'équation donne accès à un facteur n dont la valeur est caractéristique du modèle de colmatage. D'après le Tableau I-14, les valeurs de n peuvent être comprises dans un intervalle de 0 à 2 tel que n = 2 correspond à un blocage complet, n = 1.5 à un blocage standard, n = 1 au blocage intermédiaire et n = 0 à un mécanisme de dépôt de surface.

Tableau I-14 - Modèles simples de colmatage lors de filtration à pression constante (Bolton *et al.*, 2006)

Modèle	Valeur de n	Equation*	Coefficient
Complet	2	$V = \frac{J_0}{K_b}\left(1 - e^{-K_b t}\right)$	K_b (s^{-1})
Standard	1.5	$V = \left(\frac{1}{J_0 t} + \frac{K_s}{2}\right)^{-1}$	K_s (mL^{-1})
Intermédiaire	1	$V = \frac{1}{K_i}\ln\left(1 + K_i J_0 t\right)$	K_i (mL^{-1})
Dépôt de surface	0	$V = \frac{1}{K_c J_0}\left(\sqrt{1 + 2K_c J_0^2 t} - 1\right)$	K_c ($s.mL^{-2}$)

* J_0 représente le flux initial

En pratique, il est toutefois difficile de mettre en évidence un seul mécanisme et le colmatage résulte souvent d'une combinaison de plusieurs phénomènes. Hong *el al*. (2002) mettent en avant que le colmatage est un processus dynamique débutant par le blocage des pores suivi par la formation d'un gâteau à la surface de la membrane. Dans la littérature, de nombreuses études observent une succession au cours de la filtration de plusieurs mécanismes de colmatage. Iritani *et al*. (2016) mettent en avant le développement de modèles combinés à partir des lois simples de colmatage, les particules pouvant contribuer à la fois à plusieurs mécanismes de colmatage.

I.6.2.5. Stratégies de lutte contre le colmatage et nettoyage des membranes

Le nettoyage d'une membrane se définit comme la capacité de l'opération de nettoyage à éliminer les molécules déposées sur la membrane et dans ses pores. Cette opération de nettoyage doit permettre de retrouver les performances initiales de la membrane sans l'endommager ou modifier sa sélectivité (rejection et perméabilité). De manière générale, il existe des méthodes physiques et des méthodes chimiques pour éliminer le colmatage et nettoyer la membrane. Les méthodes physiques sont basées sur la création d'instabilités, la modification de l'hydrodynamique de l'écoulement ou des variations de température afin de limiter le phénomène de polarisation et le dépôt de gel.

Les méthodes chimiques utilisent des agents chimiques afin de créer des forces électrostatiques de répulsions entre les contaminants et la membrane, les forçant à être expulsés à travers les pores, et/ou provoquant leur décomposition.

Les méthodes physiques et chimiques sont généralement combinées afin d'améliorer l'efficacité de nettoyage. Des techniques innovantes telles que l'application d'ultrasons ou de champs électriques ont également récemment été développées. Dans le cadre de cette thèse, les méthodes chimiques seront davantage explicitées.

Le nettoyage chimique peut être réalisé de deux façons *: (1) in situ* où la solution chimique est insérée à la place de la solution à filtrer dans le module de filtration, ou (2) *ex situ* où la membrane est immergée dans un réacteur contenant l'agent nettoyant. L'utilisation d'un agent chimique consistera entre autres à modifier les propriétés physico-chimiques des contaminants ou du gel. De manière générale les agents chimiques sont catégorisés en six classes présentées dans le Tableau I-15 : alcalins, acides, sels, surfactants, agents chélatants et oxydants. Les solutions commerciales disponibles consistent généralement en un mélange de plusieurs types d'agents chimiques.

Tableau I-15 - Catégories et exemples typiques d'agents chimiques pour le nettoyage des membranes

Catégorie	**Exemples**
Alcalins	Forts : NaOH, KOH, NH_4OH ; Faibles : Na_2CO_3
Acides	Forts : HCl, H_2SO_4, HNO_3 : Faibles : H_3PO_4, citrique, oxalique
Sels	NaCl, KCl, NH_4Cl
Surfactants	Anionique : SDS ; Cationique : CTAB
Agents chélatants	EDTA et sels associés
Oxydants	NaClO, H_2O_2, $KMNO_4$

I.6.2.5.a. Agents alcalins

Les solutions alcalines, telles que NaOH ou KOH, permettent l'hydrolyse des contaminants organiques comme les protéines et les polysaccharides, la saponification des huiles et graisses et la dissolution des particules inorganiques. Ces solutions permettent l'accroissement de la force ionique due à la présence d'ions hydroxyles ainsi que la déprotonation des contaminants via un pH élevé.

I.6.2.5.b. Agents acides

Les acides sont principalement utilisés pour la dissolution de sels précipités et d'oxydes métalliques. L'acide nitrique est particulièrement utilisé en industrie pour l'élimination des précipités de sodium. Sa capacité oxydante est également un atout pour l'élimination de nombreux contaminants organiques et biologiques par nitration. Cependant, un contrôle du pH est nécessaire afin de limiter l'endommagement de la membrane par corrosion, d'où la nécessité de se tourner parfois vers des acides faibles.

I.6.2.5.c. Sels

Le mécanisme d'action des sels réside dans leur capacité d'échange d'ions et la déstructuration de la couche de gel par modification structurelle des liaisons et réduction des forces de cohésion entre les molécules. L'écoulement de la solution à travers la couche de gel provoque une différence de pression osmotique responsable de déformation du gel.

I.6.2.5.d. Surfactants

Le potentiel nettoyant des surfactants est lié à leur capacité de réduction de la tension de surface et à un mécanisme de micellisation. La concentration du surfactant est en général maintenue en dessus d'une concentration dite micellaire critique (CMC) où les molécules du surfactant s'agrègent pour former des micelles. Ces micelles atteignent la surface de la membrane par transport convectif où elles se désagrègent pour libérer les monomères surfactants qui vont alors se lier et « s'enrouler » autour des particules contaminantes, permettant leur expulsion de pores par simple écoulement. Le mécanisme de micellisation est cependant très lent et des micelles résiduelles peuvent être adsorbées à la surface de la membrane augmentant alors son caractère hydrophile et pouvant conduire à la formation d'un multi-gel surfactant par attraction d'autres micelles.

I.6.2.5.e. Agents chélatants

Les composés chélatants comme l'EDTA (éthylène diamine tetraacétique acide) sont particulièrement efficaces pour l'élimination d'ions métalliques par leur capacité de formation de complexes forts, et plus généralement de composés organiques et inorganiques. Ils sont cependant très coûteux et l'utilisation d'acides pour des applications similaires est préférable.

I.6.2.5.f. Oxydants

Leur utilisation première se fait en tant que désinfectant via l'élimination de microorganismes pathogènes. Leurs applications se trouvent dans le traitement de l'eau pour limiter la formation de biofilms, la désinfection régulière des membranes dans l'agro-industrie ou encore la stérilisation des membranes dans l'industrie pharmaceutique. L'hypochlorite de sodium (NaOCl) qui s'hydrolyse rapidement en milieu aqueux pour former l'acide hypochlorique (HOCl) est particulièrement prisé pour sa forte activité antimicrobienne. En plus de sa capacité oxydante, NaOCl peut générer un gonflement de la membrane qui, couplée avec un rinçage efficace, peut faciliter l'expulsion des particules bloquées dans les pores. Cependant, l'effet oxydant peut également se répertorier sur la membrane et provoquer sa déstructuration polymérique, susceptible de modifier significativement ses propriétés mécaniques, physiques, ses performances de rejection et à terme sa durée de vie.

I.7. Conclusion et positionnement du projet

L'état de l'art a montré le potentiel de la moutarde brune (*B. juncea)* dans un schéma de bioraffinage. En effet, les avantages agronomiques de cette plante sont considérables en raison de sa résistance à la chaleur, à la sécheresse et aux ravages d'insectes ainsi que son cycle de croissance rapide (60-70 jours). Ces propriétés font de *B. juncea* une plante oléagineuse adaptée aux cultures intermédiaires piège à nitrates (CIPAN) pour protéger les parcelles entre deux cultures de vente et permettre la reconstitution de la fertilité du sol. Ces cultures intermédiaires vont générer des graines riches en huile (≈ 35%), en protéines (≈ 30 %) et en glucosinolates (≈ 100 µmol/g). Aujourd'hui environ 5000 ha de moutarde sont cultivés chaque année en France dans la région de Bourgogne et les graines sont principalement utilisées dans la fabrication industrielle de condiments du type moutarde de Dijon.

Ce marché ne pourrait pas absorber la surproduction des graines de moutardes qui seront générés par les cultures intermédiaires de moutarde que les agriculteurs souhaitent mettre en place pour protéger les sols. Dans ce contexte, il est indispensable de trouver des nouvelles voies de valorisation des graines. Ces voies de valorisation doivent être conformes aux principes de la chimie verte sur le plan technique, économique et environnemental. Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet d'envergure qui vise à répondre à cet objectif en proposant un schéma de bioraffinage adapté aux graines de moutarde. Il s'appuie sur la mise en place des procédés de fractionnement, d'extraction et de formulation compétitifs pour valoriser les différentes fractions de la graine riche en huile, en protéines et en glucosinolates.

L'originalité de notre approche concerne la récupération des GSL pour détoxifier le tourteau et leur valorisation en tant que produit phytosanitaire. En effet, les GSL sont des facteurs antinutritionnels que l'on retrouve dans les tourteaux qui, de ce fait, deviennent impropres à l'alimentation du bétail alors qu'ils sont riches en protéines de qualité. Les études disponibles dans la littérature ont jusqu'à présent porté sur l'élimination des GSL dans la graine par sélection génétique ou dans le tourteau pour le détoxifier. Ce travail a pour ambition de lever ce verrou en extrayant les facteurs antinutritionnels de la graine pour exploiter leur activité biologique en biofumigation comme agent de contrôle des ennemis de cultures. Les glucosinolates majoritaires de *B. juncea* sont la sinigrine et la gluconapine, précurseurs d'isothyocianates-alkenyl aliphatique un pesticide naturel à large spectre. Dans un contexte de réduction des pesticides de synthèse, la formulation d'un complexe réactif à base de glucosinolates pourrait trouver sa place sur un marché en demande de solutions efficaces et acceptables pour l'environnement.

La première innovation dans ce travail consisterait à **inactiver de manière intrinsèque la myrosinase** dans les graines pour pouvoir extraire ultérieurement les GSL dans leur forme native. La revue littéraire a pu révéler des méthodes d'inactivation à haute pression hydrostatique et thermiques. Cependant ces méthodes concernent consistent à traiter l'enzyme après son extraction. Ce mode d'inactivation extrinsèque n'est pas adapté au schéma de bioraffinage que nous proposons. Les études réalisées sur des extraits de myrosinase ont révélé l'efficacité d'un traitement thermique à partir de 65°C pour inactiver le myrosinase. Dans le cadre de notre travail, une étude est nécessaire pour déterminer les paramètres optimaux du traitement thermique (temps, température, mode de chauffage) qui permettent d'inactiver efficacement l'enzyme dans la graine sans l'extraire. L'impact du procédé d'inactivation sur les glucosinolates et les protéines devra en outre également être étudié. Une inactivation efficace par voie thermique pourrait ainsi être intégrée dans le schéma traditionnel de trituration de graines en remplaçant l'opération de prétraitement par cuisson et donc ne pas entraîner d'investissement où de coûts supplémentaires pour les industriels. Des techniques innovantes comme les ultrasons et le confinement en milieu supercritique ont montré leur efficacité pour l'inactivation des enzymes. Leur efficacité pour inactiver la myrosinase dans les gaines sera évaluée dans le cadre de ce travail de thèse.

Le deuxième volet sera accordé à **l'extraction des GSL dans leur état natif** à partir de tourteau de colza. Pour ce faire, l'huile sera extraite par pressage mécanique et le gâteau de pressage sera utilisé pour en extraire les GSL. On retrouve dans la littérature plusieurs nombreuses techniques d'extraction des glucosinolates ~~à~~ mais elles dérivent toutes de la méthode commune prônée par l'organisme ISO, méthode basée sur une extraction à haute température et en utilisant le méthanol comme solvant. Malgré son efficacité, elle présente plusieurs limitations liées à la toxicité du méthanol (classé CMR), le manque de sélectivité et la sévérité des conditions opérations. Il en résulte un extrait non pur, un coût énergétique considérable, un impact environnemental néfaste et des risques de dégrader certaines molécules comme les GSL et les protéines. Dans ce cadre, notre objectif est de mettre en place un procédé alternatif pour extraire sélectivement les GSL. Ce procédé sera basé sur l'utilisation des solvants verts (eau et éthanol), une température d'extraction modérée et l'utilisation des technologies émergentes pour intensifier l'extraction. Notre choix s'est porté sur les décharges électriques à haute tension présentent l'avantage d'être un procédé athermique court et économique. L'efficacité de ce procédé s'évaluera par sa sélectivité d'extraction. En effet, l'objectif est de récupérer le maximum de GSL pour détoxifier le tourteau et de minimiser l'extraction des protéines pour les concentrer dans le tourteau. D'autres critères comme la consommation énergétique et la facilité de mise en œuvre seront considérés et évalués.

Le dernier objectif concerna la **purification de l'extrait riche en GSL** afin de fournir un extrait actif et pur pour la formulation d'un produit phyto-biotique pour notre partenaire du projet. En se basant sur la littérature, deux techniques ont été sélectionné et seront testées : la chromatographie d'échange d'ions et la filtration membranaire. La chromatographie par résine échangeuse d'ions est la méthode la plus utilisée dans la littérature. Elle se repose sur un échange d'ions entre le support et la solution par différence d'affinité lors des étapes d'adsorption (fractionnement) et de désorption (régénération). Ce procédé sera étudié à l'échelle laboratoire en mode batch et en mode dynamique avec une optimisation des conditions opératoires. Les cinétiques d'adsorption seront modélisées avec différents modèles pour caractériser le phénomène de transfert et les interactions thermodynamiques. Cette technique peut toutefois être controversée du fait d'une consommation importante de solvant. C'est pourquoi les procédés membranaires seront également étudiés. Leur avantage par rapport aux méthodes conventionnelles vient de leur sélectivité et leur faible coût de fonctionnement. En effet, ils ne font pas intervenir de produits chimiques et n'altèrent pas la qualité des composés. Notre objectif est d'obtenir

un filtrat pur riche en GSL et de concentrer des protéines dans le rétentat qui pourrait etre valorisé avec le tourteau en alimentation animale. Dans le cadre de ce travail, nous attarderons à l'optimisation de conditions opératoires et la caractérisation du phénomène de transfert (polarisation, colmatage). L'extrait purifié riche en GSL sera fourni à nos partenaires qui s'occupent de la formulation du produit phytosanitaire.

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

Ce chapitre s'accordera à la description de la méthodologie expérimentale mise en œuvre au cours de cette thèse. Il présente la matière végétale, les protocoles et les dispositifs expérimentaux ainsi que les analyses physico-chimiques et les méthodes de calcul utilisées.

II.1. Schéma global de valorisation

Le schéma global de valorisation qui a été développé et étudié dans le cadre de cette thèse est présenté en Figure II-1. Ce dernier peut être détaillé selon 4 parties :

(1) L'**inactivation de la myrosinase** : l'objectif de cette étape est d'arriver à inactiver l'enzyme intrinsèquement dans les graines sans avoir à l'extraire. Trois procédés d'inactivation ont été testés et comparés : le chauffage conventionnel (CC), le chauffage micro-ondes (MO) et le CO_2 supercritique (SC-CO_2). L'efficacité du traitement sera évaluée par sa capacité d'inhibition enzymatique sans dégradation des bio-composés d'intérêt (glucosinolates, protéines) et la consommation énergétique induite.

(2) L'**extraction d'huile** par pressage mécanique : l'objectif est d'obtenir une huile non contaminée par les produits dérivés des glucosinolates et un tourteau délipidé mais riche en GSL et en protéines qui sera utilisé dans la partie suivante.

(3) L'**extraction des glucosinolates** : L'objectif de cette étape est de maximiser l'extraction des GSL sans les dégrader tout en minimisant l'extraction des protéines pour les concentrer dans le tourteau. Pour ce faire, notre choix s'est porté sur l'utilisation de solvants verts (eau, éthanol) et des technologies émergentes comme les ultrasons (US) et les décharges électriques de haute tension (DEHT) pour intensifier l'extraction. L'efficacité et la sélectivité d'extraction ainsi que la consommation énergétique ont été pris en considération dans l'optimisation de cette étape.

(4) La **purification des glucosinolates** : la chromatographie d'échange d'ions et la filtration membranaire ont été testées et comparées en termes d'efficacité de séparation et de purification.

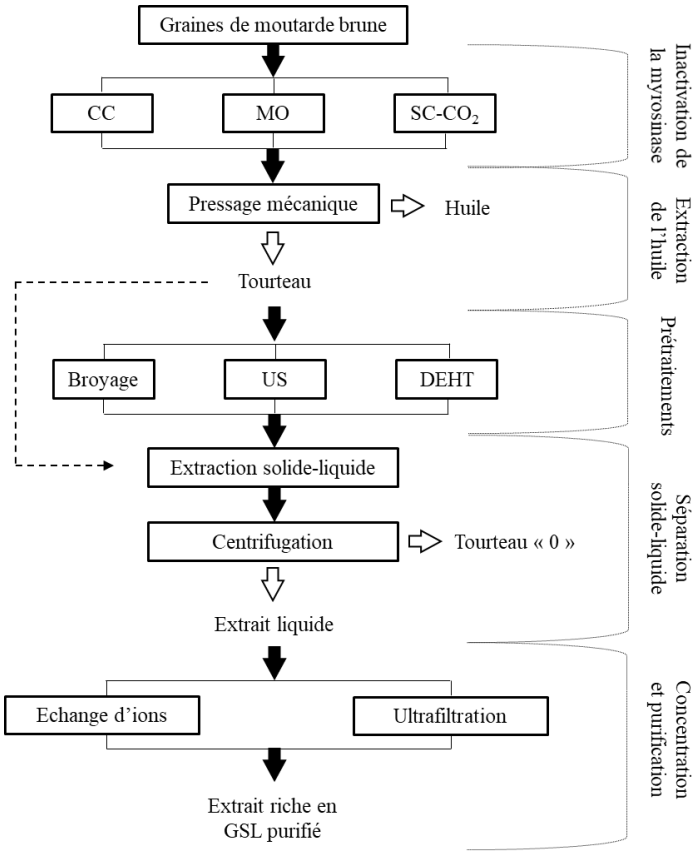


Figure II-1 – Méthodologie expérimentale globale

II.2. Matière végétale

Les graines de moutarde brune de la variété ETAMINE ont été fournies par la Chambre d'Agriculture de la Côte d'Or (Bourgogne-Franche-Comté) (Figure II-2). Durant la thèse environ 20 kg de graines issues des cultures 2016 puis 2017 ont été utilisées. Les graines ont été conservées dans des sacs hermétiques jusqu'à utilisation. Selon les données du fournisseur, les graines contenaient environ 6% d'eau, 33.7% d'huile, 29.6% de protéines et une teneur en sinigrine de 100 µmol/g MS. Les graines ont été analysées par nos propres moyens afin de vérifier ces données. Les méthodes de dosage seront explicitées dans la partie « Analyses physico-chimiques » et les résultats obtenus seront présentés dans le chapitre dédié aux résultats.

Figure II-2 - Photo des graines de moutarde brune de la variété ETAMINE

II.3. Inactivation de la myrosinase

II.3.1. Inactivation thermique de la myrosinase

II.3.1.1. Etude de la stabilité thermique de l'enzyme

Avant de tester la faisabilité de l'inactivation de la myrosinase intrinsèquement dans les graines, la stabilité thermique de la myrosinase a été étudiée à partir d'extraits bruts contenant l'enzyme (voir « Préparation de l'extrait enzymatique »). 1 mL d'extrait a été placé dans un bain-marie et le temps ainsi que la température d'incubation ont été variés de 0 à 60 min et 20 à 80°C, respectivement. L'activité de l'enzyme a été mesurée avant et après traitement (voir « Mesure de l'activité enzymatique »).

II.3.1.2. Inactivation par chauffage conventionnel

Afin d'inactiver intrinsèquement la myrosinase dans les graines sans l'extraire au préalable, 25 g de graines de moutarde ont été placées dans un récipient fermé et hermétique puis immergées dans un bain marie (modèle Julabo SW22) réglé à la température de contrôle désirée. Le traitement est considéré d'après la température des graines, étudiée entre 70 et 90°C et un temps d'incubation jusqu'à 90 min. La température des graines a été mesurée et contrôlée à l'aide d'une sonde. A la fin du traitement, l'échantillon a été placé dans un bain de glace pour stopper l'effet thermique. L'activité résiduelle de l'enzyme a été ensuite mesurée.

II.3.1.3. Inactivation par chauffage micro-ondes

Les essais ont été réalisés à l'aide d'un générateur de micro-ondes de Milestone (NEOS – GR, Gravity Station, Shelton, États-Unis) d'une fréquence de 2.45 GHz et d'une puissance maximale de 900W. Ce générateur est équipé d'un tableau de commande et d'une caméra de contrôle qui permet de visualiser l'échantillon dans la chambre de traitement (Figure II-3). Le temps et la puissance sont contrôlés grâce au logiciel NEOS au niveau du tableau de commande de l'appareil.

Le chauffage des graines par micro-ondes a été effectué dans un bécher de 50 mL contenant 25g de graines. La puissance « émise » par les micro-ondes a été ajustée entre 75 et 150W (3-6 W/g) et le temps de traitement entre 25 et 90 min. A la fin du traitement, la température des graines est mesurée et l'échantillon est ensuite placé dans un bain de glace pour stopper l'inactivation avant de mesurer l'activité résiduelle de l'enzyme.

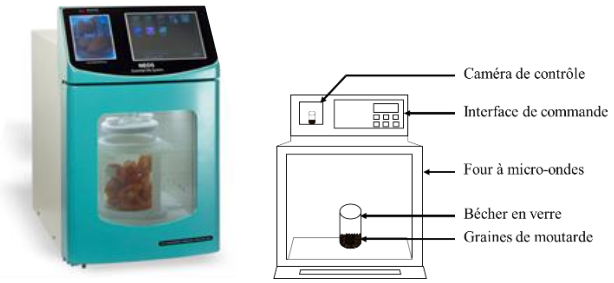


Figure II-3 - Appareillage utilisé pour chauffage micro-ondes (Générateur Milestone, f = 2.45 GHz)

II.3.2. Inactivation par CO_2 supercritique

Les essais d'inactivation ont été réalisés à l'aide d'un équipement pilote de laboratoire SFE 200ml (Extratex, Neuves-Maisons, France) (Figure II-4). Le pilote est équipé d'une pompe CO_2 couplée avec un groupe froid pour éviter la surchauffe, d'un échangeur de chaleur, d'une étuve contenant le réacteur (extracteur) d'une capacité de 200 mL et d'un séparateur. Les caractéristiques de l'équipement sont présentées dans le Tableau II-1.

Tableau II-1 –Caractéristiques de l'équipement SFE 200 ml (Extratex)

Composant (Nomenclature)	Conditions opératoires	Capacité
Pompe CO_2 (P200)	Jusqu'à 700 bars	0-50 g/min à 700 bars 0-100 g/min à 350 bars
Extracteur (A40) dans étuve (H4000)	700 bars/150°C (CO_2) Ou 400 bars/250°C (eau)	200 mL
Séparateur (S50)	200 bars/150°C	300 mL

a)

b)

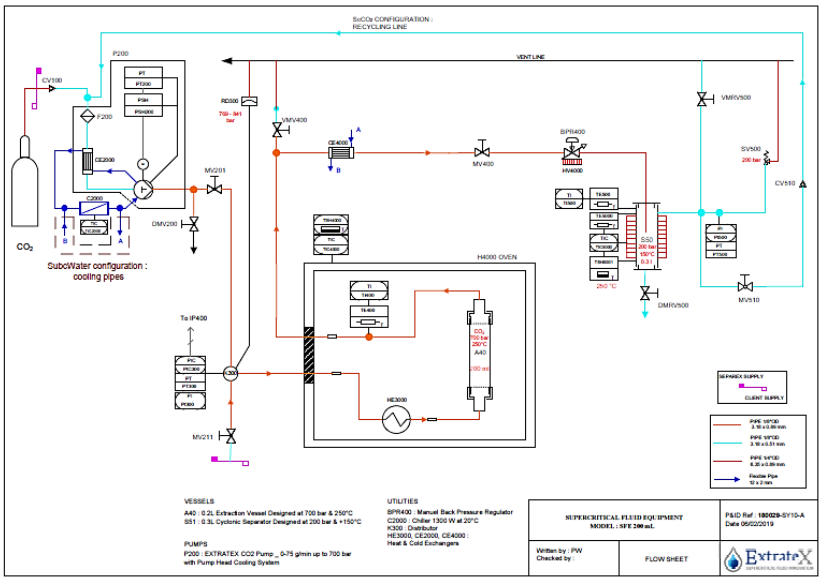


Figure II-4 – (a) Equipement d'extraction de fluide supercritique type SFE 200mL (Extratex) 1. Groupe froid 2. Pompe 3. Séparateur 4. Etuve 5. Extracteur 6. Réserve CO_2 (b) P&ID général de l'installation

Pour chaque essai, 25g de graines ont été chargées dans l'extracteur qui est placé dans l'étuve et l'ensemble est chauffé à la température de travail désirée. Le CO_2 stocké à l'état liquide dans la bouteille de CO_2 est pompé (50 g/min) puis chauffé à la température souhaitée via l'échangeur de chaleur avant d'être injecté dans l'extracteur jusqu'à atteindre la pression désirée. L'influence de la température (35-69°C), de la pression (20-67.5 MPa) et du temps de contact (1-7h) a été étudiée. A la fin de traitement, l'échantillon est récupéré pour mesurer l'activité résiduelle de l'enzyme.

II.3.3. Mesure de l'activité enzymatique

L'évaluation de l'efficacité de l'inactivation est basée sur la mesure de l'activité résiduelle de l'enzyme après le traitement. La mesure de l'activité consiste en un suivi cinétique de la dégradation de la sinigrine utilisée comme substrat en contact avec l'enzyme.

II.3.3.1. Préparation de l'extrait enzymatique

L'enzyme est extraite à partir des graines et l'extrait enzymatique obtenu a été utilisé pour doser l'activité enzymatique. Pour ce faire, 1g de graines broyées (moulin à café) a été immergé dans 10 mL d'eau distillée dans un tube en polypropylène de 15 mL. La suspension est préliminairement agitée à l'aide d'un vortex pendant 30 s puis placée dans un bain marie réglé à 30°C pour incubation durant 1h avec des agitations périodiques toutes les 10 min. La suspension est finalement centrifugée à 6000 rpm pendant 10 min. Le surnageant contenant l'enzyme est ensuite filtré à travers un filtre membrane PTFE de 0.45 µm et le filtrat obtenu est utilisé pour le dosage enzymatique. L'extrait est analysé en HPLC afin de vérifier l'absence de sinigrine dans l'extrait avant de faire le dosage.

II.3.3.2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité de la myrosinase est déterminée par suivi de la cinétique de dégradation d'un substrat (la sinigrine) au cours du temps. Les mesures ont été faites à concentration constante de substrat et en variant la concentration de l'enzyme. Pour ce faire, 400 µL de sinigrine à 5 mM à pH 7.0 auxquels sont ajoutés un volume d'extrait enzymatique sont introduits dans un tube de 5mL immergé dans un bain marie afin de réguler la température de l'hydrolyse. L'influence du volume d'extrait (0.1-1.75 mL) ainsi que de la température d'hydrolyse (20-50°C) a été préalablement étudié sur l'activité enzymatique. La cinétique de dégradation de la sinigrine est suivie par intervalle de 5 min et la réaction d'hydrolyse est stoppée par l'ajout d'une solution de méthanol à 70% (v:v) à 75°C et incubation de l'échantillon à 75°C pendant 15 min. La quantité de sinigrine restante est mesurée par HPLC. L'activité de la myrosinase est définie comme la quantité de sinigrine consommée par minute (µmol/min).

En se basant sur les essais réalisés, les conditions de référence pour la détermination de l'activité de la myrosinase à partir des graines traitées et non traitées ont été définies via l'hydrolyse de la sinigrine avec 800 µL d'extrait à 40°C, pH 7.0. L'impact du traitement sur l'activité de la myrosinase est évalué d'après le taux d'activité résiduelle de l'enzyme tel que :

$$activité\ résiduelle = \frac{A_t}{A_0} \qquad \text{Eq. II.1}$$

Avec A_0 l'activité initiale de l'enzyme (graines non traitées) et A_t l'activité de l'enzyme après traitement déterminées dans les conditions définies précédemment.

II.3.4. Caractérisation du comportement enzymatique

II.3.4.1. Cinétique Michaelienne

La cinétique de Michaelis est le modèle le plus commun pour décrire le comportement et les réactions enzymatiques. Ce modèle permet de déterminer des caractéristiques cinétiques spécifiques en partant du postulat réactionnel suivant :

$$S + E \underset{k_2}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} ES \overset{k_3}{\leftrightarrow} E + P$$

Un substrat S se lie avec une enzyme E pour former un intermédiaire ES, appelé complexe enzyme-substrat, cet intermédiaire se dissocie finalement pour donner un produit P avec régénération de l'enzyme. Ce modèle suppose l'indépendance de chaque site actif. k_1, k_2 et k_3 représentent les constantes de vitesse de chaque acte élémentaire.
Dans l'hypothèse de l'approximation des états quasi-stationnaires, la vitesse de réaction est constante, ce qui revient à considérer que [ES] est constante. Le modèle permet d'accéder à deux paramètres cinétiques caractéristiques : K_M et l'activité maximale de l'enzyme A_{max} dans les conditions définies par l'expérimentateur.

II.3.4.1.a. Constante de Michaelis K_M

D'après l'équation réactionnelle de Michaelis, les différentes équations cinétiques décrivant la vitesse d'apparition ou de disparition d'un composé peuvent être écrites de la manière suivante :

$$A_1 = k_1[E][S] \; ; \; A_2 = k_2[ES] \; ; \; A_3 = k_3[ES] \qquad \text{Eq. II.2}$$

Les vitesses de consommation de substrat S et d'apparition du produit P s'écrivent :

$$A_i = \frac{d[S]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] \qquad \text{Eq. II.3}$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_3[ES] \qquad \text{Eq. II.4}$$

La variation de la concentration en complexe enzyme substrat ES est liée aux vitesses des différentes étapes du mécanisme de Michaelis tel que :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_2[ES] - k_3[ES] = 0 \qquad \text{Eq. II.5}$$

On obtient finalement la constante de Michaelis K_M tel que :

$$K_M = \frac{k_2 + k_3}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad \text{Eq. II.6}$$

II.3.4.1.b. Activité maximale A_{max}

La quantité totale d'enzyme est définie tel que $[E_T] = [E] + [ES]$. D'après la définition de K_M, on peut écrire :

$$[E_T][S] = [ES](K_M + [S]) \qquad \text{Eq. II.7}$$

Lorsque [E] = [E_T], la vitesse de consommation de substrat par l'enzyme est maximale tel que $k_3[E_T] = A_{\max}$. En multipliant l'équation précédente par k_3, on obtient finalement :

$$A = \frac{A_{\max}[S]}{K_M + [S]} \qquad \text{Eq. II.8}$$

Plus concrètement, K_M représente alors la concentration du substrat pour laquelle l'activité de l'enzyme correspond à la moitié de sa valeur maximale tel que $A_{K_M} = \frac{A_{\max}}{2}$.

L'activité maximale et la constante de Michaelis ont été estimées par la représentation mathématique de Lineweaver and Burk adaptée à nos experiences en utilisant le volume d'extrait enzymatique en lieu de la concentration en substrat tel que :

$$\frac{1}{A} = \frac{K_M}{A_{\max}} \times \frac{1}{V} + \frac{1}{A_{\max}} \qquad \text{Eq. II.9}$$

II.3.4.2. Modélisation des cinétiques d'inactivation

Quatre modèles mathématiques ont été appliqués pour décrire l'évolution de l'activité résiduelle de l'enzyme au cours du temps. Les équations et la description du mécanisme de dénaturation de l'enzyme de chaque modèle sont présentées dans le Tableau II-2.

Le modèle du 1er ordre (Eq. 10) est généralement utilisé pour la description de l'inactivation d'enzyme : l'enzyme native (*N*) est directement dénaturée (*I*), suivant une constante d'inactivation *k* (min^{-1}).

Le modèle fractionnel (Eq. 11) est similaire au modèle du 1er ordre mais suppose l'existence d'une fraction résistante de l'enzyme (*RF*), encore présente après la dénaturation et caractérisée par son activité A_{rf}.

Le modèle biphasique (Eq. 12) suppose que l'enzyme existe sous deux formes indépendantes l'une de l'autre et suivant respectivement inactivation cinétique de 1er ordre : une fraction thermostable (N_S) et thermolabile (N_L) caractérisées par leur activité, respectivement A_S et A_L, et leur constante cinétique, respectivement k_S et k_L.

Le modèle consécutif (Eq. 13) implique que le procédé d'inactivation a lieu suivant deux étapes successives irréversibles: la conversion de la forme native de l'enzyme en une forme intermédiaire (*U*) puis la conversion de celle-ci en une forme dénaturée. A_1 et A_2 représentent respectivement l'activité de la forme native et intermédiaire, k_1 et k_2 les constantes cinétiques d'inactivation pour obtenir respectivement *U* et *I*.
Les énergies d'activation ont été estimées d'après l'évolution des constantes cinétiques en fonction de la temperature via l'équation d'Arrhénius en traçant ln(*k*) en fonction de l'inverse de la temperature.

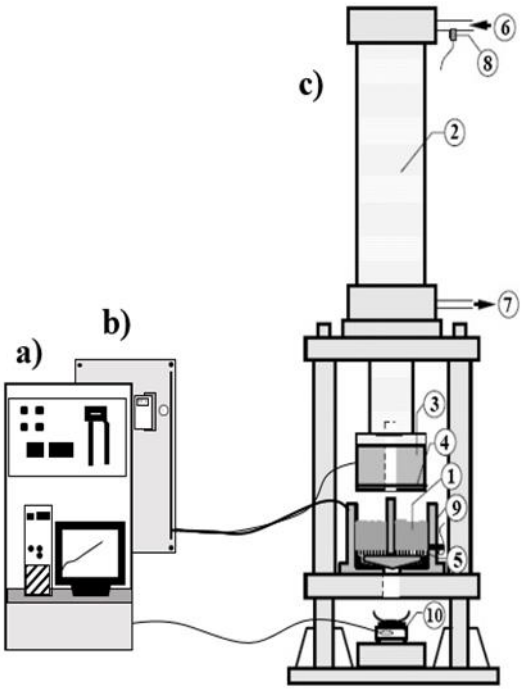
Tableau II-2 - Modèles cinétiques utilisés pour la description de l'inactivation de la myrosinase

Model	Mathematical expression	
1er ordre		
$N \xrightarrow{k} I$	$A_t = A_0 \exp(-kt)$	Eq. II.10
Fractionnel		
$N + RF \xrightarrow{k} I + RF$	$A_t = A_{rf} + (A_0 - A_{rf}) \exp(-kt)$	Eq. II.11
Biphasique		
$N_L \xrightarrow{k_L} I_L$ $N_S \xrightarrow{k_S} I_S$	$A_t = A_L \exp(-k_L t) + A_S \exp(-k_S t)$	Eq. II.12
Etapes successives		
$N \xrightarrow{k_1} U \xrightarrow{k_2} I$	$A_t = \left[A_1 - A_2 \left(\frac{k_1}{k_1 - k_2} \right) \right] \exp(-k_1 t) + \left[A_2 \left(\frac{k_1}{k_1 - k_2} \right) \right] \exp(-k_2 t)$	Eq. II.13

II.4. Extraction de l'huile

L'extraction d'huile a été faite par pressage en utilisant une presse hydraulique de laboratoire (Creusot-Loire, France) (Figure II-5Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Cette presse permet de travailler jusqu'à une pression maximale de 150 bars et avec une vitesse de compression de 0.2-0.5 mm/s. Elle est équipée d'une chambre de pressage de 20 cm de diamètre et d'une hauteur de 16 cm. L'étanchéité entre la chambre de pressage et le piston est assurée par un joint torique. L'évacuation de l'huile extraite se fait au travers d'un système de drainage amovible, installé dans la chambre de pressage au-dessus de l'orifice d'écoulement, sur lequel repose un filtre en acier inoxydable reposant lui-même sur une plaque rigide perforée. La presse est reliée à une chaudière externe (Parmilleux) permettant de chauffer la chambre de pressage jusqu'à 130°C via la circulation d'un fluide caloporteur (huile) au niveau de la double enveloppe entourant la chambre de pressage. La régulation de la température est assurée par un thermostat type Minicor Coreci.

Les graines sont préalablement aplaties à l'aide d'un aplatisseur à rouleaux rotatifs (Grenier-Charvet, France). L'aplatissage entraine l'éclatement de la quasi-totalité des membranes cellulaires, permettant d'améliorer la disponibilité de l'huile. Une balance électronique installée sous la chambre de pressage et connectée à un ordinateur équipé d'un système d'acquisition permet d'enregistrer au cours du temps la masse d'huile récupérée et ainsi suivre la cinétique de pressage.



a) Panneau de commande et ordinateur permettant l'acquisition des données

b) Chaudière (Parmilleux) permettant d'effectuer des pressages à haute température (circulation du fluide caloporteur autour de la chambre)

c) Presse à plaque :
   1. Chambre de pressage (diamètre 20 cm, hauteur : 16 cm, volume : 4712 cm²) contenant l'échantillon à presser
   2. Cylindre
   3. Piston exerçant une pression unidirectionnelle
   4. Joints anti-extrusion
   5. Filtre inox permettant la rétention de la matrice solide
   6. Entrée du fluide hydraulique
   7. Sortie du fluide hydraulique
   8. Capteur de pression
   9. Capteur de température
   10. Balance permettant le relevé de la masse d'huile reliée à l'ordinateur en a)

Figure II-5 - Schéma simplifié de la presse à plaque (Creusot-Loire, France)

En se basant sur des essais préliminaires et afin de maximiser le rendement d'extraction, nous avons opté pour deux étapes de pressage successifs de 60 min chacun à 100 bars et à 80°C avec une étape intermédiaire de mélange après défragmentation du gâteau formé en parant de 300 g de graines aplaties. Le tourteau obtenu après le double pressage a été analysé avant d'être utilisé pour extraire les GSL. Le rendement de pressage Y_h (%) est calculé à l'aide de l'Eq. II.14 :

$$Y_h = \left(\frac{m_t}{m_i}\right) \times 100 \qquad \text{Eq. II.14}$$

Avec m_t (g) la masse d'huile récupérée et m_i la quantité d'huile disponible dans les graines (g).

II.5. Extraction des glucosinolates

L'extraction des GSL a été entreprise par diffusion dans une solution hydro-alcoolique. Différents prétraitements ont été testés pour rendre les GSL plus accessibles lors de l'étape d'extraction. Il s'agit essentiellement des décharges électriques de hautes tensions, des US et du broyage. Ce dernier est considéré comme traitement de référence pour comparaison.

II.5.1. Prétraitements

II.5.1.1. Broyage

Le tourteau a été broyé à l'aide d'un moulin à café (MCG2013B-16) pendant 30 s. L'analyse granulométrique du broyat réalisée à l'aide du Mastersizer 2000 instrument (Malvern instruments, UK) a montré que le diamètre moyen des particules est de 232.4 µm (d_{32}).

II.5.1.2. Décharges électriques de haute tension (DEHT)

Le traitement par DEHT consiste à appliquer un certain nombre de décharges électriques (impulsions) entre deux électrodes au sein d'une chambre de traitement contenant la suspension (matrice et solution) et permettant l'endommagement du matériel cellulaire. Dans le cadre de cette étude, l'appareillage utilisé est composé d'un générateur électrique de haute tension (Basis, Saint-Quentin, France) relié à une chambre de traitement d'une capacité de 1 L (

Figure ***II-6***). L'énergie électrique est emmagasinée dans le condensateur et est envoyée via l'éclateur sous la forme d'une décharge électrique dans la cellule de traitement. L'application d'un certain nombre d'impulsions correspond à des recharges et décharges successives dans la cellule de l'énergie du condensateur. La chambre de traitement est équipée de deux électrodes en acier inoxydable qui doivent être immergées dans la suspension. L'électrode supérieure (électrode pointe, 10mm de diamètre) est reliée au générateur, l'électrode inférieure (plane, 35mm de diamètre) est connectée à la terre. Les principales caractéristiques de générateur sont présentées dans le Tableau II-3.

Tableau II-3 – Caractéristiques du générateur électrique (Basis, Saint-Quentin)

Paramètres	Valeurs
Tension	0 – 40 000 V
Intensité de courant	0 – 10 000 A
Nombre d'impulsions	Infini
Durée de chaque impulsion	10 µs

Pour chaque essai, 40 g de tourteau obtenu après le double pressage a été mélangé avec 200 g d'eau et l'ensemble est introduit dans la cellule de traitement. La tension du traitement a été fixée à $U = 40$ kV et la distance entre les électrodes à $d = 0.5$ cm pour avoir une intensité de traitement $E = U/d = 80$ kV/cm. Le nombre des impulsions a été varié entre 0 et 500 impulsions avec une fréquence de génération d'impulsions de 1 Hz (1 impulsion par sec). La température de la suspension est mesurée après traitement. A la fin du traitement, le mélange est centrifugé à 6000 rpm pendant 10 min et le surnageant a été utilisé pour doser les GSL.

La consommation énergétique induite par le traitement électrique est déterminée par le nombre total d'impulsions générées lors du traitement via la masse de solution traitée. L'énergie spécifique massique Q_{DEHT} (J/kg) est calculée d'après la relation suivante :

$$Q_{DEHT} = \frac{n \times E_p}{m} \qquad \text{Eq. II.15}$$

Avec E_p l'énergie moyenne d'une impulsion fournie par le générateur électrique (160 J), n le nombre d'impulsions et m la masse totale de la suspension (solide et liquide) (kg).

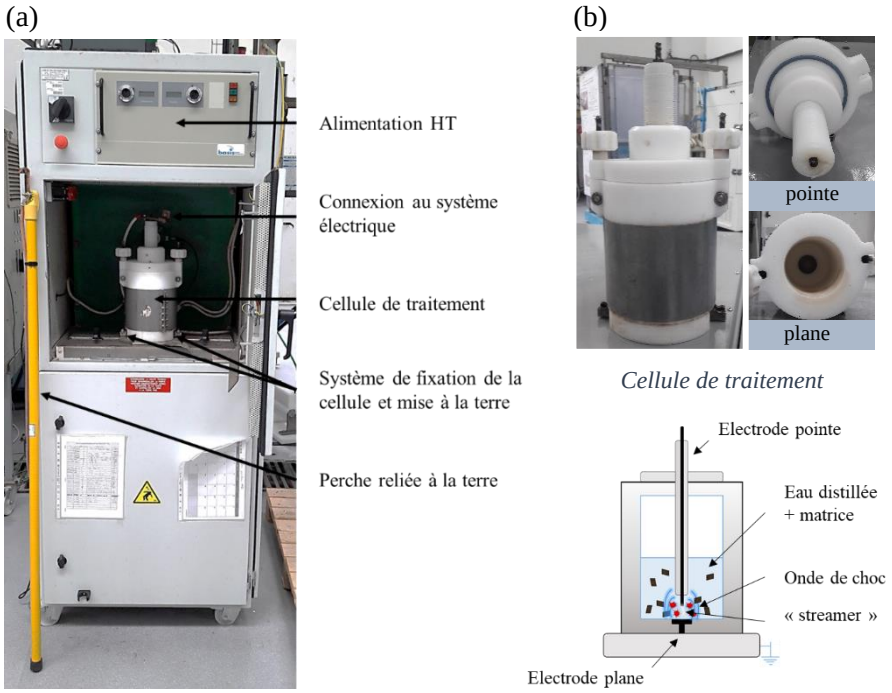


Figure II-6 – Système de traitement de décharges électriques haute tension (DEHT) : (a) générateur de haute tension basis (Saint-Quentin), (b) cellule de traitement électrique

II.5.1.3. Extraction assistée par ultrasons

L'intensification de l'extraction par les ultrasons repose sur le phénomène de cavitation permettant la fragilisation et l'endommagement du matériel cellulaire.

L'appareil expérimental se compose d'un générateur d'ultrasons UP 400S (Hielscher, Stuttgar, Allemagne) relié à une sonde d'ultrasons de type H14 (Hielscher GmbH, Allemagne) en titane (diamètre 14 mm, longueur maximale pouvant être immergée : 90 mm, longueur totale : 100 mm) placé dans une cabine de traitement (Figure II-7). La sonde est immergée dans un bécher contenant le produit à traiter dans son solvant. Les caractéristiques du générateur d'ultrasons sont indiquées dans le Tableau II-4.

Tableau II-4 – Caractéristiques du générateur d'ultrasons UP 400S

Paramètres	Valeurs
Puissance maximale	400 W
Contrôle de la puissance	20 – 100%
Fréquence maximale	24 kHz
Contrôle de la fréquence	0 – 100%

L'extraction assistée par ultrasons a été réalisée avec (thermorégulation via un bain de glace) et sans contrôle de la température. Le traitement a été réalisé à différentes puissances : 100 W (25%), 200 W (50%) et 400 W (100%) à une fréquence réglée à 1, soit 24 kHz.

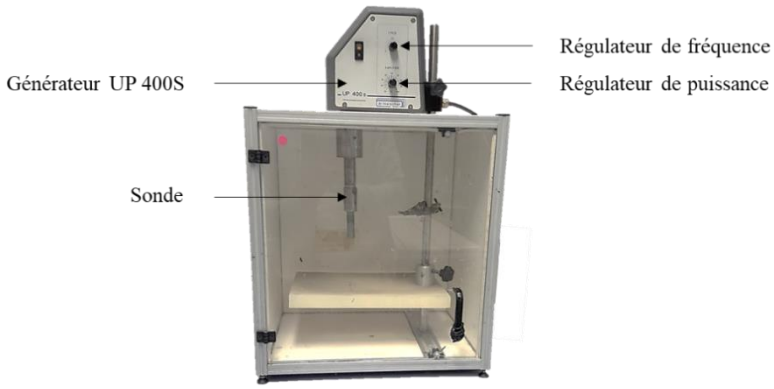


Figure II-7 – Générateur ultrasons UP 400S (Hielscher, Stuttgar, Allemagne)

II.5.2. Extraction des glucosinolates

La diffusion est réalisée en discontinu dans un ballon en verre d'une capacité de 500 mL. L'agitation et la température sont réglées et contrôlées à l'aide d'une plaque chauffante avec agitation de type IKA (Figure II-8). La vitesse d'agitation est réglée à 500 rpm et la durée de l'extraction fixée à 30 min avec des prélèvements réguliers afin d'établir les cinétiques d'extraction. Le ballon est recouvert par du papier aluminium afin de limiter l'évaporation. Pour chaque prélèvement, 1 ml est prélevé et la même quantité de solvant frais est ajoutée afin de maintenir un volume d'extraction constant. Les échantillons prélevés sont ensuite filtrés à travers un filtre membranaire PTFE de 0.45 µm et stockés à 4°C jusqu'à analyse de leur teneur en glucosinolates et protéines.

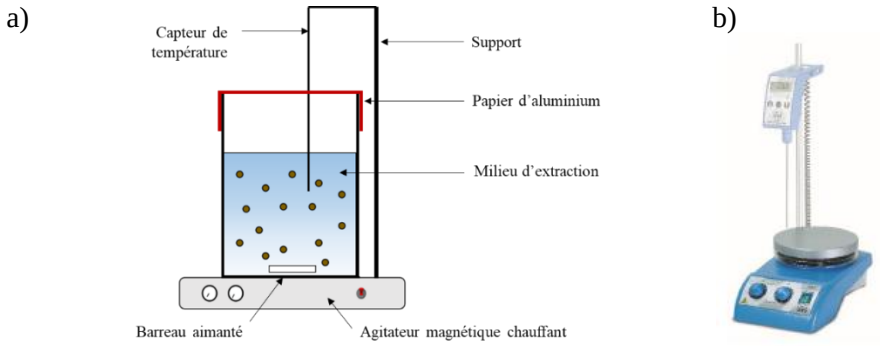


Figure II-8 – (a) représentation symbolique du dispositif de diffusion en discontinu (b) Plaque chauffante magnétique type IKA

Afin d'optimiser le procédé, une étude paramétrique a été réalisée en étudiant les effets des paramètres suivants :

- **La composition du solvant d'extraction** : L'eau et l'éthanol, seuls ou en mélange, ont été utilisés comme solvants verts dans cette étude pour substituer le méthanol habituellement utilisé. Des mélanges hydro-alcooliques allant de 0% à 100 % d'éthanol ont été testés.
- **La température** : La température a été étudiée de 20 jusqu'à 60°C pour éviter de dégrader les protéines. La norme ISO relative à l'extraction des glucosinolates prévoit une extraction à 75°C.

- **Le ratio liquide/solide** : Les ratios étudiés sont de 5, 10 et 20 à partir de 40g de tourteau. Dans le cadre du traitement électrique par DEHT, un ratio de 5 a été utilisé. Un volume eau/éthanol est ensuite ajouté à la suspension après le traitement pour retrouver les mêmes conditions de ratio et/ou de proportion eau/éthanol que la diffusion.

Un test contrôle a également été réalisée sans aucun traitement sur des carrés de tourteaux découpés à la main (~ 1-1.5 cm) afin de constater l'influence des différentes opérations de traitement.
Les performances de l'extraction sont évaluées par le calcul du rendement d'extraction des glucosinolates Y_{GSL} (Y_{SIN} défini pour la sinigrine, Y_{GNA} pour la gluconapine), le rendement en protéines Y_{pr}, la sélectivité de l'extraction S_{GSL} envers les protéines, et la consommation énergétique totale E_t respectivement définies d'après les Eq. 16-19 :

$$Y_{GSL}(\%) = \frac{C_{GSL}}{C_{GSL_0}} \times 100 \qquad \text{Eq. II.16}$$

Avec C_{GSL} la concentration en GSL (sinigrine C_{SIN} ou gluconapine C_{GNA}) au temps d'extraction t en solution (µmol/g MS) et C_{GSL_0} la concentration initiale en GSL (SIN ou GNA) du tourteau (µmol/g MS).

$$Y_{pr}(\%) = \frac{m_{pr}}{m_{pr_0}} \times 100 \qquad \text{Eq. II.17}$$

Avec m_{pr} la masse de protéines extraites au temps d'extraction t et m_{pr_0} la masse de protéines du tourteau.

$$S_{GSL}(\%) = \frac{Y_{GSL}}{Y_{GSL} + Y_{pr}} \times 100 \qquad \text{Eq. II.18}$$

$$E_t = E_{pr} + E_{ex} \qquad \text{Eq. II.19}$$

Avec E_{pr} la consommation (kJ/kg) de l'opération de prétraitement (broyage, DEHT) et E_{ex} la consommation due au chauffage du solvant durant l'extraction (kJ/kg), estimée avec un watt-mètre connectée à la plaque chauffante.

II.5.3. Cinétiques d'extraction

II.5.3.1. Modèle empirique de Peleg

Le modèle empirique de Peleg (1988) est généralement utilisé pour décrire les cinétiques de sorption mais peut également être appliqué à la description des cinétiques d'extraction qui ont une évolution similaire. Le modèle de Peleg permet d'estimer la concentration d'extraction infinie. L'évolution de la concentration de soluté extrait au cours du temps est régie d'après l'équation suivante :

$$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 t} \qquad \text{Eq. II.20}$$

Avec $C(t)$ la concentration du composé d'intérêt à un moment t, t le temps d'extraction et K_1 et K_2 des constantes. La constante K_1 est caractéristique de la vitesse d'extraction B_0 dès les premières secondes pour le temps $t = t_0$ tel que $B_0 = 1/K_1$. La constante K_2 permet d'accéder à la concentration maximale d'extraction C_∞ pour un temps infini tel que $C_\infty = 1/K_2$. L'eq. 20 peut être linéarisée sous la forme de l'Eq. 21 afin de déterminer ces deux paramètres.

$$\frac{t}{C(t)} = \frac{1}{C_\infty} t + \frac{1}{B_0} \qquad \text{Eq. II.21}$$

II.5.3.2. Coefficient de diffusion

Le taux normalisé de GSL B utilisé pour décrire la diffusivité des glucosinolates est défini comme suit :

$$B = \frac{C_{GSL}}{C_{GSL_\infty}} \qquad \text{Eq. II.22}$$

Avec C_{GSL_∞} la concentration de GSL (sinigrine, C_{SIN} ou gluconapine, C_{GNA}) à t infini, estimée d'après l'équation de Peleg (Eq. 20). Le milieu d'extraction étant assimilé à un volume limité parfaitement agité (Crank, 1975), une solution analytique de l'équation de diffusion a été utilisée pour estimer le coefficient de diffusion D (m²/s) de la sinigrine et gluconapine (Crank, 1975) :

$$B = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(\alpha+1)}{9 + 9\alpha + q_n^2 \alpha^2} \exp(-D q_n^2 t / r^2) \qquad \text{Eq. II.23}$$

$$\tan\ q_n = \frac{3 q_n}{3 + \alpha q_n^2} \qquad \text{Eq. II.24}$$

Avec q_n les racines non-nulles de l'équation, t le temps d'extraction, r le rayon des particules considérées sphériques et α le ratio liquide/solide. Les valeurs de q_n pour α>9 sont q_1 = 3.1416, q_2 = 6.2832, q_3 = 9.4248, q_4 = 12.5664, q_5 = 15.7080 and q_6 = 18.8496 (Crank, 1975).

II.6. Purification des glucosinolates

II.6.1. Chromatographie d'échange d'ions

II.6.1.1. Choix des résines

Les glucosinolates sont des composés anioniques en solution. Par conséquent leur séparation des autres composés peut être réalisée via l'utilisation de résine échangeuse d'anions. Deux types de résines disponibles sous la forme de microbilles ont été sélectionnés et étudiés d'après leur capacité d'adsorption et de désorption des glucosinolates selon la nature du groupe fonctionnel échangeur illustré en Figure II-9 : la résine DIAION PA312LOH avec une forte capacité d'ionisation (fortement basique) type I caractérisée par une amine quaternaire, et la résine RELITE RAM1, à faible capacité d'ionisation (faiblement basique) portant une amine tertiaire. Le support matriciel se présente sous forme styrénique.

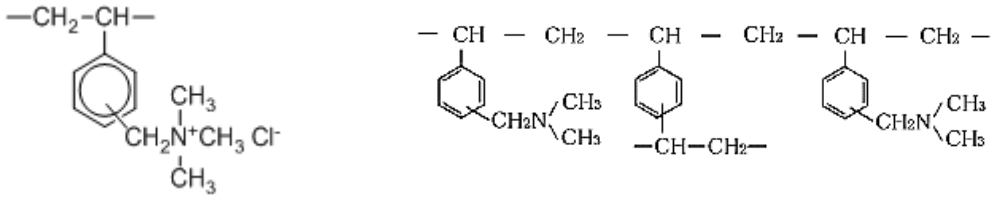


Figure II-9 – Structure chimique d'une résine échangeuse d'ions fortement basique type I (gauche) et d'une résine faiblement basique type amine tertiaire (droite)

Les caractéristiques de ces deux résines sont présentées dans le Tableau II-5.

Tableau II-5 – Caractéristiques des résines anioniques utilisées pour la purification de jus

Paramètre	DIAION PA312LOH	RELITE RAM1
Matrice	Styrène	Styrène-DVB
Groupe fonctionnel	Trimethyl ammonium	Amine tertiaire
Densité relative (g/mL)	1.1	1.03 – 1.05
Capacité d'échange (eq/L)	0.9	1.5
Taille effective (mm)	0.45	0.7
Taux d'humidité (%)	43-55	50-58
Stabilité thermique	60°C	100°C

II.6.1.2. Etude en régime statique

II.6.1.2.a. Réaction d'adsorption

- Protocole

L'adsorption des glucosinolates a été réalisée dans un premier temps en mode statique : Pour ce faire, 50 mL de jus obtenu lors de l'étape d'extraction dans les conditions optimisées est introduit dans un bécher de 100 mL avec une certaine quantité de résine sous agitation à 250 rpm. Le ratio résine/jus a été varié de 6 à 100 g/L et la température de 20 à 60 °C et des prélèvements ont été réalisés par intervalle de 10 min pendant 2h afin d'obtenir les cinétiques d'adsorption.

Afin d'évaluer l'efficacité de la résine, La capacité d'adsorption q_e et le taux d'adsorption E ont été calculés en utilisant les Eq. 25 et 26 :

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m_r} \qquad \text{Eq. II.25}$$

Avec q_e la capacité d'adsorption de la résine (mg/g de résine), C_0 et C_e respectivement les concentrations initiales et à l'instant t du GSL en solution (mg/L), V le volume de jus (50 mL) et m_r la masse de résine (g).

$$E\ (\%) = \left[\frac{(C_0 - C_e)}{C_0} \right] \times 100 \qquad \text{Eq. II.26}$$

- Isothermes d'adsorption

Les isothermes d'adsorption de la sinigrine et de la gluconapine à différentes températures (20 à 60°C) ont été étudiées. Les équations de Langmuir, Freunlich et Temkin ont été évaluées pour caractériser la nature de l'adsorption des GSL.

Le modèle proposé par Langmuir (1918) décrit l'adsorption en monocouche d'un adsorbat présent en phase gazeuse ou dans un liquide idéal et est valable pour décrire l'adsorption de composés sur solide. Ce modèle suppose que les sites d'adsorption sont tous identiques et ont le même comportement. Pour une température donnée, la proportion de sites occupés ou capacité d'adsorption est lié à la concentration à l'équilibre de l'adsorbat dans le milieu fluide selon l'équation :

$$q_e = \frac{q_0 K_L C_e}{1 + K_L C_e} \qquad \text{Eq. II.27}$$

Avec q_e la capacité d'adsorption à l'équilibre aux conditions données (mg/g), C_e la concentration des GSL à l'équilibre (mg/mL), K la constante d'adsorption à l'équilibre (mL/mg) dépendant de l'adsorbat, de l'adsorbant et de la température, et q_0 la capacité maximale d'adsorption du soluté dans les conditions données. Cette équation peut être linéarisée sous la forme présentée ci-après (Eq.28). L'ordonnée à l'origine de la droite correspondante permet de déterminer la valeur de q_0 :

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_0} + \frac{C_e}{q_0} \qquad \text{Eq. II.28}$$

Un paramètre adimensionnel appelé facteur de séparation de Langmuir peut être défini comme indicateur de la faborabilité d'adsorption tel que :

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \qquad \text{Eq. II.29}$$

L'adsorption est dite défaborable lorsque $R_L>1$, favorable lorsque $0<R_L<1$, et irréversible pour un facteur de séparation nul.
Ce modèle reste cependant très simple et ne permet pas de décrire l'adsorption dans la mise en jeu de phénomènes plus complexes : présence de plusieurs types de sites d'adsorption, adsorption coopérative à la surface etc.

Le modèle de Freundlich (1906) est valable pour des sorptions mettant en jeu des fluides non idéaux avec adsorption en multicouche via un comportement hétérogène des sites d'adsorption avec des énergies de fixation différentes. La capacité d'adsorption est exprimée de la manière suivante ;

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \qquad \text{Eq. II.30}$$

Avec K_F et n des constantes qui dépendent de la nature de l'adsorbat, de l'adsorbant et de la température. K_F est indicateur de la capacité d'adsorption et le ratio 1/n est un indicateur de la favorabilité d'adsorption. Une valeur pour 1/n comprise entre 0 et 1 représente une sorption favorable et hétérogène. L'adsorption est considérée comme très favorable pour des valeurs de n proches de 0 et défavorable pour des valeurs supérieures à 1 (Treybal, 1981).
L'équation peut être linéarisée comme suit :

$$\ln q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \qquad \text{Eq. II.31}$$

Le modèle de Temkin quant à lui étudie la chaleur d'adsorption mise en jeu lors de la formation de la couche où l'adsorption est caractérisée par une distribution uniforme des énergies de liaison en surface. L'isotherme de Temkin s'exprime sous la forme :

$$q_e = \frac{RT}{\Delta Q} \ln(K_T C_e) \qquad \text{Eq. II.32}$$

Avec K_T (mL/g) la constante d'équilibre d'adsorption et ΔQ la constante de Temkin relative à la chaleur de sorption (J/mol).

- Etude cinétique et mécanisme d'adsorption

Afin de décrire le mécanisme de la cinétique d'adsorption des glucosinolates sur la résine, les modèles de pseudo 1er ordre et de pseudo 2nd ordre ont été appliqués.
Le modèle de pseudo 1er ordre (ou modèle de Lagergren) décrit l'adsorption d'un soluté sur un adsorbant selon un mécanisme du 1er ordre tel que :

$$\frac{dq_t}{dt} = K_1(q_e - q_t) \qquad \text{Eq. II.33}$$

Avec q_t la capacité d'adsorption au temps t (mg/g) et K_1 la constante cinétique (min^{-1}). La valeur de K_1 est déterminée en traçant $ln\ (q_e-q_t)$ en fonction de t d'après la linérisation de l'Eq. 33 après intégration entre t=0 et t=t, $q_t=0$ et $q_t=q_t$ tel que :

$$\ln\left(q_e - q_t\right) = \ln q_e - K_1 t \qquad \text{Eq. II.34}$$

Le modèle de pseudo 2nd ordre considère que la taux d'adsorption du soluté est propotionnel à la quantité de sites disponibles de l'adsorbant tel que :

$$\frac{dq_t}{dt} = K_2 (q_e - q_t)^2 \qquad \text{Eq. II.35}$$

Avec K_2 la constante cinétique (g/mg.min). La linéarisation de l'Eq. 35 après intégration permet de déterminer la valeur de K_2 d'après le tracé de t/q_t vs t à partir de l'Eq. 36 :

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e} t + \frac{1}{K_2 q_e^2} \qquad \text{Eq. II.36}$$

Enfin afin d'identifier le mécanisme de diffusion, les cinétiques d'adsorption ont été analysées en utilisant le modèle de diffusion intra-particulaire généralement exprimé d'après l'équation de Webber et Moris (Eq. 37). Ce modèle est utilisé afin de déterminer l'étape limitante du procédé d'adsorption. L'adsorption d'un soluté d'une solution vers un adsorbant implique une succession de mécanismes de diffusion : le transfert de masse du soluté vers l'adsorbant, la diffusion externe (adsorption du soluté par la surface externe de l'adsorbant) et la diffusion interne (diffusion du soluté dans les pores internes et adsorbption par la surface interne de l'adsorbant).

$$q_t = K_i t^{0.5} + C \qquad \text{Eq. II.37}$$

Avec K_i la constante de diffusion intraparticulaire (mg/g.min$^{0.5}$) et C est un paramètre indicateur de l'épaisseur de la couche limite. Le tracé de q_t vs $t^{0.5}$ donne généralement une droite linéaire mais peut dans certains cas donner des sections linéaires multiples indiquant l'existence de différents mécanismes controlant le procédé d'adsorption.

II.6.1.2.b. Désorption des glucosinolates

La réaction de désorption consiste à utiliser un composé chimique (sel) permettant de « décrocher » les GSL du groupe actif par échange d'ions afin de afin de les récupérer sous forme d'un sel cationique. A la fin d'adsorption, la résine est filtrée puis rincée à l'eau distillée. Elle est ensuite mise en contact avec le sel d'élution dans un bécher sous agitation à 250 rpm pendant 120 min et des prélèvements par intervalle de 10 min afin d'obtenir les cinétiques de désorption. Une étude paramétrique d'optimisation a été ainsi réalisée en variant les paramètres opératoires suivants :

- **Le sel d'élution** : la capacité de désorption du sel est étroitement liée à sa force ionique qui dépend notamment de la taille des atomes mis en jeu. Le chlorure de sodium NaCl et de potassium KCl ont été sélectionnés pour la récupération des GSL. L'utilisation de $MgCl_2$ a été envisagée mais abandonnée du fait de sa toxicité.
- **La concentration** : la concentration des sels d'élution a été variée entre 0.5 et 2 M. L'augmentation de la concentration augmente la force ionique de l'éluant.
- **Le ratio sel/résine** : le ratio liquide/solide a été varié de 20 à 40 mL/g.

Le taux de désorption D (%) est défini d'après la relation suivante :

$$D = \left[\frac{C_d \times V_d}{(C_0 - C_e) \times V} \right] \times 100 \qquad \text{Eq. II.38}$$

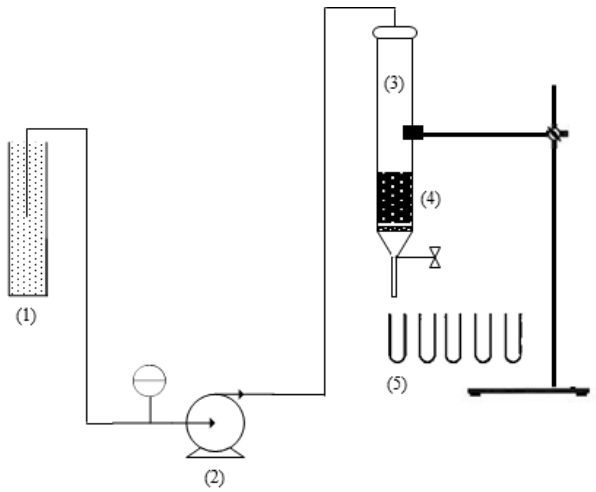
Avec C_d la concentration du GSL dans l'éluant (mg/mL) et V_d le volume de l'éluant (mL).

II.6.1.2.c. Régénération de la résine

La régénération consiste à traiter la résine dans l'objectif de lui redonner tout son potentiel/capacité d'échange d'origine afin de pouvoir la réutiliser. Une solution de soude est généralement conseillée pour la régénération de résines anioniques. Dans le cadre de cette étude, la régénération a été réalisée en mettant en contant la résine et une solution de soude dans un bécher sous agitation pendant 30 min. La concentration en soude a été variée de 2 à 8% et le ratio volume de soude/masse de résine (mL/g) entre 2 et 8 mL/g. L'efficacité de la régénération sera évaluée en comparant les cinétiques d'adsorption d'une résine neuve et d'une résine régénérée.

II.6.1.3. Etude en régime dynamique

Afin de valider la faisabilité du procédé en continu, des essais d'adsorption en dynamique ont été effectués moyennant une colonne en verre (450 x 22 mm) équipée d'un fritté en bas de colonne et d'une valve permettant de réguler le débit d'élution. La colonne est chargée avec la résine pour former un lit poreux d'un volume de 11.4 cm^3 (Figure II-10). La résine est tout d'abord rincée à l'eau distillée puis 5 mL de jus sont versés dans la colonne pour maintenir le lit immergé et établir un régime stationnaire de fonctionnement. Le jus (50 mL) est ensuite est pompé et injecté en haut de la colonne à l'aide une pompe péristaltique et l'éluât est récupéré en bas de la colonne au même débit d'alimentation (1 mL/min). La colonne est ensuite rincée à l'eau distillée avant de procéder à la désorption (NaCl à 1M d'après l'étude statique). L'effet du débit et du pH de l'éluant sur la désorption des GSL a été étudié. Des échantillons de 4 mL sont collectés au cours du temps et analysés par HPLC. Le taux de désorption des GSL a été calculé d'après l'Eq. 38.



(1) jus

(2) pompe péristaltique

(3) colonne en verre

(4) résine (phase fixe échangeuse d'anions)

(5) recueil des fractions

Figure II-10 – Dispositif de purification sur colonne par résine échangeuse d'anion

II.6.2. Filtration membranaire

II.6.2.1. Optimisation du procédé

La cellule Amicon 8200 (Millipore, France) a été utilisée pour étudier la purification des GSL par filtration membranaire en mode frontale avec et sans agitation. La cellule est équipée d'un agitateur et d'un réservoir d'une capacité de 200 mL (hauteur 15.5 cm) Le diamètre interne de la cellule est de 6.35 mm. Une membrane est fixée sur le support au fond de la cellule sur laquelle repose un joint. La surface filtrante est de 28.7 cm². La pression est appliquée par l'intermédiaire d'un manodétenteur et la pression maximale de fonctionnement est de 5 bars. La cellule est installée sur une plaque d'agitation afin de contrôler la vitesse d'agitation lors de la filtration. Le filtrat est recueilli par un orifice situé au pied de la cellule et récupérée dans un récipient placé sur le plateau d'une balance électronique PM600 (Mettler-Toledo, France) connectée à un ordinateur équipé d'un système d'acquisition installé par le Service Electronique de l'UTC permettant d'enregistrer au cours du temps la masse du perméat et ainsi suivre la cinétique de filtration. Le dispositif expérimental global est illustré Figure II-11.

Tous les essais ont été réalisées à température ambiante (25°C) et en utilisant V_0 = 100 mL de jus brut et avec une membrane neuve à chaque fois. Afin d'optimiser le procédé les paramètres suivants ont été étudiés.

- **Le seuil de coupure de la membrane (MWCO)** : Au vu de la taille des GSL présents (359-373 g/mol) devant celle d'autres impuretés comme les protéines (> 1.10^4 g/mol), les membranes sélectionnées sont en polyethersulfone (PES) (Alting, France) avec des seuils de coupure allant de 5 à 150 kDa (soit 5 à 150 kg/mol par équivalence vis-à-vis de la masse molaire des molécules). Il a été ainsi supposé que les GSL ne seraient pas retenues par les membranes et seraient récupérés dans le perméat.
- **La pression transmembranaire (ΔP)** : les filtrations sont étudiées de 1 à 5 bars.
- **La vitesse d'agitation (ω)** : la filtration a été réalisée en mode statique (sans agitation, 0 rpm) et dynamique (avec agitation) en étudiant différentes vitesses d'agitation de 200 à 600 rpm.

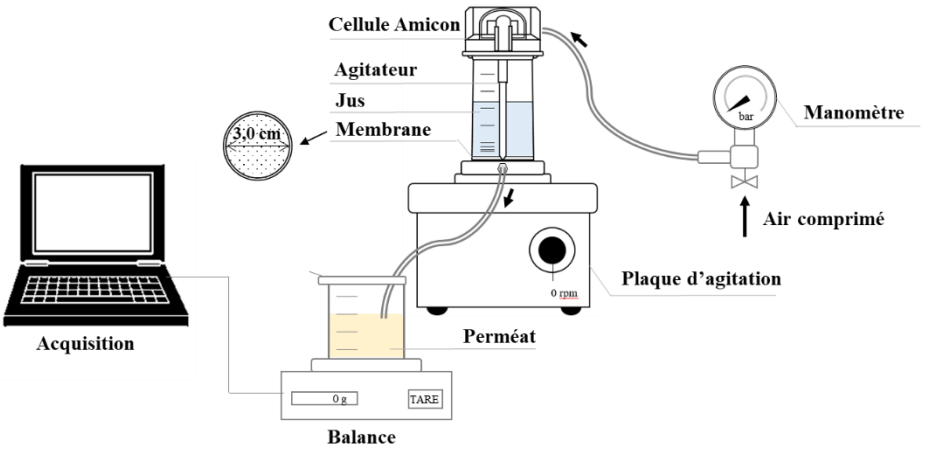


Figure II-11 – Dispositif expérimental de filtration membranaire par la cellule Amicon 8200 (Millipore, France)

Le flux de filtrat J ($m^3/m^2.s$) est calculé d'après la relation suivante :

$$J = \frac{1}{S}\frac{dV}{dt} \qquad \text{Eq. II.39}$$

Avec S la surface de filtration (m^2), V le volume de perméat (m^3) et t le temps de filtration (s).
Le facteur de rétention volumique FRV est obtenu d'après la relation suivante :

$$FRV = \frac{V_0}{V_0 - V} \qquad \text{Eq. II.40}$$

Avec V_0 le volume initial de jus (m^3) et V le volume de perméat récolté à l'instant t (m^3).
Le modèle de polarisation de gel ou de transfert de matière propose également une description du flux de filtration d'après le transport par convection des solutés sur la surface de la membrane. A l'approche de la couche limite, une différence de concentration engendre par effet diffusionnel une rétrodiffusion du flux de soluté vers la solution d'alimentation. Le débit de filtration évolue alors en fonction du FRV d'après la relation suivante :

$$J = k^* - k\ln(FRV) \qquad \text{Eq. II.41}$$

Avec $k^*=kln(C_c/\ C_{cs_0}\ )$ est une constante liée au flux initial, k (m/s) est le coefficient de transfert de masse déterminée d'après la pente de la courbe J=f(ln(FRV)), C_c est la concentration des composes indésirables dans la couche de dépôt et C_{cs_0} est la concentration initiale des impuretés. L'extrapolation de la courbe J=f(ln(VRR)) permet de determiner le facteur de retention volumique maximal FRV_{max} (J=0).
Les cinétiques de filtration ont été modélisées à l'aide de l'équation de Ruth-Carman (Eq. 43), afin de calculer la résistance du gâteau via le paramètre αC_s et la résistance de la membrane R_m, décrivant la formation du gâteau pour une filtration à pression constante. La résistance du gâteau caractérise la résistance hydraulique formée par le gâteau qui s'oppose à la filtration. Plus sa valeur est faible, plus la filtration est rapide.

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha Cs\rho\mu}{2S^2\Delta P}V + R_m\frac{\mu}{S\Delta P} \qquad \text{Eq. II.42}$$

Avec t le temps de filtration (s), V le volume de filtrat (m^3), S la surface de filtration (m^2), αCs la résistance du gâteau (m/kg), α la résistance spécifique du gâteau (m/kg), C_s la fraction massique en composés solides du jus (%m) , μ la viscosité dynamique du perméat (Pa.s), ρ la masse volumique du perméat (kg/m^3), R_m la résistance de la membrane (m^{-1}) et ΔP la pression transmembranaire (Pa). La pente de la courbe t/V=f(V) est proportionnelle au paramètre αCs qui est un indicateur du colmatage de la membrane due à la formation de dépôts (Loginov *et al*., 2011).

Le colmatage augmente avec la pression transmembranaire. C_s étant constant, la proportionnalité du paramètre αCs avec la pression peut être décrite d'après l'équation empirique suivante :

$$\alpha C_s = \alpha_0 C_s \left(\Delta P\right)^s \qquad \text{Eq. II.43}$$

Avec α_0 et s des constantes. s est un paramètre indicateur de la compressibilité du gâteau.

La qualité du perméat est caractérisée d'après le taux de rétention des composés indésirables (protéines, colloïdes) tel que :

$$\tau\ (\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_f}\right) \times 100 \qquad \text{Eq. II.44}$$

Avec C_p et C_f respectivement la concentration des composés étudiés dans le perméat et le jus initial. Le taux de rétention est respectivement défini pour la sinigrine (τ_{SIN}), la gluconapine (τ_{GNA}), les protéines (τ_{pr}) et les colloïdes (τ_{co}).

La pureté des jus P_r (brut initial et perméat) est calculée d'après la concentration en GSL et des impuretés tel que:

$$P_r(\%) = \left(\frac{C_{GSL}}{C_{GSL} + C_{pr} + C_{co}}\right) \times 100 \qquad \text{Eq. II.45}$$

Avec C_{GSL}, C_{pr} et C_{co} respectivement la concentration totale en GSL, protéines et colloïdes.

II.6.2.2. Détermination du mécanisme de colmatage

Par ailleurs, le mécanisme de colmatage sans et avec agitation a été étudié et caractérisé à l'aide de l'Eq.46 décrivant les lois de filtration à pression constantes :

$$\frac{d^2t}{dV^2} = k'\left(\frac{dt}{dV}\right)^n \qquad \text{Eq. II.46}$$

Avec *k'* et *n* des constantes. La valeur de *n* caractérise le mécanisme de colmatage durant la filtration. La représentation logarithmique de cette équation permet de représenter les quatre modèles de colmatage dans un système unique donnant accès à la valeur du paramètre n tel que :

$$\log\left(\frac{d^2t}{dV^2}\right) + \log\left(k'\right) + n\log\left(\frac{dt}{dV}\right) \qquad \text{Eq. II.47}$$

La pente de la droite correspondante donne accès à la valeur de n. Les valeurs de n peuvent être comprises dans un intervalle de 0 à 2 tel que n = 2 correspond à un blocage complet, n = 1.5 à un blocage standard, n = 1 au blocage intermédiaire et n = 0 à un mécanisme de dépôt de surface. L'évolution de n au cours de la filtration permet de déterminer l'évolution des mécanismes de colmatage.

II.6.2.3. Régénération des membranes

La faisabilité de régénération des membranes en vue de pouvoir les réutiliser plusieurs fois a été étudiée via un nettoyage chimique des membranes colmatées à la fin de cycle de filtration. L'étude a été réalisée en utilisant la cellule de filtration Amicon décrite précédemment. La stratégie expérimentale est illustrée par la Figure II-12.

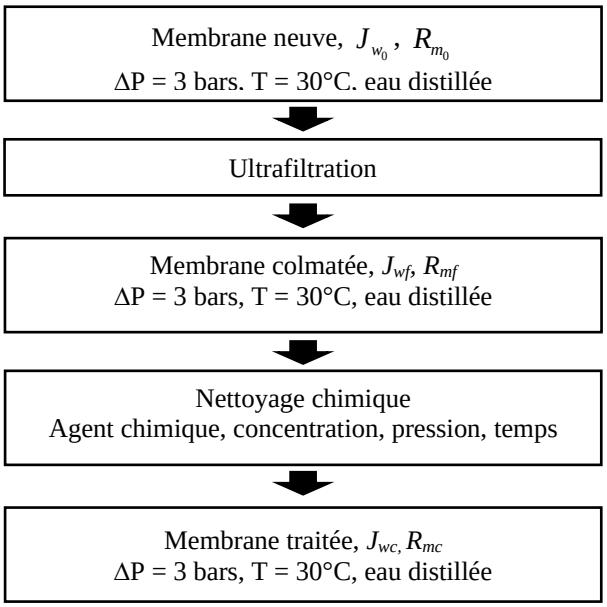


Figure II-12 – Stratégie expérimentale pour le nettoyage chimique des membranes PES via la cellule Amicon

Le flux de filtration de l'eau distillée (100 mL) sur une membrane neuve (J_{w_0}) ainsi que la résistance de la membrane (R_{m_0}) sont dans un premier temps mesurés à ΔP = 3 bars. Après l'ultrafiltration du jus, la membrane colmatée est rincée à l'eau distillée afin d'éliminer le gateau formé durant l'opération. Le flux de l'eau (J_{wf}) et la résistance de la membrane colmatée (R_{mf}) sont mesurés dans les mêmes conditions à 3 bars. L'eau distillée et 3 agents chimiques (HCl, NaCl, NaOH) ont été étudiés pour la régénération de la membrane. Les effets de la concentration de l'agent (1-5%), la pression (2-5 bars) et le volume de nettoyage (15-50 mL) ont été étudiés. Le flux de l'eau J_{wc} et la résistance R_{mc} après le traitement sont de nouveau mesurés comme précédemment.
L'efficacité de l'opération de nettoyage a été évaluée d'après la determination du taux d'élimination de la résistance de colmatage R_R et le taux de recuperation du flux initial F_R calculés d'après les équations suivantes:

$$R_R\ (\%) = \left[\frac{(R_{mf} - R_{mc})}{R_{mf}}\right] \times 100 \qquad \text{Eq. II.48}$$

$$F_R\ (\%) = \left[\frac{(J_{wc} - J_{wf})}{(J_{w_0} - J_{wf})}\right] \times 100 \qquad \text{Eq. II.49}$$

Avec R_{mf} (m^{-1}) la résistance de la membranaire supplémentaire due au colmatage calculé d'après l'équation suivante :

$$R_{mf} = \frac{\Delta P}{\mu J_{wf}} - R_{m_0} \qquad \text{Eq. II.50}$$

Et R_{mc} (m^{-1}) la résistance supplémentaire de colmatage restante après l'opération de nettoyage calculée d'après l'Eq. 51 :

$$R_{mc} = \frac{\Delta P}{\mu J_{wc}} - R_{m_0} \qquad \text{Eq. II.51}$$

Avec R_{m_0} la résistance de la membrane neuve (m^{-1}).

II.7. Analyses physico-chimiques

II.7.1. Analyse des extraits solides

II.7.1.1. Teneur en humidité

La teneur en humidité est mesurée sur les graines et le tourteau. Elle est déterminée en utilisant un dessicateur infrarouge Sartorius MA160 (GmbH and Co., Allemagne). Le séchage est effectué sur 5g de matière à 105°C jusqu'à ce que la masse soit constante.

II.7.1.2. Teneur en huile

La teneur en huile dans les grains et le tourteau a été déterminée par soxhlet selon les instructions de la norme NF EN ISO 659 (Graines oléagineuses – détermination de la teneur en huile (Méthode de référence)). Les graines sont broyées puis introduites dans des cartouches de cellulose recouvertes de coton. La cartouche est ensuite introduite dans une unité d'extraction Soxhlet (Figure II-13) qui subit plusieurs cycles de lavage par évaporation et condensation successives de l'hexane pendant plusieurs heures. L'huile migre dans le solvant au cours des différents lavages. Après opération, le solvant est évaporé et ne reste alors que l'huile. Le ballon est mis à l'étuve à 95°C pendant encore plusieurs heures afin d'éliminer les dernières traces d'hexane. La teneur en huile dans l'échantillon (g/g) est déterminée d'après la relation suivante :

$$C_h = \frac{m_{ballon_f} - m_{ballon_i}}{m_g} \qquad \text{Eq. II.52}$$

Avec $m_{balloni}$ et $m_{ballonf}$ respectivement les masses du ballon avant et après l'extraction de l'huile et évaporation du solvant (g), et m_g la masse de graines utilisée (g).

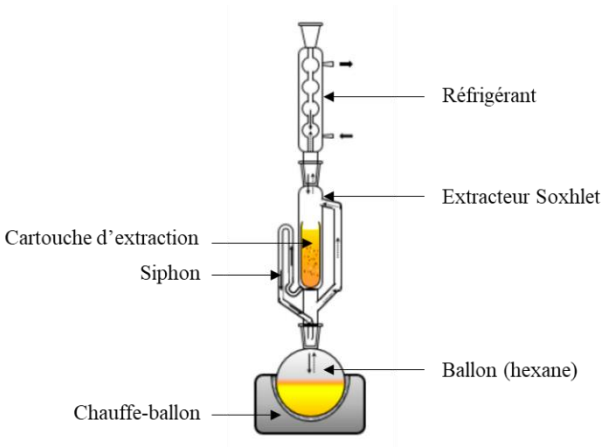


Figure II-13 – Schéma expérimental d'extraction de l'huile par l'hexane (Soxhlet)

II.7.1.3. Teneur en glucosinolates

La teneur des GSL dans les graines et dans le tourteau a été déterminée d'après la procédure mise en avant par Whatelet *et al*. (2004), adaptée de la norme NF EN ISO 9167-1 (Graines de colza – Dosage des glucosinolates – Partie 1 : méthode par chromatographie liquide à haute performance). L'extraction des GSL est effectuée avec une solution méthanol/eau (70/30 v:v) à 75°C à partir de 200 mg de matière broyée. L'échantillon est porté préalablement à 75°C pendant 1 min. 2 mL d'une solution de méthanol sont ajoutés. Immédiatement 400 µL d'une solution de GTL à 20 mM sont ajoutés et mélangés. L'ensemble est porté à 70°C pendant 5 min. L'extrait est refroidi à température ambiante, centrifugé à 5000 rpm pendant 5 min et le surnageant est récupéré. Le culot résiduel est sujet à une seconde extraction dans les mêmes conditions. Les surnageants sont finalement rassemblés et ajustés à 5 mL avec de l'eau distillée. L'échantillon est filtré à travers un filtre 0.45 µm et mis à 4°C jusqu'à analyse HPLC (Figure II-14).

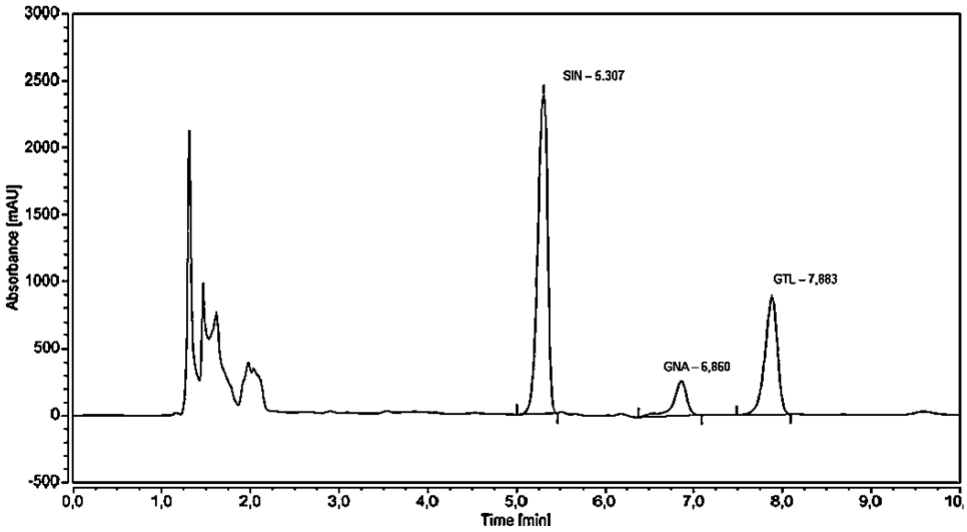


Figure II-14 – Chromatogramme HPLC (229 nm) d'un extrait de B. juncea d'après la procédure de Whatelet *et al*. en utilisant la GTL comme standard interne. Les temps de rétention de la SIN, GNA et GTL sont respectivement 5.3, 6.9 et 7.9 min.

II.7.1.4. Teneur en protéines

La teneur en protéines des graines et du tourteau a été réalisée d'après la méthode Kjeldhal selon la norme NF EN ISO 5983-2 (Aliments des animaux – Dosage de l'azote et calcul de la teneur en protéines brutes). Les teneurs en protéines des lots provenant des récoltes 2016 et 2017 ont été respectivement évalués à 25.98 et 28.09 %/MS. La teneur en protéines des graines après traitement et du tourteau après intensification de l'extraction des GSL est étudiée afin de vérifier la conservation de la qualité protéique de la matière.

II.7.1.5. Caractérisation infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectres FTIR des résines macroporeuses d'échange d'ions ont été enregistrés à partir de la résine originale, après adsorption et après désorption entre 400 et 4000 cm^{-1} via le spectrophotomètre à transformée de Fourier. Les échantillons sont préparés sous forme de disques pressés à partir d'un mélange de la résine et de pastilles de KBr réduites en poudre. Les spectres sont obtenus via la moyenne des données de 16 scans successifs. Les groupes fonctionnels des résines ont été caractérisés. Le standard de sinigrin (sinigrine monohydrate) a également été analysée et les différents spectres comparés pour constater la présence des glucosinolates sur la résine.

II.7.2. Analyses des extraits liquides

II.7.2.1. Mesure du pH

Le pH des solutions a été mesuré à l'aide d'un pH-mètre (Consort C5010, Fischer Scientific, France).

II.7.2.2. Coloration du jus

La coloration a été caractérisée en mesurant la densité optique de l'échantillon à 420 nm. Ce paramètre a été utilisé pour étudier la qualité du jus brut post extraction et après ultrafiltration. Les extraits sont préalablement filtrés avant analyse à travers un filtre 0.45 µm et son absorbance mesurée via un spectrophotomètre UV/Vis UV-6300 PC (VWR, France).

II.7.2.3. Quantification des glucosinolates

La mesure de la teneur en glucosinolates dans les extraits liquides a été réalisée par chromatographie liquide de haute performance (HPLC) en phase inverse par appariement d'ions. Les analyses ont été effectuées sur l'équipement Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series équipé d'un détecteur à barrettes de diodes (DAD-3000 RS and MWD-3000 RS). Une colonne C18 (Prontosil 250 x 4,6 mm 5.0 µM) est utilisée pour les analyses. La phase mobile consiste en une solution d'acetonitrile/eau en proportion 45% (v:v), du dihydrogénophosphate de sodium NaH_2PO_4 à 10 mM et du tetraheptylammonium bromide THABr en contre-ion à 5 mM. La solution est conditionnée à un pH 7.0 an ajoutant quelques gouttes d'une solution de soude à 1 M.

Les conditions d'élution sont les suivantes :

- Débit de la phase mobile (ACN 45%) : 1.5 mL/min
- Longueur d'onde de la diode UV de détection : 229 nm
- Température de la colonne : 35°C
- Volume d'injection : 20 µL
- Elution en mode isocratique

Le dosage de GSL a été réalisé par deux méthodes : étalonnage externe et étalonnage interne. L'étalonnage externe a été réalisé pour la sinigrine en utilisant de la sinigrine commerciale monohydrate (Sigma Aldrich, France et Carlroth, Pologne) de 0.1 mM à 4 mM.

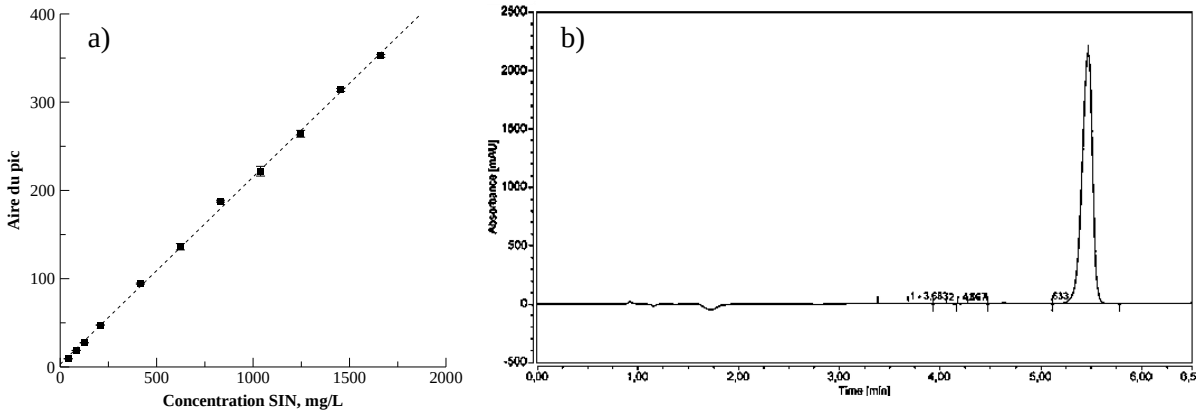


Figure II-15 – a) Courbe d'étalonnage externe HPLC de la sinigrine (standard), b) chromatogramme HPLC de la sinigrine monohydrate utilisée comme standard avec un temps d'élution de 5.3 min.

La concentration de la sinigrine par étalonnage externe est exprimée d'après la relation suivante :

$$C_{SIN} = \frac{A_{SIN} \times V_{extrait}}{0.2162 \times m_g \times M_{SIN}} \times \frac{100}{100 - H} \times 10^6 \qquad \text{Eq. II.53}$$

Avec C_{SIN} la concentration en sinigrine (µmol/g MS) A_{SIN} l'aire du pic de la sinigrine renvoyée, $V_{extrait}$ le volume de l'extrait analysé (mL), m_g la masse de matière (mg), M_{SIN} la masse molaire de la sinigrine (mg/mol) et H la teneur en humidité de la matière.

L'étalonnage interne quant à lui a été réalisé en utilisant la glucotropeoalin (GTL) (laboratoire Ardon, Terres Inovia, France) pour déterminer la concentration totale en glucosinolates dans les extraits. La concentration en glucosinolates est déterminée de la manière suivante :

$$C_{GSL} = \frac{A_{GSL}}{A_{GTL}} \times \frac{n_{GTL}}{m_g} \times k_{GSL} \times \frac{100}{100 - H} \times 10^6 \qquad \text{Eq. II.54}$$

Avec A_{GSL} l'aire du pic HPLC du glucosinolate correspondant, A_{GTL} l'aire du pic de la GTL, n_{GTL} la quantité de GTL ajouté à l'extrait pour l'analyse (mol) et k_{GSL} le facteur de rétention spécifique du GSL (k_{SIN} = 1.0, k_{GNA} = 1.11 par convention). La concentration est exprimée en µmol/g MS.

Les deux méthodes seront comparées par rapport à la teneur en sinigrine mesurée et la teneur théorique en sinigrine dans les graines avancée par le fournisseur (100 µmol/g MS).

II.7.2.4. Quantification en protéines

La concentration en protéines dans le jus (mg/L ou mg/g solutés) a été déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Il s'agit d'un dosage colorimétrique qui repose sur le changement de couleur du bleu de Coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques des protéines (complexation). Le changement de couleur de la solution est proportionnel à la quantité de colorant lié et donc à la concentration en protéines dans l'échantillon. Un volume de 100 µL du jus (dilué ou non) et 1 mL de réactif de Bradford (VWR, Strasbourg, France) ont été mélangés. Les échantillons sont maintenus 10 min à l'obscurité et à température ambiante avant analyse. L'absorbance des échantillons est mesurée à 595 nm contre un blanc via un spectrophotomètre UV/Vis UV-6300 PC. Une courbe de calibration a été construite en utilisant l'albumine de sérum bovine (BSA) comme standard (Figure II-16).

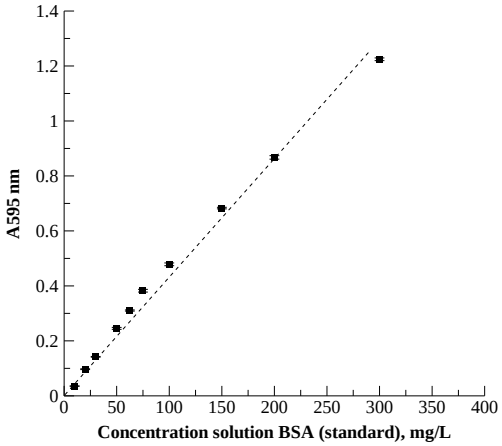


Figure II-16 - Courbe d'étalonnage de l'albumine de sérum bovine pour le dosage des protéines

II.7.2.5. Quantification des colloïdes

La concentration totale des colloïdes dans le jus a été déterminée par précipitation dans l'éthanol selon la méthode de Cherniavskaia (Cherniavskaia *et al.*, 1995). 5 mL de jus sont mélangés dans un ballon en verre avec 50 mL d'une solution d'éthanol à 96% et porté à reflux durant 15 min. La solution est ensuite refroidie à température ambiante et le précipité obtenu est filtré via un filtre papier sans cendres. Le filtre est finalement lavé avec 100 mL d'une solution d'éthanol à 90% et mis à l'étuve jusqu'à séchage complet. La concentration en colloïdes dans l'extrait est déterminée d'après la relation suivante :

$$C_{co} = \frac{m_f - m_0}{0.005} \qquad \text{Eq. II.55}$$

Avec C_{co} la concentration en colloïdes (mg/L), m_f la masse du système filtre+précipité après séchage (mg) et m_0 la masse du filtre (mg).

II.8. Analyse statistique des résultats

Les expériences réalisées ont été répétées au minimum trois fois. Les moyennes et les écarts types ont été calculés. Ces derniers sont représentés sur les graphiques par les barres d'erreurs. L'intervalle de confiance de mesure a été fixé à 5%. Les courbes expérimentales ont été modélisées à l'aide du logiciel Table Curve (2D windows version 5.01).

CHAPITRE 3

Résultats et discussions

III.1. Inactivation de la myrosinase de *B. juncea* par différents traitements thermiques et hydrostatiques

III.1.1. Résumé de l'article

Cet article a pour objectif d'inactiver la myrosinase des graines de moutarde afin d'empêcher la production des composés de dégradation des glucosinolates par hydrolyse enzymatique lors du processus de trituration des graines et d'extraire à partir du tourteau déshuilé les glucosinolates dans leur forme intacte. La revue bibliographique a montré que la sensibilité thermique de la myrosinase dépend étroitement du végétal dont elle est issue. Dans cet article, l'inactivation de l'enzyme a été étudiée par voie thermique via un chauffage conventionnel par incubation dans un bain-marie, un chauffage par micro-ondes et un traitement par CO_2 supercritique. Ce denier est proposé en général comme alternative aux procédés thermiques conventionnels et également mis en avant pour sa capacité d'inactivation de microorganismes. La plupart des études apportent généralement des données qualitatives sur l'inactivation de l'enzyme en solution (brute ou partiellement purifiée) ou sur une matière première conditionnée à des taux d'humidité élevés ou en présence d'eau afin d'accélérer l'inactivation, mais favorisant également l'hydrolyse des glucosinolates au cours du traitement du fait de l'endommagement des parois cellulaires avec l'augmentation de la température. Par ailleurs les études portant sur les micro-ondes mettent en avant la puissance de traitement ou le couple puissance/temps d'exposition sans s'intéresser à la température de la matière qui pourrait expliquer la meilleure inactivation de l'enzyme ou la dégradation thermique des glucosinolates à puissance élevée.

Dans le cadre de cette étude, la stabilité thermique de l'enzyme en solution a dans un premier temps été étudiée afin de définir ultérieurement une plage de température de traitement pour les graines.

L'activité de l'enzyme a été mesurée de façon indirecte via la dégradation au cours du temps de la sinigrine utilisée comme substrat avec la myrosinase. La réaction d'hydrolyse menée à différentes température a montré que l'activité de l'enzyme augmentait de 20 à 40°C mais diminuait à partir de 50°C, permettant ainsi de définir une activité maximale de référence pour les essais d'inactivation. Des traitements de 10 min sur extraits entre 20 et 80°C ont montré que l'enzyme était instable à partir de 50°C et fortement dénaturée à partir de 70°C, avec une inactivation totale à partir de 75°C. Les cinétiques d'inactivation de l'enzyme ont été étudiés entre 60°C et 75°C et quatre modèles ont été appliqués afin de comprendre le mécanisme d'inactivation. Le modèle biphasique basé sur l'existence de deux formes distinctes et indépendantes de l'enzyme, l'une thermostable et l'autre thermolabile, et le modèle des étapes successives, qui suppose la transformation préliminaire de l'enzyme en une forme intermédiaire avant son inactivation, ont été retenus pour décrire l'inactivation de l'enzyme isolée.

Le traitement des graines a été porté entre 70 et 90°C. Contrairement aux essais réalisés sur les extraits enzymatiques, un traitement de 70 min à 80°C, ou 40 min à 90°C, a été nécessaire pour atteindre une quasi-totale inactivation. Les modèles précédents ne s'appliquent pas lorsque l'inactivation est réalisée à partir du tissue intact et renvoient des constantes cinétiques similaires à celles du modèle de 1er ordre. Ce dernier a présenté d'ailleurs une meilleure corrélation avec les données expérimentales par rapport à l'inactivation sur l'enzyme isolée. La plus grande stabilité de l'enzyme dans les graines par rapport à l'enzyme isolée peut être expliquée par un effet d'exclusion volumique, qui rent plus difficile un changement de conformation de l'enzyme susceptible de diminuer son activité.

Le chauffage micro-ondes à 75W (3W/g) s'est révélé similaire à la cuisson à 80°C. Dans ces conditions, les glucosinolates et les protéines des graines ont été totalement conservés. Les essais ultérieurs de pressage pour extraire l'huile ont montré que les glucosinolates étaient retrouvés intacts dans le tourteau. Une dégradation des glucosinolates a été en revanche observée lorsque la température de traitement excède 100°C, avec une thermosensibilité plus importante de la gluconapine par rapport à la sinigrine.
Le traitement au SC-CO_2 a montré que la myrosinase était également sensible à l'augmentation de la pression et que le couple pression/température présente un effet synergique sur l'activité résiduelle. Cependant la myrosinase s'est révélée particulièrement difficile à inactiver en conditions supercritiques malgré des longs temps d'exposition avec une activité résiduelle de 28.5% après 7h à 68°C, 67.5 MPa.

L'inactivation de la myrosinase via une cuisson à 80°C serait intéressante pour les triturateurs qui appliquent généralement une cuisson de 90°C pendant 30 min comme prétraitement afin d'améliorer l'extractibilité de l'huile durant le pressage. L'étape de cuisson serait ainsi efficace pour inactiver l'enzyme sans ajouter d'opération subsidiaire au processus conventionnel de trituration.

III.1.2. Article

Intrinsic inactivation of myrosinase in mustard seeds using conventional heating, microwaves irradiation and supercritical CO_2

Mathieu HEBERT, Houcine MHEMDI and Eugene VOROBIEV

Abstract

Myrosinase, (ß-thioglucosidase, EC. 3.2.1.147) is an enzyme inducing glucosinolates hydrolysis in all seeds belonging to the botanical family Brassicaceae. In order to avoid GSL degradation, myrosinase should be inactivated before seeds processing. Most of the works available in the literature have studied the inactivation of the enzyme after its extraction. In the case of oil seeds, this inactivation mode is not suitable and the enzyme sould be inactivated directly in the seeds. This work was aimed to perform the intrinsec inactivation of myrosinase in mustard seeds using different treatments: conventional heating (CH), a targeted microwave irradiation heating (MW) heating and supercritical CO_2 treatment (SC-CO_2). Inactivation kinetics modelling showed the biphasic and the consecutive models give the best fitting of the experimental data explainning thus the enzyme inactivation behaviour. The inactivation of the enzyme directly in the seeds showed the the enzyme is more thermally resistive as compared to the treatement of the enzyme after its extraction. For instance, heating at 70° during 10 min was enough to totally inactivate the enzyme in the crude extract wherease harder treatement (80°C during at 70 min) was necessary to inactivate the enzyme in the seeds. The difference behaviour may be attirubted to the high resistance mass transfer in the seeds as compared to to the liquid extract containing the enzyme. Optimization showed that The enzyme can be efficiently inactivated without proteins and glucosinolates degradation by CH at T= 80°C for t = 70 min or meaning MW treatment at 3W/g. MW irradiation at higher power (4-6 W/g) resulted in GSL thermal degradation provoked by the high temperature reached (T > 100°C). Combined effects of pressure (67.5 MPa) and temperature (68°C) in supercritical conditions allowed achieving 72% enzyme inactivation in seeds in 7h but significant glucosinolates degradation was also observed.

Keywords : Mustard, myrosinase, inactivation, cooking, supercritical fluid, glucosinolates

1. Introduction

Myrosinase (MYR) (*ß*-thioglucosidase, E.C. 3.2.1.147) is an endogene enzyme naturally present in glucosinolates-containing-plants, such as cabbage (white cabbage, Chinese cabbage, broccoli) Brussels sprouts, watercress, horseradish and all plants belonging to the Brassica family. Myrosinanse and glucosinolates (GSL) are stored in different cellular compartments (Fahey *et al.*, 2001; Bones and Rossiter, 2006) but when the plant tissue is damaged, GSL are hydrolyzed by the myrosinase to liberate a wide variety of products such as isothiocyanathes, thiocyanathes and nitriles depending on the structure of the molecule and the reaction conditions (Rask *et al.*, 2000 ; Fahey *et al.*, 2001 ; Grubb and Abel, 2006). These breakdown products present interesting antifongic, antibacterian, antioxydant and antimutagenic properties (Angus *et al.*, 1994 ; Brown *et al.*, 1996 ; Sarwar *et al.*, 1998 ; Vig *et al*., 2009 ; Díaz *et al.*, 2013 ; Sotelo *et al.*, 2015) suitable for the development of a natural phytosanitary product for crop protection and soil sanitizer culture (Larkin *et al.*, 2007; Njoroge *et al*., 2008; Friberg *et al.*, 2009).

Mustard seeds are rich in oil, proteins and GSL. Sinigrin and gluconapin are the main glucosinolates (Merah, 2015) and they are precursors of aliphatic isothiocyanates (respectively allyl and butenyl), a broad-spectrum natural pesticide. Unfortunately, these breakdown products are volatiles and cannot be recovered and used directly in biofumugation. In this context, the GSL should be extracted from seeds in their native form and contacted with the enzyme directly in the soil to release highly reactive isothiocyanates. Main operations occuring during seeds processing (grinding, flaking, pressing) may cause GSL hydrolysis to liberate the breakdown compounds in the defatted seed meal. Because their negative impact on animal growth, fertility and performances, theses compounds are considered as toxic and antinutritional factors (Fenwick *et al*, 1983; Mawson *et al*., 1994a,b; Fahey *et al*., 2001; Bellostas *et al*., 2007). Their presence blocks the use of meal for animal feeding, despite its richness in protein of high quality. In these conditions, MYR should be inactivated before seeds processing to avoid GSL hydrolysis in the meal and keep the possibility to extract them in their intact form.

Thermal inactivation of myrosinase was already investigated in many *Brassica* species, especially for broccoli (Ludikhuyze *et al*., 1999 ; Van Eylen *et al*., 2008 ; Oliviero *et al*., 2014). It was shown that the thermal stability of myrosinase depends on the species (Ghawi *et al*., 2012): myrosinase of broccoli is thermically the least stable (stable up to 30°C) as compared to that of rapeseed (stable until 65°C). Okunade *et al.* (2015) showed that myrosinase extracted from brown mustard is sensitive to heating at 60°C for 10 min of treatment. It was shown that the enzyme activity drastically decreases at 70°C and fully disappaers beyond 80°C. In addition, it was shown that enzyme inactivation efficiency is strongly dependening on the moisture content (Maheswari *et al*., 1980; Dunford and Temelli, 1996; Owusu-Ansah and Marianchuk, 2011; Oliviero *et al*., 2014). For example, Owusu-Ansah and Marianchuk (1991) studied the inactivation of the myrosinase contained in canola seeds by microwaves at 1500 W. They observed that the treatement time needed to totally inactivate the enzyme decreases from 485 to 350 s by increasing the moisture content from 6 to 18%. However, it was also observed that high moisture content enhances GSL hydrolysis during the treatment (Maheswari *et al*., 1980 ; Owusu-Ansah and Marianchuk, 2011).

More recently, non-thermal processes are paying attention in relevant industries and supercritical CO_2 (SC-CO_2) treatment could be an efficient alternative method for enzyme inactivation at relatively moderate pressure and temperature (Wimmer *et al.*, 2010).

The literature review showed that most of works related the the inactivation of myrosinase focused on the treatment of crude enzyme after its extraction from the plant tissue. This process is not suitable for an industrial implementation where it is more practical to avoid enzyme extraction by inactivating it directly inside the seeds. In fact during enzyme extraction, proteins or GSL are co-extracted, and GSL enzymatic breakdown may occur before myrosinase effective inactivation. The intrinsic inactivation of myrosinase in the seeds was not yet studied and should now be explored and optimized.

The aim of this study was to investigate the intrinsic thermal inactivation of MYR in the seeds of *B. juncea (brown mustard)* by conventional heating (incubation in hot water bath) and a targeted MW irradiation heating. Inactivation meaning SC-CO_2 treatment was also tested as alternative non-thermal inactivation method instead of thermal processes. For this purpose, thermal stability of crude enzyme extracts and enzyme behaviour were also preliminarly investigated. Then, the enzyme inactivation was studied inside seeds at different operating conditions (temperature, MW power, pressure) using conventional heating, MW inactivation and supercritical CO_2. The efficiency of inactivation was evaluated by measuring the myrosinase activity towards sinigrin hydrolysis before and after inactivation. The energy consumption and the impact of the treatment on the quality of GSL and proteins were considered for comparison. The inactivation kinectics were modeled using different models in order to better elucidate the enzyme inactivation behavior.

II. Material and Methods

II.1. Raw materiel

Brown mustard seeds (*B. juncea*) were provided by Chambre d'Agriculture Côte d'Or (Bretenière, France) from the Etamine variety, 2016 harvest. Moisture of seeds has been determined using infrared dessicator and estimated at 6.4%. According to the supplier, oil, proteins and glucosinolates content were respectively 33.7%, 29.6% and 100 µmol/g DM of sinigrin. These values were confirmed by our own analyses.

II.2. Chemical and reagents

Sinigrin monohydrate was purchased on Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Carlroth (Poland). Glucotropeoalin was provided by Terres Inovia (Ardon laboratory, France). Methanol, acetonitrile, tetraheptylammonium bromide, sodium phosphate monobasic anhydrous were obtained from Fischer Scientific (Illkirch, France). Phosphate buffer solution pH 7.0 was supplied by Sigma Aldrich.

II.3. Determination of myrosinase activity

The enzyme activity *A* was measured based on the kinetics of hydrolysis of sinigrin as substrate. Briefly, the enzyme was first extracted in distilled water in 10-fold excess (w:w) from grinded seeds. The mix (solvent +seeds) was stirred with vortex and then incubated in a bath water at 30°C for one hour under stirring. The solution was then centrifugated and the supernatent was filtered through a PTFE 0.45 µm membran filter. A fixed volume V of this crude enzyme extract was conditioned at pH 7.0 and added to 400 µL of monohydrate sinigrin solution of 5 mM (C_i) to follow the hydrolysis kinetic. Hydrolysis reaction was operated for 60 min and stopped by adding a methanol solution (70%) at 75°C. The hydrolysis reaction was performed at different enzyme volumes (0.1-1.75 mL) and various temperatures

(20-50°C). At the end of hydrolysis, samples were kept at 70°C for 10 min and then cooled in an ice-bath. Extracts were then filtered (0.45 µm) and analysed by high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the residual sinigrin concentration at the end of hydrolysis (C_f). The enzyme activity A was defined as the amount (µmol) of sinigrin hydrolyzed per minute at pH 7.0 and 40°C such as:

$$A(\mu mol / \min) = \frac{C_i - C_f}{t} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Where C_i and C_f are respectively the initial and final concentration of sinigrin after hydrolysis time t. Myrosinase behaviour was caracterized according to Michaelis kinetics model. Specific enzyme kinetics parameters K_M and A_{max} were estimated using the mathematical representation of Lineweaver and Burk (Lineweaver and Burk, 1934). The model was adapted to our experiments as the enzyme concentration has been varied instead of the concentration of substrate (sinigrin) and the equation was described as follow (Eq. 2):

$$\frac{1}{A} = \frac{K_M}{A_{\max}} \times \frac{1}{V} + \frac{1}{A_{\max}} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

With V is the volume of enzyme extract, A_{max} is the maximal enzyme activity and K_M is the the enzyme volume when A= $A_{max}/2$.

II.4. Myrosinase inactivation

Three processes were tested in this work for myrosinase inactivation: conventional heating (CH), microwave irradiation heating (MW) and supercritical CO_2 (SC-CO_2) incativation.

II.4.1. Conventional heating

Conventional heating was conducted in water bath Julabo SW22. The thermal stability of myrosinase from crude extracts was first studied under isothermal conditions by placing 1 mL of sample in water bath and heated at different time intervals at various constant temperatures (20-80°C). For seeds treatment, 25 g of seeds were packaged in a sealed propylene tube and incubated in the water bath. The impact of temperature (70°C, 80° and 90°C) and time were studied. At the end of treatement, the samples were immediately cooled using an ice water to stop the heating effect and stored at 4°C. Treated and untreated seeds were analyzed to determine their GSL content, protein content and the residual myrosinase activity. The enzyme was extracted from the treated seeds and its activity (A_t) was mesasured meaning the follow of the sinigrin hydrolysis kinetic as previsouly described at 40°C and 800 µL of myrosinase extract. The same procedure was done with untreated seeds to determine the reference initial activity of the enzyme (A_0) before inactivation. The residual activity index (Eq. 3) of the enzyme after treatement was defined as follow:

$$residual\ activity = \frac{A_t}{A_0} \qquad \text{(Eq. 3)}$$

The residual activity values are included between 1 (intact enzyme) and 0 (totally inactivated). Glucosinolates content in the seeds was determined after treatment. Residual GSL content was evaluated such as:

$$residual\ content = \frac{C_t}{C_0} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

Where C_0 and C_t are respectively the initial and after treatment content of glucosinolates in seeds. The kinetic of glucosinolates degradation was modeled using the first-order model (Eq. 5) to estimate the degradation rates k_d (min^{-1}):

$$C_t = C_0 \exp^{-k_d t} \qquad \text{(Eq. 5)}$$

The specific energy consumption E_{BW} (kJ/kg) of the treatement was estimated using Eq 6 :

$$E_{BW} = \frac{P_{BW} \times t}{m} \qquad \text{(Eq. 6)}$$

Where P_{BW} (W) is the power of bath-water, t (s) the treatment time and m (kg) is the mass of seeds

II.4.2. Microwave treatment

The experiments were carried out using a Milestone micro-wave generator (NEOS-Gravity Station 2.45 GHz, Shelton, USA) with a maximum input power of 900W. The apparatus is equipped with an infrared temperature sensor for monitoring product surface temperature. Seeds (25g) were introduced in a 50 mL glass-beaker and placed in the center of the treatement chamber (without water adding). Experiments were carried out at various input powers (3-6 W/g) and exposure time (1.5-90 min). The microwave power was set at the desired power and maintained at the atmospheric pressure until the treatment time was elapsed. Temperature in the bulk of seeds was directly measured after microwave treatment and seeds were immediately cooled using ice water. The specific energy E_{MW} (kJ/kg) induced by microwave heating was calculated as follows:

$$E_{MW} = \frac{P_{MW} \times t_{MW}}{m} \qquad \text{(Eq. 7)}$$

Where P_{MW} is the power immited by microwave device (W) and t_{MW} is the exposure time.
The effective power received by the sample P_{eff} (W) was calculated by the following equation :

$$P_{eff} = P_{MW} \times Y_{MW} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

$$Y_{MW} = \frac{mC_{p,s}(T_f - T_i)}{P_{MW} \times t} \qquad \text{(Eq. 9)}$$

Where Y_{MW} is the yield of microwave, T_f is the final temperature, T_i is the initial seeds temperature, $C_{p,s}$ is the specific heat of seeds (2.139 J/kg/K) and t is time to increase seeds temperature from T_i to T_f.

II.4.3. SC-CO_2 treatment

Laboratory-scale supercritical fluid equipment SFE 200 mL (Extratex, Neuves-Maisons, France) was used in this study. The treatement chamber (200 mL, up to 70 MPa) was filled with 25 g of mustard seeds for each experiment. When the treatement temperature was reached, carbon dioxyde was injected at 0.2 g/min and compressed to the desired pressure and then kept constant during the treatment. Experiments were carried out at different pressures (20-67.5 MPa) and temperatures (36-68°C) for 5 h. The influence of the exposure time was also studed from 1 to 7 h at constant pressure (67.5 MPa) and temperature (68°C). Treated seeds were cooled and used to determine the residual enzyme activity as previoulsy described. The energy of the process E_{CO2} (kJ/kg) was estimated by adding the energy consumed for gas heating and compression (Eq. 10).

$$E_{CO2} = \frac{\rho V C_{p,CO_2} \Delta T + P_i V \times \ln\left(\frac{P_f}{P_i}\right)}{m} \qquad \text{(Eq. 10)}$$

Where ρ is the density of CO_2 (kg/m^3), V is the volume of the treatment chamber (m^3), C_{p,CO_2} is the specific heat of CO_2, P_f and P_i (Pa) are respectively the pressure of treatment and the pressure of CO_2 reserve. m is the mass of the treated seeds.

II.5. Inactivation kinetics modelling

To better understand the myrosinase inactivation behavior, the experimental data were fitted with four models. Theses models are presented in Table 1.

Generally, the decrease of the enzyme activity A_t versus the inactivation time can be described by a simple first order kinetics model (Eq. 11) where k is the reaction rate (min^{-1}). According to this model, the native enzyme (N) is directly converted to the inactivated form (I).

The literature review showed that others models equations can be used to describe the thermal inactivation of enzymes (Ludikhuyze *et al*., 1999; Van Eylen *et al*., 2006; Van Eylen *et al*., 2008). The fractional model (Eq. 12) is similar to the first-order inactivation process but it suggests that the inactivation cannot be total because of the existence of a resistant enzyme fraction (RF) that is not thermally sensitive. In this model, A_{rf} represents the enzyme activity of the resistant fraction. The native enzyme (N) is denatured (I) but the resistant fraction (RF) is still present after treatment.

The biphasic model (or isoenzyme) (Eq. 13) is more complex because it supposes that the enzyme exists into two independant iso-forms: a thermolabile (N_L) fraction and a thermostable (N_S) one. According to this model, both forms follow a first order kinetic inactivation model. A_L and A_S represent the activity of the labile form and the stable form respectively. k_L and k_S are the inactivation rate constants (min^{-1}) to obtain respectively I_L and I_S (the denatured forms of the labile and the stable fraction respectively).

The consecutive step model (Eq. 14) is most complex because it supposes that the inactivation occurs in two successive irreversible steps. In the first step, the native form of the enzyme (N) is converted to an intermediate form (U). In the second step, the intermediate product is denaturated to form the inactive form (I). Therefore, A_1 and A_2 (Eq. 14) are respectively the enzyme activity of the native form (N) and

the intermediate form (*U*); k_1 and k_2 are respectively the inactivation rate constants to obtain *U* and *I* (min^{-1}).

Experimantal data were fitted with these models and the kinetics constants were estimated using non-linear regression analysis. The energy of activation for each model was determined by using the Arrhenius equation by plotting ln (*k*) versus reciprocal temperature (1/T).

Table 1 – Kinetics equations used for modelling myrosinase inactivation kinetics

Model	Mathematical expression	
First order		
$N \xrightarrow{k} I$	$A_t = A_0 \exp(-kt)$	(Eq. 11)
Fractional conversion		
$N + RF \xrightarrow{k} I + RF$	$A_t = A_{rf} + (A_0 - A_{rf}) \exp(-kt)$	(Eq. 12)
Biphasic (distinct isoenzyme)		
$N_L \xrightarrow{k_L} I_L$	$A_t = A_L \exp(-k_L t) + A_S \exp(-k_S t)$	(Eq. 13)
$N_S \xrightarrow{k_S} I_S$		
Consecutive step		
$N \xrightarrow{k_1} U \xrightarrow{k_2} I$	$A_t = \left[A_1 - A_2 \left(\frac{k_1}{k_1 - k_2} \right) \right] \exp(-k_1 t) + \left[A_2 \left(\frac{k_1}{k_1 - k_2} \right) \right] \exp(-k_2 t)$	(Eq. 14)

II.6. Analysis

II.6.1. Extraction and quantification of glucosinolates

The GSL content in mustard seeds was determined according to the procedure of Whatelet *et al.* (2004), adapted from the standard ISO 9167-1 (1992). GSL extraction is carried out by using a methanol-water solution (70:30) at 75°C. 200 mg of mustard powder are used as freeze dried sample. The sample is introduced in a 15 mL polypropylene tube and preliminarly incubated at 75°C for one minute. The extraction is ruled by stirring 2 mL of methanol solution for 5 min. Immediately, 400 µL of a 20mM glucotropeoalin (GTL) solution is added. The extract is left to cool, centrifuged at 5000 rpm for 5 min and recovered. The residue is subject to a second extraction as previously. The supernatants are collected and ajusted at 5 mL with water. A external calibration for sinigrin using standard monohydrate sinigrin was also used for determination of concentration of sinigrin hydrolyzed for myrosinase activity essay. The calibration curve was built from solutions of sinigrin from 0.1 mM to 3,5 mM. Both methods (external and internal method) are compared to check the sinigrin content in seeds indicated by the supplier.

The determination of GSL was carried out by reversed phase ion-pair liquid chromatography. HPLC experiments were performed on a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series equipped with Diode Array Detectors (DAD-3000 RS and MWD-3000 RS). A C18 column (Prontosil 250 x 4,6 mm 5.0 µM) was used for the analyses. Mobile phase consists in a acetonitrile-water solution (45%) with NaH_2PO_4 at 10 mM and THABr as counterion at 5 mM conditioned at pH 7.0. Analyses are performed with the following conditions: mobile phase flow rate of 1,5 mL/min, UV wavelength of 229 nm, column temperature of 35°C. 20 µL are injected in the chromatograph, the elution is carried out in isocratic mode.

II.6.2. Protein content

Protein content in untreated and treated seeds was determined using the Kjeldahl method (ISO 5983-2:2009).

II.6.3. Oil content

Oil content from seeds was determined by hexane extraction according to international standard ISO 659:2009.

II.7. Statistical analysis

All experiments were repeated in triplicate. Averages of the data and their standard deviations were calculated and presented in figures as error bars. Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant. Regression coefficient of experimental data fitted with the models was evaluated using the software Table Curve (2D 5.01 versinon).

III. Results and discussion

III.1. Seeds composition

Seeds composition is presented in Table **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**2. As reported in the l itterature (Merah, 2015), sinigrin and gluconapin are the major GSL present in mustard seeds with sinigrin in highest concentration. Results are coherent with those reported by the supplier of seeds. The seeds are also rich in oil suitable for oleochemistry and proteins for animal feeding.

Table 2 – Glucosinolates and proteins content in *B. juncea* seeds

Oil (%)	C_{SIN} (µmol/g DM)	C_{GNA} (µmol/g DM)	Proteins (%)
33.8 ± 0.3	102.03 ± 2.63 (**100**)*	13,18 ± 0.30	25.98±0.09 (**29.6**)

**Bold values are supplier claimed data*

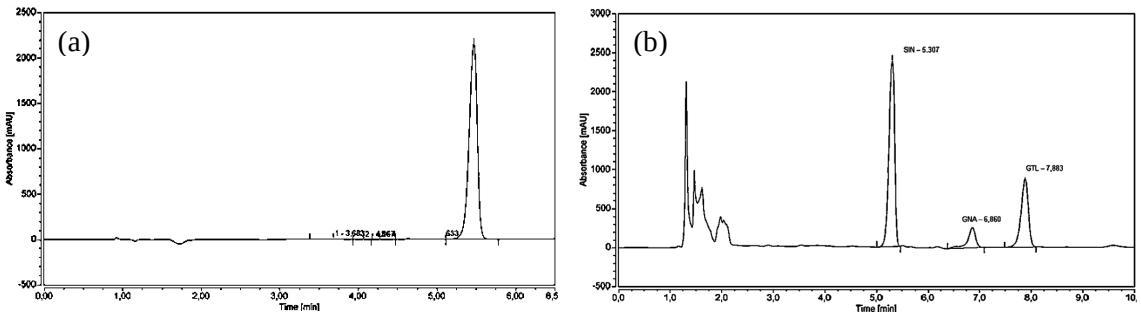


Figure 1 – HPLC chromatogram of a) standard monohydrate sinigrin b) *B. juncea* extract. UV detector operates at 229 nm. Retention times of sinigrin and gluconapine are respectively 5.3 min and 6.9 min. Retention time of GTL as internal standard is 7.9 min.

III.2. Myrosinase enzymatic behaviour

Figure 2 shows the kinetics of sinigrin hydrolysis with various volumes of crude enzyme extract. Curves show a straight linear behaviour overtime leading to myrosinase activity calculation by determining the curve slop. Results showed that the enzyme activity increases from $6.023.10^{-3}$ to $4.442.10^{-2}$ µmol/min when the enzyme volume increases from 100 to 800 µL. It can be observed that when the hydrolysis reaction occured with 800 µL of enzyme, the substract was totally consumed after about 50 min. For lower volume of enzyme, the reaction was not total and the substrate was only partially hydrolyzed even after 60 min.

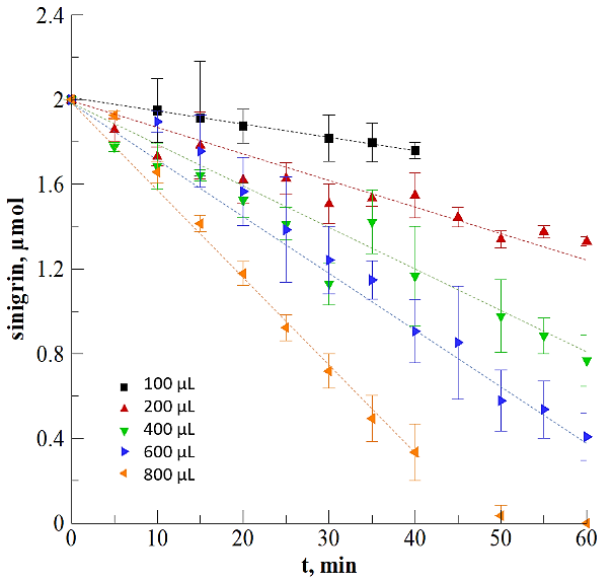


Figure 2 – Influence of volume of myrosinase crude extract from mustard seeds on sinigrin hydrolysis. Reaction was operated at 40°C, pH 7.0 with commercial monohydrate sinigrin as substrate.

The hydrolysis kinectics were modeled using Michaelis model (Eq. 2). The model fitted well and the experimental data. The values of K_M and A_{max} were respectively estimated to 1752 µL (1.75 mL) and 0.1088 µmol/min (Figure). The myrosinase activity using 1.75 mL of crude enzyme was estimated to $5.61.10^{-2}$ µmol/min, which is in accordance with the theoretical activity estimated using the Michaelis equation ($5.44.10^{-2}$ µmol/min).

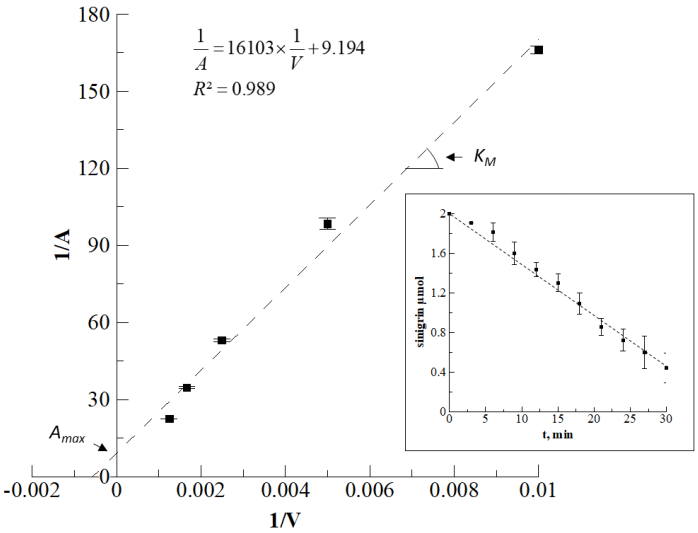


Figure 3 - Lineweaver and Burk representation of myrosinase activity : reverse activity is plotted versus reverse crude enzyme volume. Insert represents sinigrin hydrolysis using estimated K_M volume.

III.3. Extrinsic thermal inactivation of myrosinase

III.3.1. Myrosinase thermal stability

Sinigrin hydrolysis carried out at different temperatures showed that the maximal activity of the enzyme was measured at T= 40°C. In fact, and as it can be shown in Figure 4, the enzyme activity increased from $3.1.10^{-2}$ at 20 °C to $4.4.10^{-2}$ µmol/min at 40°C and it decreased to $4.0.10^{-2}$ µmol/min at 50 °C, which traduced a thermal denaturation of the enzyme from this temperature. These results are similar to those of previous studies: Bjorkman *et al*. (1973) reported that activity of myrosinases extracted from *S. alba* and *B. napus* increases in the range of 0°C-60°C but higher temperature (>60°C) causes denaturation of the enzyme. Stoin *et al*. (2009) showed that the myrosinase recovered from black mustard exhibits maximum activity between 45 and 50°C. Based on this result, the maximal activity obtained at 40°C was selected as reference for myrosinase activity essay (A_0) to estimate the enzyme residual activity after inactivation treatment. In order to check its thermal stability, the enzyme was extracted and heated at different temperatures in the range 20 - 80°C during 10 min.

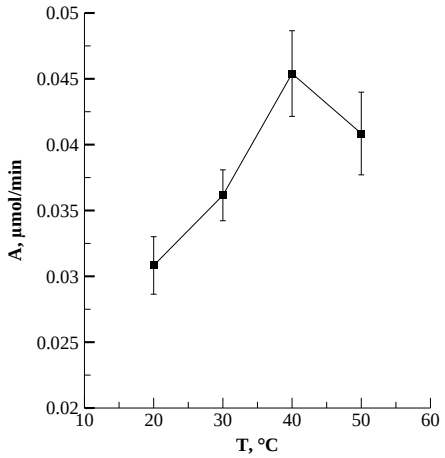


Figure 4 – Myrosinase activty in mustard juice at 20-50°C. Activity was measured using 800 µL of crude extract, pH 7.0

Data from figure 5 showed that the enzyme was thermally stable until 40°C and became sensitive beyond this temperature. It can be observed that its activity slightly decreases in the range 40-65°C and it drops for T>65°C. For instance, the residual activity was decreased from 1.0 µmol/min in the range 20-40°C to 0.85 µmol/min at 60 °C and dropped to 0.29 µmol/min at 70°C. The enzyme becomes totally inactive at T= 75°C. In a previous study, Okunade *et al.* (2015) observed that heating up at 70°C led to about 65% loss in activity (residual activity ≈ 0.35) for brown mustard myrosinase and myrosinase was fully inactivated above 80°C. This makes myrosinase contained in mustard seeds one of the most thermally resistant myrosinase in *Brassica* species.

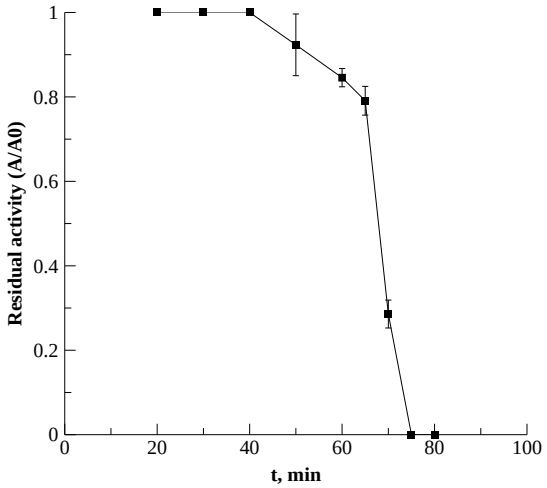


Figure 5 – Effect of a 10 min thermal exposure time at 20-80°C on relative myrosinase activity from brown mustard seeds juice.

III.3.2. Modelling myrosinase inactivation kinetics

The inactivation kinetics of *B. juncea* myrosinase at different temperatures are presented in Figure 6. It can be observed that the curve shape is very depending on the applied temperature. For instance, at T = 60-65°C, the activity decreases slowly during treatement before reaching a plateau at the end of treatment where myrosinase activity remained still highly active (0.62 after 60 min at 60°C, 0.53 after 30 min at 65°C). For higher temperature (70 and 75°C), the curves show a fast decrease of the enzyme activity before reaching a pleateau indicating an efficient inactivation of the enzyme. For example, a treatment of 6 min at 75°C was sufficient to reduce the enzyme activity by 80% (residual activity = 0.19) and the enzyme was fully inactivated after 10 min.

Literature review show that the thermal sensitivity of the myrosinase varies a lot depending on the species. For instance, Ludikhuyze *et al*. (1999) reported a 90% loss in myrosinase activity from broccoli by treating the enzyme at 60°C for 3 min while myrosinase from *S. alba* was still slightly active after 40 min at 70°C (Van Eylen *et al*., 2006).

In order to better understand the inactivation behavior occurring during thermal treatement, the experimental date were fitted with the four models previously described. The first order model is frequently used to describe enzyme inactivation (Suzuki, 1960; Ludikhuyze *et al*., 1997, 1998), even for the thermal inactivation of myrosinase from broccoli (Oliviero *et al*., 2014). However, it can be observed that the first order-model did not fit well our experimental data with low regression coefficients ($0.62<R^2<0.91$). Therefore, this model was rejected to describe the enzyme inactivation.

The fractional model provides a better correlation with experimental data compared to first order model but only at lower temperatures (T<70°C) when the inactivation is partial. For T>70°C, the model fits well data at the beginning of inactivation and it deviates at the end when we reach a plateau corresponding to the total inactivation of the enzyme. This behavior is logic because the fractional model suggests the presence of a resistant fraction still active after the inactivation of native enzyme whereas experimental date showed that the enzyme can be totally inactivated for T>70°C. It was concluded that this model is not adapted for the description of thermal inactivation of myrosinase. Consequently, the fractional conversion model was rejected.

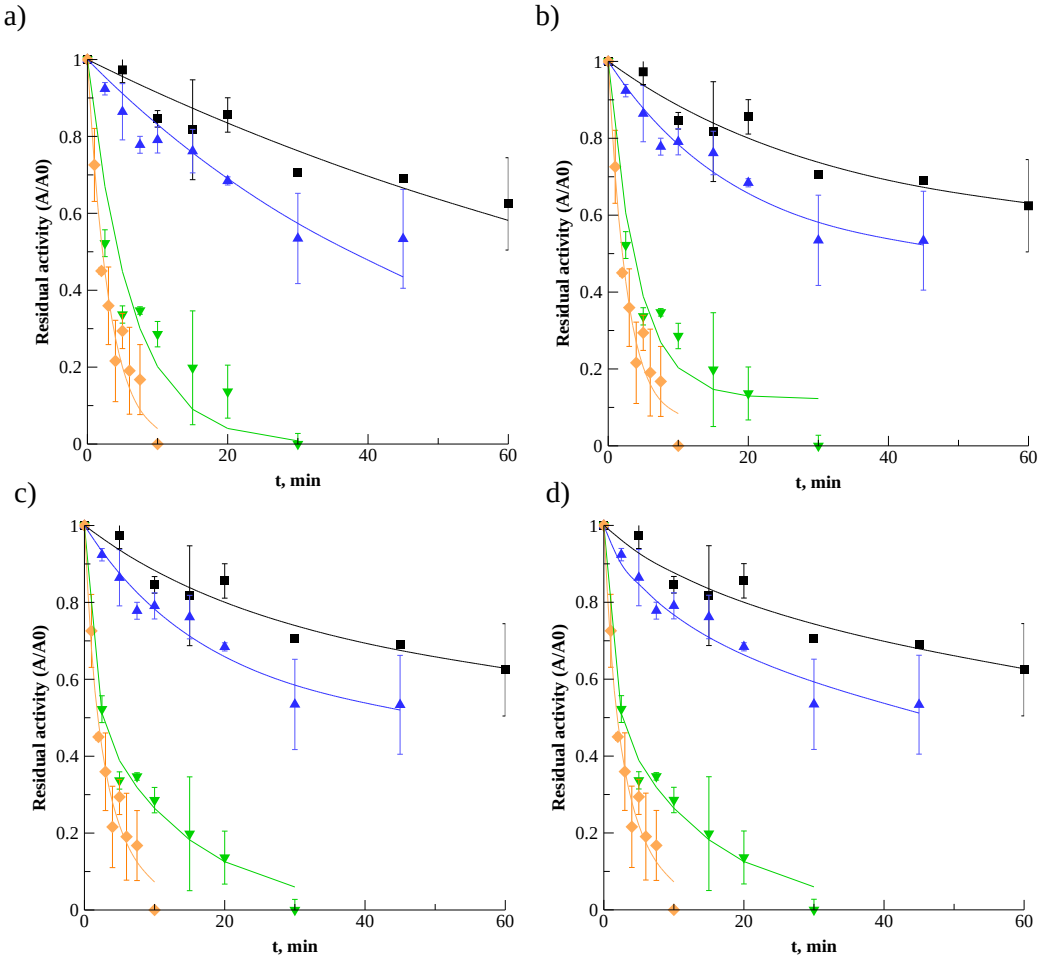


Figure 6 – Thermal inactivation of myrosinase extracted from B. juncea described by the a) first-order model b) fractional model c) biphasic model d) consecutive step model : (■) 60°C, (▲) 65°C, (▼) 70°C, (♦) 75°C.

Table 3 – Estimation of the kinetic paramaters and correlation coefficient for thermal inactivation of extracted myrosinase from *B. juncea* using the first order and fractional conversion model

	First order		*Fractional*		
T(°C)	$k.10^{-2}$ (min^{-1})	R^2	A_{rf}*	$k.10^{-2}$ (min^{-1})	R^2
60	0.90	0.835	55.9	3.02	0.910
65	1.85	0.825	47.3	5.28	0.941
70	16.03	0.620	12.2	23.83	0.762
75	32.17	0.915	6.2	37.70	0.926
Ea (kJ/mol)	248.3			175.2	

*expressed in percent of the initial activity

Both biphasic model (Figure 6c) and the consecutive step model (Figure 6d) fitted well experimental data with a regression coefficients R>0.9 for all temperatures. The estimated kinetic parameters obtained for the biphasic and the consecutive step models are very close without significant difference. In a previous studied, Van Eylen *et al*. (2006) have showed that both models describe well the thermal inactivation of myrosinase from *S. alba*. The relative consistency of the activity of the native thermostable (A_S) and thermolabile (A_L) enzyme forms with the temperature could be in favour of the biphasic model. Therefore, it was estimated that the stable (N_S) and the labile fraction (N_L) represent respectively 62% and 38% of the total enzyme (Table 4). This composition is very similar to that ($N_S \approx$ 60% ; $N_L \approx$ 40%) obtained by Van Eylen *et al*. (2006) for the inactivation of the myrosinase from *S. Alba*. The inactivation coefficient of the labile form k_L is higher than that of the stable one k_S confirming that the first is less thermal resistant and can be more easily inactivated. This result was confirmed by the Ea value which is about 40% higher for the stable form as compared to the labil one (304,1 vs 214,3 kJ/mol). The values of the energy of activation are also in agreement with the common range of Ea for protein denaturation (200-500 kJ/mol) (Van Boekel, 2009).

Table 4 - Estimation of the kinetic parameters and correlation coefficient for thermal inactivation of extracted myrosinase from *B. juncea* using the biphasic model

T(°C)	A_L^*	$k_L.10^{-2}$ (min^{-1})	A_S^*	$k_S.10^{-2}$ (min^{-1})	R^2
60	27.15	4.32	72.85	0.30	0.910
65	42.01	6.36	57.99	0.35	0.941
70	44.44	87.11	55.66	7.43	0.953
75	39.23	72.98	60.77	21.27	0.938
Ea (kJ/mol)	(Ea_L) 214.3		(Ea_S) 304.1		

*expressed in percent of the initial activity

The applicability of the consecutive model can be explained by the fact that treated extract could contain not only the enzyme but also other compounds (proteins, sugars, phenols) that could interact with enzyme to form an intermediate complexe (*U*). The thermostabililty of this complex may be different to that of the free enzyme. Based on the constant rates k_1 and k_2, it can be speculated that the first step (formation of the intermediate U) is faster than the second one (inactivation of the enzyme). Indeed, k_1 is at least 10 times higher than k_2. The estimated activation energy values were 181.6 kJ/mol (Ea_1) and 259.6 kJ/mol (Ea_2) confirming the hardeness of the second step as compared to the first one.
The consecutive step model was previously used by Ludikhuyze *et al*. (1999) and Van Eylen *et al*. (2008) for the description of broccoli myrosinase extract inactivation. Authors showed that this model gives the best fitting of experimantal data. Van Eylen *et al*. (2006) suggested that the complex *U* is first

broken to liberate the myrosinase that is inactivated during the second step. The energy activation energy values were estimated to Ea_1=113.5 and Ea_2=134.1 kJ/mol for broccoli myrosinase inactivation. Higher values (Ea_1=446 and Ea_2=496 kJ/mol) were obtained by Van Eylen *et al*. (2006) obtained for the inactivation myrosinase extracted from *S. alba* seeds. Considering previous qualitative data, it can be concluded that the thermal stability of myrosinase contained in *B. juncea* seeds is higher than that of broccoli but lower than *S. alba*.

Table 5 - Estimation of the kinetic parameters and correlation coefficient for thermal inactivation of extracted myrosinase from B. juncea using the consecutive step model

T(°C)	A_1^*	$k_1.10^{-2}$ (min^{-1})	A_2^*	$k_2.10^{-2}$ (min^{-1})	R^2
60	99.10	6.32	76.76	0.48	0.907
65	96.49	11.18	70.94	0.92	0.935
70	99.0	87.11	50.82	7.43	0.953
75	100.01	73.01	43.08	21.27	0.938
Ea (kJ/mol)	(Ea_1) 181.6		(Ea_2) 259.6		

*expressed in percent of the initial activity

Overall, these results show that the myrosinase is thermally sensitive when it extracted from seeds and then treated (extrinsic inactivation). The inactivation mechanism could be effectively described by the consecutive model and characteristic parameters (energy of activation) could be compared to others vegetables in order to evaluate the myrosinase thermal stability.
The second part of this work was dedicated to study the intrinsic inactivation of the enzyme directly in the seeds without extraction.

III.4. Intrinsec inactivation of myrosinase from *B. juncea*

III.4.1. Conventional heating

The thermal stability of myrosinase from mustard seeds was screened by treating seeds at various temperatures in the range 70-90°C and for different exposure times (0-90 min). The inactivation kinetics curves are presented in Figure 7. Curves show that intrinsic inactivation is not very effective at 70 °C since only 44% loss in activity was reached after 90 min of exposure. This result is different to that previously obtained for the inactivation of the crude enzyme after extraction (extrinsic inactivation) where heating during 10 min at 70°C was enough to totally inactivate the enzyme. This strange difference may be attributed to the fact that the core temperature inside the seeds was lower than the applied one. Similar results have been observed for white and red cabbage (Yen and Wei, 1993) where a treatment at 70°C for 30 min was necessary to reach 90% loss in myrosinase activity while myrosinase in crude extract was sensitive from 40-50°C. In the same way, Matusheski *et al*. (2004) have noticed that broccoli myrosinase was remained fully active after treating broccoli tissue at 60°C for 10 min. Peréz *et al*. (2014) have reported that myrosinase was stable up to 70°C. Heating at 80°C or 90°C was more efficient. In fact, 96.8% and 96.2% loss in myrosinase activity were reached by heating up seeds respectively at 80°C for 70 min and 90°C for 40 min.

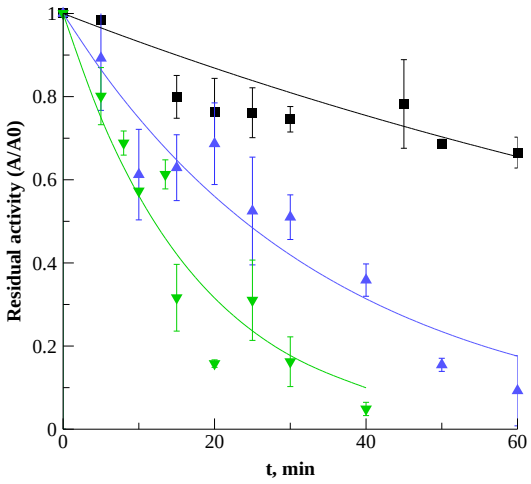


Figure 7 – Thermal inactivation kinetics of mustard myrosinase seeds fitted with first-order reaction mechanism: (■) 70°C, (▲) 80°C, (▼) 90°C.

The kinetic behavior of the enzyme during intrinsic inactivation is comparatively different to that previously obtained for myrosinase extrinsic inactivation. Indeed, the thermal inactivation kinetics of intrinsic inactivation fit well with the first-order kinetics model with satisfying regression coefficients (R^2>0.9) (Table 6). Fitting the experimantal data with the other models show they were not adapted to describe the myrosinase intrinsic inactivation behavior. Regression coefficients as well as constant rates were finally similar to those of the first order model (data not shown).

In a previous study, Oliviero *et al.* (2014) have also found a lack of fit of these models for the inactivation of myrosinase from intact broccoli and also described the kinetics of inactivation with the first order model. It could be supposed that the mechanisms of intrinsic and extrinsic enzyme inactivation are different. When the enzyme is treated directly in the seeds without prior extraction, it is stored as free enzyme in its cellular compartment without direct interaction with others components. This makes the consecutive and fractional models not adapted to describe its intrinsic inactivation. Repartition of the labile and stable form in the biphasic model was 50/50 (49.1% N_L; 50.9% N_S) with similar constant rates and activation energy, which therefore would suppose the enzyme only exists in its native form. Therefore, the first order model was used to estimate the constant rate k.

Result showed tha *k* increases by four times from 70 to 80°C and twice by increasing the temperature from 80 to 90°C (Table 6). As compared to the extrinsic inactivation, the constant rate obtained for intrinsic inactivation are very low confirming the hardness of this inactivation mode and the higher stability of intern myrosinase. Same trend was noticed for peroxidase inactivation in horse-radish (Hendrickx *et al*., 1992). Myrosinase from broccoli was also more thermally stable in intact tissue than in buffer solution (inactivation starts at 45°C vs 35°C) (Van Eylen *et al*., 2008) and inactivation rate was five times higher in buffer than in intact tissue.

Van Boekel (2009) attributed this phenomenon to a volume exclusion effect: when the enzyme is located in the tissue (considered as crowded environment), less volume is available for it to change its configuration like unfolding comparatively to when its extracted in a diluted solution (less crowded system). As a change conformation could be responsible of the enzyme activity decrease, this results in a significant higher thermal stability.

Table 6 – Estimated kinetics inactivation rates *k* for conventional cooking of mustard seeds using the first order model

T	70°C	80°C	90°C
R^2	0.900	0.933	0.929
$k.10^{-2}$ (min^{-1})	0.704	2.898	5.767

Glucosinolates analysis showed that heating did not present significative impact on sinigrin even at 90°C for 40 min and the sinigrin content was similar to untreated seeds. However, although gluconapin was not affected at 70 and 80°C, a slight degradation was noticed at 90°C where 11.4% of gluconapin were degraded after 40 min of treatment. This degradation may be attributed to thermal or/and enzymatic hydrolysis. Temperature increases may cause membrane cell rupture that could result in connecting glucosinolates and the myrosinase leading to enzymatic degradation. However as no initial degradation was noticed and taking into account that sinigrin was not degraded, it could be speculated that this slight degradation of gluonapin was not due to enzyme hydrolysis but mainly induced by thermal degradation; gluconapin would be therefore more thermolabile than sinigrin. On the other hand, analysis showed that proteins were not affected in the range of tested temperature. Industrially, the inactivation of myroasinase by conventional heating may be easily integrated in the seeds crushing process. In fact, oilseeds are generally cooked in order to prepare the oil extraction step. Cooking is performed in a vertical tower called cooker where hot stream was injected to heat seeds at 90°C for 30 min. Cooking permits moisture content calibration, cell membrane damage, oil viscosity decrease leading to better oil extractibility during the expression step. In this context, the cooking step will be efficient to inactivate the myrosinase without need to added supplementary step to the transformation process.

III.4.2. Microwave treatment

Microwave irradiation was applied at different specific powers from 3 to 6 W/g of seeds. The temperarture evolution during the treatement is presented in Figure 8. Curves show that the temperature increase rapidly before reaching a plateau. The equilibrium temperature of seeds increases with the input energy from 83°C at 3W/g to 113 °C at 4W/g and up to 132 °C at 6W/g. The effective power P_{eff} adsorbed by the sample increased from 5.6 to 20.4 W by increasing input power.

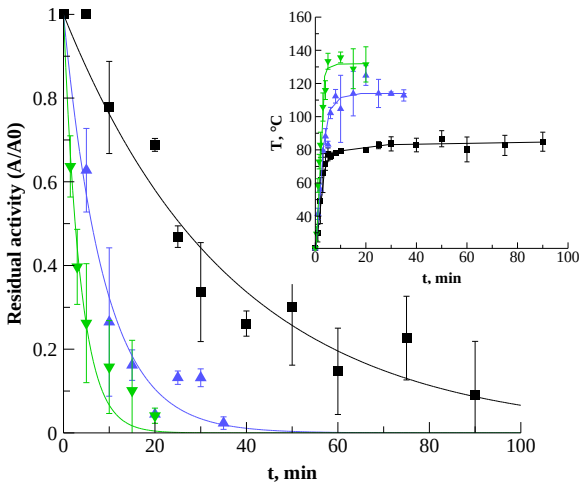


Figure 8 - Thermal inactivation kinetics of mustard myrosinase in seeds during microwave cooking fitted with first-order reaction mechanism. Insert represents the temperature profiles of seeds heated at different microwave input power : (■) 3W/g, (▲) 4W/g, (▼) 6W/g

The inactivation kinetics showed that the treatment efficiency is very dependent on the applied input power. Increasing the input power resulted in a quicker decrease of myrosinase activity. The milder microwave-treated seeds at 3W/g resulted in 92% loss activity after 90 min. Higher input power treatments allowed rapid inactivation of the enzyme with a loss acticity of of 97.7% and 95.9% reached only after 35 and 20 min at 4 and 6W/g respectively. This is certainly related to the increase of the temperature with the imput power. Estimated constant rates *k*, using the first-order model (R^2>0.95), increased by five times from 3 to 4W/g and twice from 4 to 6W/g.

Table 7 - Estimated kinetics inactivation rates k for microwave cooking of mustard seeds using the first order model

Input power	3W/g	4W/g	6W/g
$k.10^{-2}$ (min^{-1})	2.72	11.28	27.12
R^2	0.954	0.968	0.972

Data in Table 8 show that myrosinase activity was differently impacted when the couple power/exposure time varied for the same total supplied energy. For example, for E_{MW}=3600 kJ/kg, residual activity was 0.69 at 3W/g, 0.17 at 4W/g and 0.15 at 6W/g. Similar trend was noticed on the microwave heating of red cabbage (Verkerk and Dekker, 2004). The higher decrease of residual activity with the microwave power could be attributed to the higher equilibrium temperature of seeds when the microwave power was increased.

Table 8 – Residual myrosinase activity in mustard seeds with various microwave powers and heating times for same total energy E_{MW}

E_{MW} (kJ/kg)	1200	3600	7200
3W/g	1	0.69	0.26
4W/g	0.63	0.17	0.15
6W/g	0.38	0.15	0.04

Overall, results obtained with irradiation microwave at 3W/g were finally similar to that obtained by conventional heating at 80°C with similar constant rates *k*. This confirms that the temperature and the

exposure time are the predominant parameters affecting the enzyme activity, whatever the heating mode. From an energy consideration, microwave heating result in low yield of adsorption (3.3% at 3W/g, 6.1% at 6W/g) since only a slight part is effectively adsorbed by the seeds. However, microwave heating is interesting in terms of energy consumption with E_{MW}=16200 kJ/kg to reach 90% loss activity at 3W/g (residual activity < 0.1) versus E_{BW}=50400 kJ/kg for cooking treatment at 80°C to reach 96% loss activity.

Although both sinigrin and gluconapin were not impacted by the treatment at 3W/g, similarly to the cooking at 80°C, significant GSL degradation was observed at 4 and 6W/g (Figure 9) when seeds temperature during the treatment exceeds 100°C: gluconapin was more thermolabile than sinigrin with lower residual content compared to sinigrin at same exposure time. At 4W/g, the residual gluconapin was 0.3 (70% loss) and sinigrin was 0.43 (57% loss) after 35 min. At 6W/g, gluconapin was fully degraded after 15 min while residual sinigrin content was 0.27. Degradation rates k_d estimated using first order model showed that sinigrin is two fold more stable than gluconapin for both input powers with $k_{d,SIN}$=1.88 min^{-1} versus $k_{d,GNA}$=2.99 min^{-1} at 4W/g and $k_{d,SIN}$=8.34 min^{-1} versus $k_{d,GNA}$ = 15.20 min^{-1} at 6W/g.

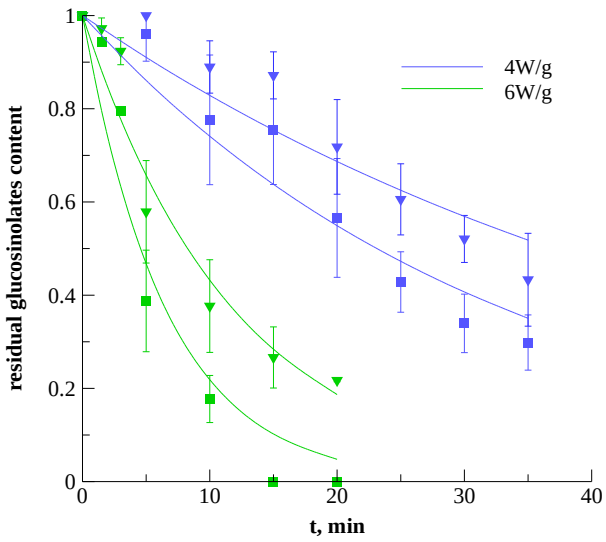


Figure 9 – Residual glucosinolates content during microwave cooking (■) gluconapin (▼) sinigrin.

The thermal stability of GSL was previously investigated for different vegetables by varing the cooking temperature. Oerlemans *et al*. (2006) have showed that thermal stability of aliphatic glucosinolates depends on the cooking temperature due to difference in the activation energies. Sinigrin was more stable than gluconapin at 80°C in the red cabbage while the order changed at 120°C. Dekker *et al.* (2009) showed significative difference in GSL stability (including gluconapin) depending on the vegetables. Further study would be necessary to evaluate the GSL stability in mustard seeds.

Taking into account that the inactivation rate of myrosinase was significantly higher than degradation rate of glucosinolates, the low initial moisture content (6%) and the decrease of GSL peaks on HPLC chromatogram during the treatment, a thermal decomposition may explain the decrease of glucosinolates content. However, because cell discruption may also occurred by operating at high temperature, enzymatic GSL hydrolysis might take place. Further study would be necessary to evaluate the capacity of hydrolysis of partially inactivated enzyme.

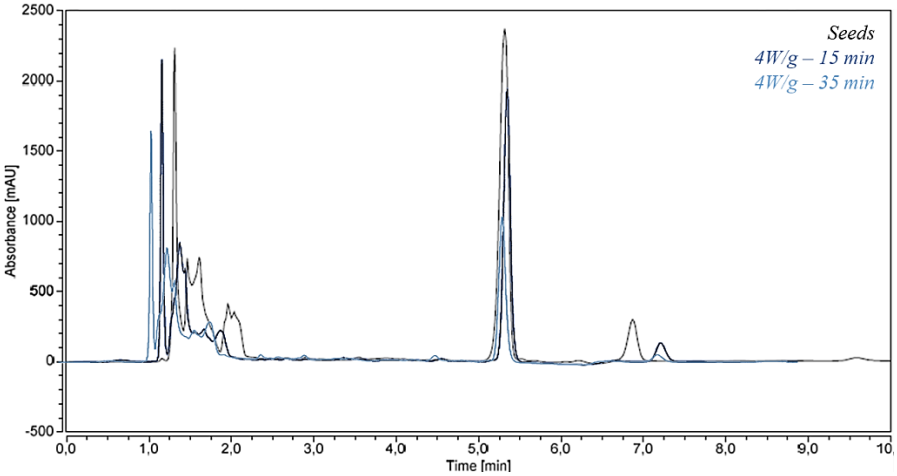


Figure 10 – HPLC chromatograms of glucosinolates (229 nm) after microwave treatment at 4W/g

III.4.3. SC-CO_2 treatment: an alternative to thermal processes?

The use of SC-CO_2 to inactivate the myrosinase was investigated by studying the effect of pressure, temperature and the exposure time regarding their impact on the enzyme activity.
Literature reviewed that severe hydrostatic treatment are generally necessary to impact myrosinase activity. Okunade *et al*. (2014) reported that myrosinase from brown mustard juice was stable up to 500 MPa (10 min, 15°C). Results (Table 9) show that myrosinase activity is sensitive to milder conditions (20-67.5 MPa) by operating in supercritical conditions. This demonstrates the inactivation ability of the process that may be attributed to the acidic effect of CO_2 which reduce the pH of the seeds and modify the structural conformation of the enzyme inducing its inactivation. Results show that the myrosinase activity is slightly dependent on the applied pressure. For instance, the enzyme residual activity decreased from 0.97 at 20 MPa to 0.81 at 67.5 MPa. Literature lacks qualitative data on enzyme inactivation using SC-CO_2. Taniguchi *et al*. (1987) reported similar results on the inactivation of myrosinase from mustard with SC-CO_2; the enzyme activity remains constant after a treatment at 30 MPa and 40°C for 3h.
By varying temperature from 36°C to 56°C at 67.5 MPa, the residual activity of the enzyme was nearly constant (≈80%) since the enzyme is thermally stable until 50°C but a significant drop in residual enzyme activity (≈0.41) was obtained at 68°C. In addition to the thermal effect on the enzyme, increasing the temperature enhances the diffusion of CO_2 and penetration into cellular material to induce its acification. Dunford and Temelli (1996) reported a drop in myrosinase activity from canola flakes at 75°C compared to 35 and 55°C for all studied pressures (21.4-62.1 MPa) for 3h exposure time. Overall, further investigation would be required to understand the correlation between pressure and temperature and their synergic effect on myrosinase activity and to understand the mechanism of inactivation under supercritical conditions.

Table 9 - Effect of temperature and pressure on residual myrosinase activity after 5h of SC-CO_2 treatm

P (MPa)	**T (°C)**	**A_t/A_0**	**E_{CO2} (kJ/kg)**	**P (MPa)**	**T (°C)**	**A_t/A_0**	**E_{CO2} (kJ/kg)**
20	56	0.966±0.049	204.1	**67.5**	36	0.803±0.003	1344.4
35		0.898±0.129	513.5		56	0.813±0.018	1344.7
50		0.854±0.025	876.1		68	0.417±0.051	1344.9
67.5		0.813±0.018	1344.7				

The influence of the exposure time on myrosinase inactivation was investigated at 68.5 MPa and 68°C (Figure 11). It was shown that inactivation kinectics is very slow up to 3h and then becomes more rapid for long treatment time. In fact, the residual activity of myrosinase was about 94.2% after 1h and it decreased to 53.5 % after 3h, and up to to 28.5% after 7h. Overall, myrosinase inactivation seems difficult to achieve even in severe conditions of pressure, temperature and long treatment time. This behavior could be related to the lower water content (6%) in the seeds in our case. Increasing the moisture content of seeds by humidification may enhance the inactivation kinetics and lead to totally inactivate the enzyme. In a previous study, Dunford and Temelli have shown that increasing the moisture content from 8.5% to 20.5% allowed decreasing the enzyme activity by 44% at P = 62.1 MPa, T = 75°C and t=3h (Dunford and Temelli, 1996). However, it was shown that dealing with higher moisture content enhances GSL hydrolysis. In our case, GSL degradation was minimal after 3h (8% loss) but it was enhanced significantly to 22% after 7h. This behaviour is probably due to the residual myrosinase

activity inducing GSL hydrolysis. On top of that further analysis should be considered to evaluate the effect of CO_2 on proteins.
Energy estimation showed that the most energy consumed coressponds to the compression of CO_2. Compartively to thermal treatment inactivation, SC-CO_2 is less energy costly and very attractive for an industrial implementation (E_{CO2} = 1344 kJ/kg vs E_{BW} = 50400 kJ/kg).

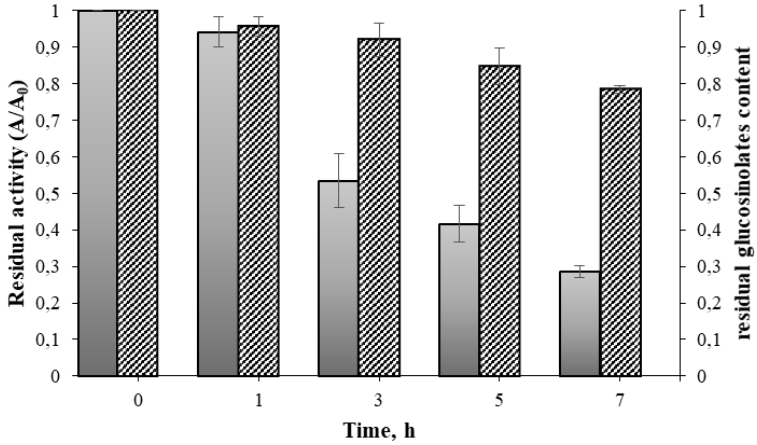


Figure 11 – Effect of time exposure on residual myrosinase activity and glucosinolates content from brown mustard seeds (6.4% moisture) during the SC-CO_2 treatment at 67.5 MPa and 68°C.

Conclusion

In this study, the extrinsinc and intrinsic inactivation of myrosinase of brown mustard seeds were investigated and optimized. For extrinsic inactivation, the enzyme was extracted and the obtained extract was treated at different temperatures. It was shown that the enzyme is thermally sensitive and can be totally inactivated at 70°C and 10 min. Modelisation of inactivation kinetics showed that both biphasic and consecutive models give the best fitting explaining thus the inactivation mechanism.
For the intrinsic inactivation, the enzyme was treated directly in the seeds without prior extraction. It was shown that the enzyme is harder to inactivate comparatively to extrinsic inactivation. Heating at 80°C for 70 min in necessary to totally inactivate the enzyme. The first order model is the most adapted to describe the intrinsic enzyme inactivation, which traduce a difference in mechanism of enzyme inactivation compared to the intrinsic myrosinase. MW irradiation showed the efficiency of this process to inactivate the enzyme but a compromise should be found to ovoid the degradation of GSL at high power input. A treatement at 3 W/g seems optimal for myrasinase inactivation and GSL preservation. SC-CO_2 is an alternative non-thermal process for myrosinase intrinsic inactivation at high pressure (67.5 MPa) and temperature (68°C). From an energy point of view, SC-CO_2 is the more interesting as compared to thermal treatements (conventional heating and microwave irradiation treatment).

Acknowledgments

This work was realised in cooperation with SAS PIVERT as part of « l'Institut pour la Transition Energétique » (ITE) P.I.V.E.R.T. (www.institut-pivert.com) selected from « les Investissements d'Avenir » with the following reference ANR-001-01. This work has been supported financially by State.

References

Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A. and Desmarchelier, J.M. (1994). 'Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus', *Plant Soil,* 162*(1),* pp. 107–112.

Bellostas, N., Sørensen, J.C. and Sørensen, H. (2007). 'Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four Brassica species of the U-triangle for their biofumigation potential', *J. Sci. Food Agric.,* 87(8), pp. 1586–1594.

Björkman, R. and Lönnerdal, B. (1973) 'Studies on myrosinase III. Enzymatic properties of myrosinases from Sinapis Alba and Brassica napus seeds', *BBA – Enzymology,* 327(1), pp. 121–131.

Bones, A.M. and Rossiter, J.T. (2006). 'The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates', *Phytochemistry,* 67(11), pp. 1053–1067.

Brown, P.D. and Morra, M.J. (1996). 'Hydrolysis products of glucosinolates in Brassica napus tissues as inhibitors of seed germination', *Plant Soil,* 181, pp. 307–316.

Dekker, M., Hennig, K. and Verkerk, R. (2009). 'Differences in Thermal Stability of Glucosinolates in Five Brassica Vegetables', *Czech J. Food Sci.,* 27(Special Issue 1), pp. S85-S88.

Dunford, N.T. and Temelli, F. (1996). 'Effect of Supercritical CO2 on Myrosinase Activity and Glucosinolate Degradation in Canola', J. Agric. Food Chem., 44(8), pp. 2372–2376.

Guerrero-Diaz*, M. M., Lacasa-Martínez, C. M., Hernández-Piñera A., Martínez-Alarcón, V. and Lacasa-Plasencia, A.* (2013). 'Evaluation of repeated biodisinfestation using Brassica carinata pellets to control Meloidogyne incognita in protected pepper crops', *Span. J Agric. Res.,* 11(2), pp. 485–493.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. and Talalay, P. (2001). 'The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants', *Phytochemistry,* 56, pp. 5–51.

Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J. and VanEtten, C.H. (1983). 'Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants', *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.,* 18(2), pp. 123–201.

Friberg, H., Edel-Hermann, V., Faivre, C., Gautheron, N., Fayolle, L., Faloya, V., Montfort, F. and Steinberg, C. (2009) 'Cause and duration of mustard incorporation effects on soil-borne plant pathogenic fungi', *Soil Biol. Biochem.,* 41(10), pp. 2075–2084.

Ghawi, S.K., Methven, L., Rastall, R.A. and Niranjan, K. (2012). 'Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage : A kinetic study', *Food Chem.,* 131(4), pp. 1240–1247.

Grubb, C.D. and Abel, S. (2006). 'Glucosinolate metabolism and its control', *Trends Plant Sci.,* 11(2), pp. 89–100.

ISO 659:2009 (2009). 'Oilseeds - Determination of oil content (reference method)'.

ISO 5983-2 (2009). ‘Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content’.

ISO 9167-1 (1992). ‘Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Part 1: Method using high-performance liquid chromatography’.

Larkin, R.P. and Griffin, T.S. (2007). ‘Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures’, *Crop Prot..*, 26(7), pp. 1067–1077.

Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C., Herremans, C., Van Impe, J.; Hendrickx, M. and Tobback, P. (1997). « Kinetics of isobaric-isothermal inactivation of *Bacillus subtilis* R-amylase ». *Biotechnol. Prog.*, 13, 532-538.

Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., Weemaes, C. and Hendrickx, M. (1998). « The effect of combined pressure and temperature on soybean lipoxygenase. 1. The influence of extrinsic and intrinsic factors and isobaric-isothermal inactivation kinetics ». *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4074-4080.

Ludikhuyze, L., Ooms, V., Weemaes, C. and Hendrickx, M. (1999). ‘Kinetic Study of the Irreversible Thermal and Pressure Inactivation of Myrosinase from Broccoli (Brassica oleracea L. Cv. Italica)’, *J. Agric. Food Chem.*, 47(5), pp. 1794–1800.

Maheshwari, P.N., Stanley, D.W. and Van De Voort, F.R. (1980). ‘Microwave Treatment of Dehulled Rapeseed to Inactivate Myrosinase and Its Effect on Oil and Meal Quality’, *J. Am. Oil Chem.' Soc.*, 57(7), pp. 194–199.

Matusheski, N.V., Juvik, J.A., and Jeffery, E.H. (2004). ‘Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli’, *Phytochemistry*, 65(9), pp. 1273–1281.

Mawson, R., Heaney, R.K., Zdunczyk, Z. and Kozlowska, H. (1994a). ‘Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 3. Animal growth and performance’, *Nahrung*, 38(2), pp. 167–177.

Mawson, R., Heaney, R.K., Zdunczyk, Z. and Kozlowska, H. (1994b). ‘Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 4. Goitrogenicity and internal organs abnormalities in animals’, *Nahrung*, 38(2), pp. 178–191.

Merah, O. (2015). ‘Genetic Variability in Glucosinolates in Seed of Brassica juncea : Interest in Mustard Condiment’, *J. Chem.*, 2015, pp. 1–6.

Njoroge, S.M.C., Riley, M.B. and Keinath, A.P. (2008). ‘Effect of Incorporation of Brassica spp. Residues on Population Densities of Soilborne Microorganisms and on Damping-off and Fusarium Wilt of Watermelon’, *Plant Dis.*, 92, pp. 287–294.

Oerlemans, K., Barrett, D.M., Bosch Suades, C., Verkerk, R., and Dekker, M, (2006). ‘Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage’, *Food Chem.*, 95(1), pp. 19-29.

Okunade, O.A., Ghawi, S.K., Methven, L. and Niranjan, K. (2015). 'Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seeds', *Food Chem.*, 187, pp. 485–490.

Oliviero, T., Verkerk, R., Van Boekel, M.A.J.S. and Dekker, M. (2014). 'Effect of water content and temperature on inactivation kinetics of myrosinase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)', *Food Chem.*, 163, pp. 197–201.

Owusu-Ansah, Y.J. and Marianchuk, M. (1991). 'Microwave Inactivation of Myrosinase in Canola Seeds: A Pilot Plant Study', *J. Food Sci*., 56(5), pp. 1372-1374.

Peréz, C., Barrientos, H., Román, J. and Mahn, A. (2014). 'Optimization of a blanching step to maximize sulforaphane synthesis in broccoli florets', *Food Chem.*, 145, pp. 264-271.

Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, Bo. and Meijer, J. (2000). 'Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae', *Plant Mol. Biol.*, 42(1), pp. 93–113.

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W. and Desmarchelier, J.M. (1998). 'Biofumigation potential of brassicas', *Plant Soil*, 201(1), pp. 103–112.

Sotelo, T., Lema, M., Soengas, P., Cartea, M.E. and Velasco, P. (2015). 'In vitro activity of Glucosinolates and their degradation products against Brassica-pathogenic bacteria and fungi', *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, pp. 432–440.

Stoin, D., Pirsan, P., Radu, F., Poiana, M.-A., Alexa, E., and Dogaru, D. (2009). "Studies regarding the myrosinase enzymatic activity from black mustard (Brassica nigra) seeds". *JFAE*, 7(1), pp. 44–47.

Suzuki, K. (1960). « Studies on the kinetics of protein denaturation under high pressure ». *Rev. Phys. Chem. Jpn.*, 29 (2), pp. 49-56.

Taniguchi, M., Nomura, R., Kijima, I. and Kobayashi, T. (1987). « Preparation of defatted mustard by extraction with supercritical carbon dioxide ». *Agric. Biol. Chem*. 1987, *51* (2), pp. 413-417.

Van Boekel, M. A. J. S. (2009). "Kinetic modelling of reactions in food" (pp. 5.14–5.15; 10.1–10.29; 14.2–14.11). Boca Raton, FL: Taylor & Francis.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M. and Van Loey, A. (2006) 'Temperature and pressure stability of mustard seed (Sinapis alba L.) myrosinase', *Food Chem*., 97(2), pp. 263–271.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M. and Van Loey, A. (2008). 'Effects of pressure / temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (Brassica oleracea L. cv. Italica) myrosinase and on cell permeability', *J. Food Eng.*, 89(2), pp. 178–186.

Verkerk, R., van Boekel, M. A. J. S., Jongen, W. M. F., and Dekker, M. (2002). « Predictive modeling of the glucosinolatemyrosinase system during cooking of cabbage ». In Verkerk, R. (Ed.), Evaluation

of glucosinolate levels throughout the production chain of Brassica vegetables; towards a novel predictive modelling approach, pp. 87–110. PhD-thesis, Wageningen University.

Verkerk, R. and Dekker, M. (2004). 'Glucosinolates and myrosinase activity in red cabbage (Brassica oleracea L. var. Capitata f. rubra DC.) after various microwave treatments', *J. Agric. Food Chem.*, 52(24), pp. 7318–7323.

Vig, A.P., Rampal, G., Thind, T.S., and Arora, S. (2009). 'Bio-protective effects of glucosinolates - A review', *Food. Sci. Technol.*, 42(10), pp. 1561–1572.

Whatelet, J.-P., Iori, R., Leoni, O., Rollin, P., Quinsac, A. and Palmieri, S. (2004). 'Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation', *Agroindustria*, 3, pp. 257-266.

Wimmer, Z. and Zarevúcka, M. (2010). 'A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxyde on Enzyme Activity', *Int. J. Mol. Sci*., 11(1), pp. 233–253.

Yen G.-C., Wei Q.-K. (1993). 'Myrosinase activity and total glucosinolates content of cruciferous vegetables, and some properties of cabbage myrosinase in Taiwan', *J. Sci. Food Agric.*, 61(4), pp. 471-475.

III.1.3. Vérification de la conservation des glucosinolates dans le tourteau

Afin de vérifier l'efficacité du traitement choisi (80°C sur les graines pendant 70 min) sur la conservation des glucosinolates, les tourteaux obtenus après pressage mécanique à froid (30°C) sur un échantillon témoin (graines non traitées) et sur les graines traitées ont été analysés. Les graines ont préalablement subi un floconnage afin d'améliorer la disponbilité de l'huile. Les courbes de pressage correspondantes sont illustrées **Figure III-1**. La comparaison des cinétiques d'extraction montre une amélioration des rendements d'extraction de l'huile des graines traitées avec 63,7% à 80 min contre 53,6% pour les graines non traitées. Le traitement thermique mené pour inactiver la myrosinase peut dasn notre cas être assimilé dans le procédé classique de trituration à l'opération de cuisson des graines réalisée avant pressage. Cette étape permet en effet de diminuer la viscosité de l'huile et faciliter son écoulement à travers le gâteau, améliorant ainsi son extractibilité.

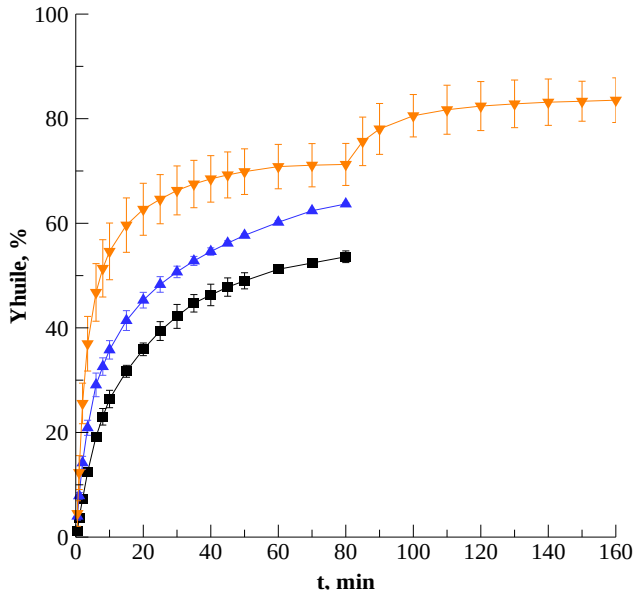


Figure III-1 – Ciéntiques d'extraction de l'huile obtenues par pressage mécanique réalisé à 100 bars et (■) 30°C via un échantillon témoin (graines non traitées), (▲) 30°C via les graines traitées (80°C, 70 min), (▼) 80°C via les graines traitées.

Finalement, afin d'intensifier l'extraction de l'huile, il a été décidé de réaliser un double pressage successif des graines à chaud (80°C) menant à un rendement final d'extraction de 84% et une teneur résiduelle en huile dans le tourteau inférieure à 9%. La teneur en glucosinolates dans les différents tourteaux obtenus est présentée dans le tableau.

Tableau III-1- Comparaison de la teneur en glucosinolates au cours du procédé de transformation des graines de moutarde

	Sinigrine (µmol/g MS)	*Gluconapine (µmol/g MS)*
Graines	102,0 ± 2,6	13,2 ± 0,3
Tourteau (non traité) (1)	69,9 ± 5,2	/
Tourteau (traité) (2)	139,5 ± 2,1	18,4 ± 0,6

(1) Sans inactivation de la myrosinase (2) avec inactivation de la myrosinase

On peut noter une diminution signficative des glucosinolates dans le tourteau obtenu sans inactivation de la myrosinase avec plus de 30% de perte de la sinigrine et la totalité de la gluconapine par rapport aux graines. Cette perte peut clairement être attribuée à l'hydrolyse de l'enzyme qui a pu débuter dès le floconnage des graines due à l'éclatement des membranes cellulaires. En revanche, la sinigrine et la gluconapine ont été effectivement concentrés dans le tourteau avec l'enzyme préalablement inactivée. Les analyses ont de plus montré que les teneurs restaient constantes sur plus de deux mois, montrant ainsi l'efficacité du traitement.

Ainsi les conditions retenues de prétraitement des graines pour inactiver l'enzyme pourraient facilement s'intégrer dans un procédé conventionnel de trituration et ne nécessiterait pas d'opération subsidiaire. En effet à titre d'exemple, le barème optimal de cuisson pour le colza est généralement de 90°C pendant 30 min. Un chauffage par micro-ondes serait intéressant d'un point de vue énergétique mais plus difficile à extrapoler à échelle industrielle via l'assurance d'un rendement énergétique intéressant (conception de l'installation, géométrie des guides d'ondes, choix des matériaux permettant une maximisation de l'absorption des micro-ondes par la matière) et le contrôle de la température de la matière. Le pressage permet la valorisation de deux sous-produits : une huile riche en acide érucique pour des applications oléochimiques, et un tourteau riche en glucosinolates intacts à extraire pour l'exploitation de leur activité biologique. Ce dernier point fera donc l'objet de la partie suivante.

III.2. Optimisation de l'extraction des glucosinolates à partir de tourteau de *B. juncea* avec différents prétraitements

III.2.1. Extraction des glucosinolates par diffusion avec différents prétraitements

III.2.1.1. Résumé de l'article

L'article « Selective recovery of glucosinolates from mustard seeds (Brassica juncea) using process optimization and innovative pretreatment (high voltage electrical discharges) » a été soumis dans le journal « Industrial Crops and Products » en 2019. Cet article a pour objectif l'extraction sélective des glucosinolates à partir du tourteau via l'utilisation de solvants bioscourés en alternative au méthanol communément employé pour l'extraction des glucosinolates et l'utilisation des décharges électriques comme prétraitement. Le traitement par DEHT a été utilisé pour la destabilisation/l'endommagement des parois cellulaires et l'extraction de biomolécules à partir de différentes matières premières.

L'extraction des glucosinolates a été dans un premier temps optimisée par diffusion en utilisant le broyage comme prétraitement de référence. L'effet de la composition du solvant (mélange eau/éthanol), la température et le ratio solide-liquide ont été étudiés. Il a été observé que la teneur en glucosinolates dans l'extrait diminuait au cours du temps lorsque la teneur en eau du solvant est majoritaire (≥ 80%) malgré le traitement thermique préalablement réalisé, indiquant l'existence d'une activité résiduelle de l'enzyme ou d'une fraction de l'enzyme thermiquement résistante. Environ 90% de la sinigrine et 75% de la gluconapine ont été extraits en 8 min via un solvant de 40% d'éthanol à 40°C avec un ratio solide/liquide de 10 (m:m) pour seulement 7% de protéines, assurant la conservation de la qualité protéique du tourteau (36.1% après séchage). L'extraction à plus haute température ou à ratio S/L plus élevé n'a pas montré d'amélioration de rendement. Dans les mêmes conditions, l'extraction des glucosinolates sans broyage ne dépasse pas 20%.

Un prétraitement par DEHT a été appliqué comme alternative au broyage. Le paramètre prédominant dans le traitement par DEHT est le nombre d'impulsions (fréquence fixée par 1Hz et la durée d'une impulsion à environ 10 microsecondes). Le nombre d'impulsions varie de 0 à 500 pour une tension délivrée de 40 kV. L'extraction a été réalisée dans l'eau avec un ratio S/L de 5. L'objectif du prétraitement pat DEHT est d'endommager les parois cellulaires pour faciliter l'extraction des glucosinolates. Une deuxième étape de diffusion solide-liquide après le traitement était initialement envisagée dans les conditions définies précédemment. Cependant les analyses ont montré que les glucosinolates sont efficacement extraits au cours du traitement avec une extraction totale de la sinigrine (rendement 96-98%) à partir de 350 impulsions (durée du traitement 3 ms). Malgré une extraction réalisée dans l'eau et à température ambiante (élévation de température de 12°C après 500 impulsions), les glucosinolates sont restés stables en solution. Quelques travaux traitent de l'efficacité des traitements électriques sur l'inactivation d'enzyme. L'application des DEHT a donc permis l'élimination de l'activité résiduelle de la myrosinase permettant une extraction dans l'eau dans laquelle les glucosinolates sont hautement solubles. Les résultats montrent aussi que le traitement par DEHT est plus sélectif pour l'extraction de molécules à faible masse moléculaire avec l'extraction de seulement 3.2% des protéines.

Le tourteau résiduel après séchage a été ainsi détoxifié avec l'élimination des facteurs antinutritionnels (teneur totale en glucosinolates < 20 µmol/g MS), constituant ainsi une nouvelle source intéressante de protéines pour l'alimentation animale.

III.2.1.2. Article

Selective recovery of glucosinolates from mustard seeds (*Brassica juncea*) using process optimization and innovative pretreatment (high voltage electrical discharges)

Mathieu HEBERT, Houcine MHEMDI and Eugene VOROBIEV

Abstract

Glucosinolates (β-thioglucoside-N-hydroxysulfates) are rich-sulfur secondary metabolites presented in a large variety of plants mainly in Cruciferous. They may be hydrolyzed by an endogene enzyme called myrosinase to liberate numerous sub-products such as isothiocyanates, thiocyanates and nitriles. Glucosinolates possess biological activity, which reinforce their potential applications as natural biofumigant agents to replace chemical pesticides. The objective of this investigation was to recover glucosinolates from mustard seed meal rich in sinigrin and gluconapin. For this purpose, mustard seeds were first defatted using a laboratory hydraulic press. The pressing was occurred at 100 bars and 80°C for 80 min allowing the recovery of 84% of intracellular oil. The obtained defatted meal is rich in proteins (35.8-40.8%), sinigrin (128.8-139.5 µmol/g DM) and gluconapin (14.8-18.4 µmol/g DM). The objective was to maximize the extraction of glucosinolates and to minimize the extraction of proteins using only "green solvents" (ethanol and water) to preserve the nutritional quality of meal as animal feed. Preliminar optimization was performed using grinding as standard pretreatment and followed by liquid/solid extraction ; it allowed to recover 88% of sinigrin and 73.7% of gluconapin after 8 min using a solution of 40% ethanol at 40°C in 10-fold excess (w/w). Only 19.6% and 20.3% respectively of sinigrin and gluconapin were recovered with the same conditions on untreated meal. Influence of high-voltage electrical discharges (HVED) on the selective extraction of glucosinolates was then investigated. The application of HVED at 40 kV for 5 ms permitted to recover 97% of sinigrin and 75% of gluconapin without further diffusion operation. Temperature increase during HVED operation did not exceed 12°C. Glucosinolates extraction selectivity was better with HVED compared to grinding+diffusion operation with lower proteins extraction (3.2% vs 6.8%). The residual meal conserved high proteins content (40.3%) and very low glucosinolates concentration (6.8 µmol/g DM), thus suitable for animal feeding.

Keywords: Mustard, glucosinolates, proteins, extraction, high-voltage electric discharges, biofumigation

I. Introduction

Glucosinolates (GSL), β-thioglucoside-N-hydroxysulfates (or 1-thio-β-D-glucopyranoside), are secondary metabolites produced by cruciferous plant. They are accumulated in high concentration in many especies belonging to Brassicaceae family (Fahey et al., 2001). The literature review show that more than 120 different GSL have been identified in many plants such as mustard, cabbage, cauliflower, broccoli, radish etc. It was shown that composition and concentration of GSL vary from one specie to another and within one single variety according to plant environment, crop conditions, age and health (Bennett et al., 2004; Bhandari et al., 2015).

GSL play an important role for plant protection. In fact, these compounds remain inactive unless interacting with an endogene enzyme called myrosinase (ß-thioglucosidase, E.C. 3.2.1.147) (Bones et al, 1996; Karcher et al., 1999) to produce glucose and breakdown products, including isothiocyanates. These products of hydrolysis are highly reactive and possess fungicidal, bactericidal and insecticidal properties (Fahey et al., 2001; Grubb and Abel, 2006; Holst and Williamson, 2004; Diaz et al., 2013; Sotelo et al., 2015). Thus the GSL-myrosinase system presents formidable defense properties against external aggressions. Toxicological aspect of GSL makes them a great natural pesticide and biofumigation agent (Sarwar et al., 1998; Holst et al., 2004) instead of chemical crop protection products (Bohinc et al., 2012).

Mustard is one of plants rich in GSL. In fact, mustard seeds are rich in GSL but also in oil and proteins. Nowadays, they are used as a spice to prepare a yellow condiment known as prepared mustard. However, producers are looking for new ways for seeds valorization according to the biorefinery concept; this concept aiming valorization of all plant compounds to value added products, biofuels and chemicals (Cherubini, 2010). Biorefinery concept is applicable for mustard seeds because of their high oil, proteins and GSL content. Indeed, oil contained in mustards seeds is rich by erucic acid, which is suitable to manufacture many chemical products (paint, surfactants, petrochemical). Proteins are highly sought as animal feed, and the GSL may be valorized as natural phytosanitary product while they are traditionally eliminated for “canola” crops. Although the extraction of edible oils and proteins is well known and has been intensively studied in the literature, the extraction of GSL was little studied and the literature lacks data in this field.

In fact, an international standard method (ISO 9167-1) has intended in 1992 for glucosinolates extraction from B. napus involving double extraction with boiling aqueous methanol (70% v/v, 75°C). Wathelet and co-workers (2004) modified this protocol proposing one single extraction in the same conditions. Tsao et al. (2002) compared five techniques for extraction sinigrin from brown mustard (B. juncea). They showed that using boiling 50% (v/v) aqueous acetonitrile solution and followed reflux was the most efficient method for GSL recovery. Other solvents such as aqueous methanol, boiling water, phosphate buffer, phosphoric acid and methanol/water solution have been investigated (Clarke, 2010, Cools and Terry, 2012). Basically, the ISO protocol with aqueous methanol as a solvent is commonly used for glucosinolates recovery from seeds giving high extraction yield. However, obtained meal has restrictions for animal feeding due to its toxic and carcinogen aspects related to methanol extraction.

Currently, public authorities, scientists and industrials are more aware of the need to reduce chemicals and preserve the environment. In this context, some innovative green technologies, including pulsed electric field, high voltage electric discharges (HVED), ultrasounds, sub and supercritical fluids, have

been tested to replace traditional processes using organic solvents. HVED technology consists in creating a highly inhomogeneous electric field (U>20 kV) between two needle-plane or needle – needle electrodes, which leads to the generation of electric arcs and dielectric breakdown in water (Adda et al., 2016). These phenomena can be accompanied by bubbles cavitation, high pressure shock waves causing particles destruction and very intensive mixing of extract (Adda et al., 2018). Efficiency of HVED has been previously showed for the extraction of antioxidants from grape marcs (Boussetta et al, 2009), pectins, glucides and polyphenols from papaya (Parniakov et al, 2014), pectins from sugar beets (Almohammed et al, 2017), and various solutes from soya, potato, tea leaves, fennel and oilseeds (Vorobiev and Lebovka, 2010). Energy and time save are the big advantages of HVED assisted extraction as compared to the conventional one. This work is aimed to perform a green extraction method for the selective recovery of GSL from mustard defatted seed meal. The proposed extraction process is based on the use of green solvents (water and ethanol) and the application of HVED technology. The objective is to maximize the extraction of GSL without co-extraction of proteins that should be preserved in the meal. Grinding was used as a reference treatment for comparison. The extraction yield, the selectivity of extraction and the energy consumption were considered for process optimization.

II. Material and Methods

II.1. Raw material

Brown mustard seeds (B. juncea) of the variety Etamine were provided by Chambre d'Agriculture Côte d'Or (Bretenière, France).

II.2. Chemicals

Sinigrin monohydrate was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Glucotropeoalin was provided by Terres Inovia (Ardon laboratory, France). Acetonitrile, ethanol, tetraheptylammonium bromide, sodium phosphate monobasic anhydrous were obtained from Fischer Scientific (Illkirch, France). Bradford reagent was provided by VWR (Strasbourg, France).

II.3. Valorization of mustard seeds

Figure 1 presents the global process diagram applied in this study for the valorization of mustard seeds. First of all, seeds were thermally treated to inactivate the myrosinase, flaked and pressed to extract intracellular oil. The obtained press cake was subjected to grinding or HVED pretreatment before GSL extraction. The impact of temperature, liquid/solid ratio and the composition of solvent on the extraction of GSL were studied. GSL extraction without pretreatment was done as control for the comparison. The details are described below.

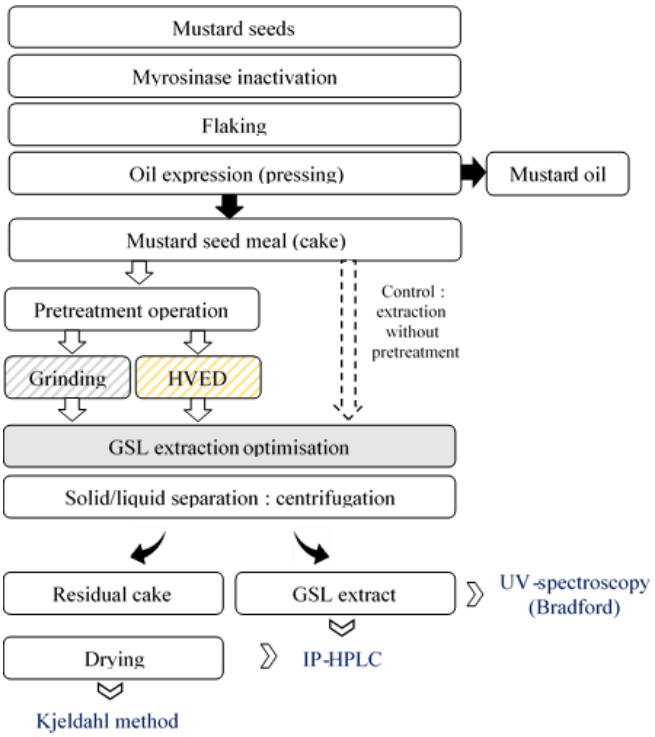


Figure 1 – Global valorization diagram of brown mustard seeds

II.3.1. Myrosinase inactivation

Myrosinase contained in the seeds was first inactivated to prevent the hydrolysis of glucosinolates during the subsequent steps of flacking, expression and extraction. The inactivation was performed by dipping a sealed bottle containing the seeds in hot bath-water (Julabo SW22) at 90°C during 70 min. Analysis showed that this thermal treatment allowed almost total inactivation (97%) of myrosinase without affecting the content and the quality of proteins, oil and GSL.

II.3.2. Flaking

Before pressing, the seeds were flaked to facilitate oil extraction. The operation was achieved in two consecutive steps using a rotating cylinder « Trilabo » 100 x 200 SH grinder (Grenier-Charvet, France). Pressures of 10 and 15 bars were applied for the first and second step respectively.

II.3.3. Oil extraction

Oil extraction was performed by mechanical expression using a laboratory hydraulic press (Creusot-Loire, France) (Figure 2) equipped with a hydraulic central and a double jacket heat exchanger for pressure and temperature regulation respectively. Briefly, 300 g of treated flaked seeds were pressed twice (80 min and 60 min) in a consecutive way at P = 100 bars and T = 80°C. The mass of the recovered oil was continuously monitored using electronic balance (Mettler Toledo, US). The obtained press-cake was then used for GSL extraction with and without pretreatments.
Oil extraction yield Y_{oil} was determined using Eq. 1:

$$Y_{oil}(\%) = \frac{m_t}{m_i} \quad \text{(Eq. 1)}$$

With m_t the mass of recovered oil during time and m_i the initial mass of oil contained in the seeds. The maximum extraction yield for an infinite time was determined using the linearized form of Peleg (Peleg, 1988) model described by Eq. 2:

$$\frac{t}{Y_{oil}(t)} = \frac{1}{Y_{oil\infty}} t + \frac{1}{B_0} \quad \text{(Eq. 2)}$$

Where $Y_{oil}(t)$ and $Y_{oil\infty}$ are respectively the yield of oil recovered at the moment t and for an infinite extraction time, B_0 is the constant coefficient.

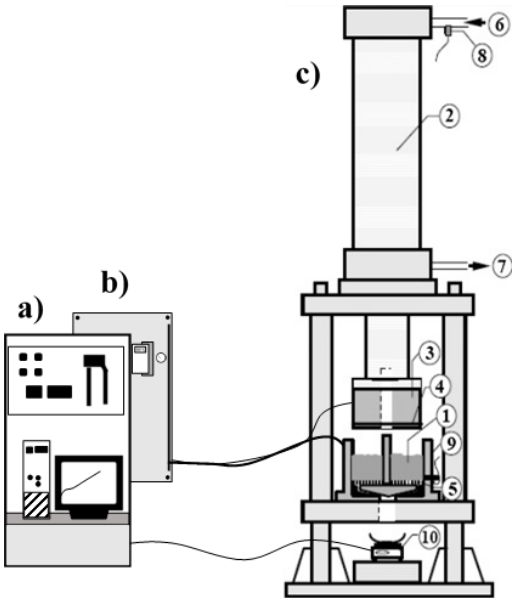


Figure 2 - Experimental set-up used for pressing. a) acquisition computer & control panel, b) boiler, c) Plate press, 1-pressing chamber, 2-cylinder, 3-plug, 4-ring, 5-filter, 6-hydraulic fluid in, 7-hydraulic fluid out, 8-pressure sensor, 9-temperature probe, 10-balance.

II.3.4. Pre-treatments and GSL extraction

II.3.4.1.Grinding

The press cake was grinded using a coffee grinder (MCG2013B-18, Mandine) for 30s to obtain a fine powder. The average diameter of the power particles, estimated using a laboratory Mastersizer 2000 instrument (Malvern instruments, UK), was 232.4 µm. The specific energy of the grinding was calculated using Eq (3):

$$E_{gr} = \frac{P_{gr} \times t}{m_{gr}} \quad \text{(Eq. 3)}$$

With P_{gr} is the power of the grinder (0.15 kW), t is the grinding time and m_{gr} is the mass of the grinded material.

II.3.4.2. HVED assisted extraction

The experimental device is made up of a high-voltage pulse generator (Basis, Saint-Quentin, France) of 40kV-10kA connected to a batch cylindrical chamber of one liter. The pulse voltage was fixed to U = 40 kV and the pulses frequency was 1Hz. The duration and the energy of one pulse was 10 µs and 160 J/pulse respectively. The used treatment chamber was equipped with a stainless steel cylindrical needle (diameter = 10 mm) and a grounded plate electrode (diameter = 35 mm). The distance between the electrodes was fixed at 5 mm during all experiments. Briefly, the defatted meal was introduced with water in 5-fold excess in the treatment chamber for the HVED treatment. The number of pulses n was varied from 0 (control sample) to 500. The temperature of the suspension was controlled after each treatment.
The specific energy input E_{HVED} (kJ/kg) of HVED pretreatment was calculated using Eq. 4:

$$E_{HVED} = \frac{n \times E_p}{m} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

Where n is the number of pulses, E_p (kJ) stands for the energy of one pulse supplied by the electrical generator and m is the mass of the mixture (water+meal) (g). GSL and proteins content were measured directly after the treatment.

II.3.5. GSL extraction

Glucosinolates extraction from untreated and pretreated (by grinding or HVED) meal was performed in a 500 mL glass flask under controlled stirring and temperature meaning heat plate magnetic stirrer IKA. Briefly, the solvent (water, ethanol or mixture of both) was first heated at the desired temperature before adding the sample. The extraction was achieved at 500 rpm for 30 min. A volume of 2 mL of liquid was taken every 2 min for analysis (GSL and proteins content), and 2 ml of pure solvent was added to keep the liquid-solid ratio constant during extraction. After extraction and cooling to room temperature, the mixture was filtrated through qualitative filter paper of 5-13 µm (VWR, France). The recovered meal was dried in oven at 75°C for 8h for determination of its protein and GSL content. The impacts of the solvent composition (water/ethanol v/v), temperature (from 20 to 60°C) and liquid-solid ratio (w/w, from 5 to 20) were studied to found the optimal operation conditions allowing selective extraction of GSL. Extraction yield of GSL, Y_{GSL} (defined for both sinigrin, Y_{SIN} and gluconapin, Y_{GNA}), extraction yield of proteins (Y_{pr}), extraction selectivity S_{GSL} (defined for both sinigrin S_{SIN} and gluconapin, S_{GNA}) as purity towards proteins, and total energy consumption (E_t) were calculated using Eq. (5) – (8):

$$Y_{GSL}(\%) = \frac{C_{GSL}}{C_{GSL0}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 5)}$$

$$Y_{pr}(\%) = \frac{m_{pr}}{m_{pr0}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 6)}$$

$$S_{GSL}(\%) = \frac{Y_{GSL}}{Y_{GSL} + Y_{pr}} \times 100 \qquad \text{(Eq. 7)}$$

$$E_t = E_{pr} + E_{ex} \qquad \text{(Eq. 8)}$$

Where E_{pr} is the specific energy (kJ/kg) consumption due to grinding or HVED pretreaments and E_{ex} is the specific energy (kJ/kg) consumption due to solvent heating during extraction. These parameters were estimated with a watt-meter connected to the heating stirring plate. C_{GSL} is the actual concentration of GSL (sinigrin C_{SIN} and gluconapin C_{GNA}) in solution (µmol/g DM), C_{GSL0} is the total concentration of extractable GSL from meal, m_{pr} is the actual mass of proteins in solution, m_{pr0} is the mass of extractable proteins from meal and m is the mass of the mixture (solvent+meal) (g).
To describe the effective diffusivity of glucosinolates, the normalized GSL content B was calculated as follows:

$$B = \frac{C_{GSL}}{C_{GSL_\infty}} \qquad \text{(Eq. 9)}$$

Where C_{GSL_∞} is the concentration of GSL (sinigrin, C_{SIN} or gluconapin, C_{GNA}) at $t = \infty$. The value can be estimated from Peleg equation from experimental data according to following equation:

$$\frac{t}{C_{GSL}} = \frac{1}{C_{GSL_\infty}} t + \frac{1}{B_1} \qquad \text{(Eq. 10)}$$

Where B_1 is a constant.
Assuming extraction medium as a well-stirred limited volume, an analytical solution of the diffusion equation was used to estimate respectively the sinigrin and gluconapin diffusion coefficient D (m²/s) according to the Crank equation (Crank, 1975):

$$B = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{6\alpha(\alpha+1)}{9+9\alpha+q_n^2\alpha^2} \exp(-Dq_n^2 t / r^2) \qquad \text{(Eq. 11)}$$

$$\tan\ q_n = \frac{3q_n}{3+\alpha q_n^2} \qquad \text{(Eq. 12)}$$

Where q_n are the non-zero roots calculated from Eq. (11), t is the extraction time, r is the radius of the spherical particles, and α is the liquid-to-solid ratio. The values of q_n (for α > 9) are q_1 = 3.1416, q_2 = 6.2832, q_3 = 9.4248, q_4 = 12.5664, q_5 = 15.7080 and q_6 = 18.8496 (Crank, 1975).

II.4. Analysis

II.4.1. Moisture content

The moisture content of seeds and press-cake was determined by drying 5 g of product at 105°C to a constant weight using a moisture analyzer MA160 (Sartorius, Göttingen, Germany).

II.4.2. Oil content

Oil content in seeds and defatted cake was determined by hexane extraction according to international standard ISO 659:2009.

II.4.3. Protein content

The proteins content in the juice (mg/L) was determined using Bradford method (Bradford, 1976). A volume of 100 µL of raw juice and 1 mL of Bradford Reagent were mixed. The resulting samples were kept 10 min at room temperature before analysis. The absorbance was then measured at wavelength λ = 595 nm by the UV/Vis UV-6300 PC spectrophometer (VWR, Strasbourg France). The standard calibration curve was constructed using aqueous bovine serum albumin solution (BSA) at different concentrations from 10 to 300 mg/L. Protein content in seeds, defatted cake and residual dry cake was determined using the Kjeldahl method (ISO 5983-2:2009).

II.4.4. GSL quantification

The GSL content was determined by reversed phase ion-pair liquid chromatography. HPLC experiments were performed on a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series equipped with Diode Array Detectors (DAD-3000 RS and MWD-3000 RS). A C18 column (Prontosil 250 x 4,6 mm 5.0 µM) was used for the analysis. Mobile phase consisted in an acetonitrile-water solution (45%) with NaH_2PO_4 at 10 mM and THABr as counterion at 5 mM conditioned at pH 7.0. Analyses were performed with a mobile phase flow rate of 1.5 mL/min, UV wavelength of 229 nm, column temperature of 35°C. Briefly, 20 µL of the sample were injected in the chromatograph, the elution was carried out in isocratic mode. A standard calibration curve was constructed from solutions of standard sinigrin from 0.1 mM to 3.5 mM. Gluconapin content was determined by an internal method using glucotropaeolin as internal standard.
The GSL content in seeds, defatted cake and residual cake were estimated according to the procedure of Whatelet *et al.* (2004). GSL extraction is carried out by using a methanol-water solution (70:30) at 75°C from 200 mg of product powder.

II.5. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. Averages of the data and their standard deviations were calculated and presented in figures as error bars. Differences at $p < 0.05$ were considered to be significant.

III. Results and discussion
III.1. Seeds composition

Mustard seeds were first analyzed and their composition is presented in Table 1. Results confirmed the richness of seeds in oil (≈34%), proteins (≈28%) and GSL (110 µmol/g DM). HPLC analysis showed that glucosinolates found in brown mustard seeds are sinigrin and gluconapin (figure 3**)**. Sinigrin is present in highest concentration with 89% of the amount of total GSL. This result is similar to that reported by Merah (Merah, 2015) for more than 120 species of mustard seeds.

Table 1 - Global composition of mustard seeds of variety Etamine

Crop year	Glucosinolates (µmol/g DM)		Protein content (%)	Oil content (%)	Moisture (%)
	sinigrin	*gluconapin*			
2016	102.03±2.63 **(100)***	13.18±0.30	25.98±0.09 **(29.6)**	33.8±0.3 **(33.7)**	6.4±0.2
2017	94.71±1.13	10.87±0.13	28.09±0.03	33.9±0.5	6.7±0.3

**Bold values are supplier claimed data.*

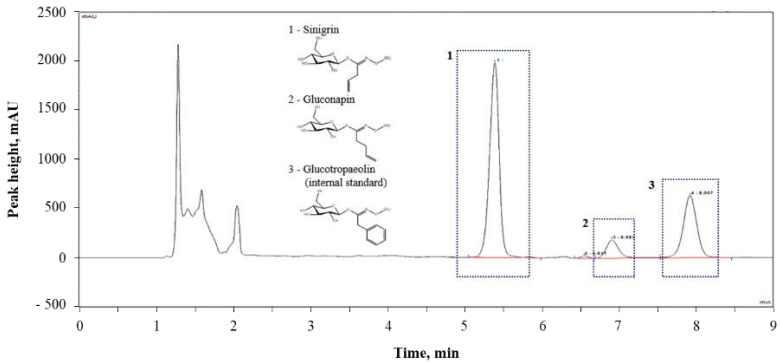


Figure 3 – HPLC chromatogram of glucosinolates in mustard seeds. Retention times of sinigrin and gluconapin are respectively 5.45 min and 6.98 min. Retention time of glucotropaeolin as internal standard is 8.01 min. Initial pics from 1 to 2 min correspond to impurities due to matrix.

III.2. Oil expression

Figure 4 shows the oil expression kinetics from mustard seeds at 100 bar and 80°C in two consecutives pressing steps. First pressing gives an oil expression yield of around 70%. This yield is higher than those reported in the literature for oil seeds (Koubaa *et al*., 2016; Bogaert *et al*., 2018). This enhancement may be attributed to the seeds preheating before pressing. It induces cells damage facilitating oil expression during pressing. This operation can be assimilated to cooking treatment in the conventional seeds crushing process. Moreover, increasing the temperature during pressing decreases the oil viscosity and enhances its flow through the cake. After 30 min of pressing, the curve reaches a plateau suggesting the formation of an impermeable cake limiting the oil flow. The maximum oil extraction yield that can be reached after infinite extraction time of 1st pressing was mathematically estimated by using the Peleg model (see insert in figure 4) and it did not exceed 74.6%. Based on this result, we decided to mix the cake and apply a second pressing in the same conditions. By this way, it was possible to reach a global oil extraction of 84%.

The obtained press-cake (meal) – whose composition is presented in table 2 – was then used for GSL extraction.

Table 2 – Global composition of the defatted seed meal

Crop	C_{SIN} (µmol/g DM)	C_{GNA} (µmol/g DM)	Protein content (%)	Moisture content (%)	Oil content (%)
2016	139.47	18.38	35.76	7.1	8.70
2017	128.84	14.79	40.77	7.4	8.44

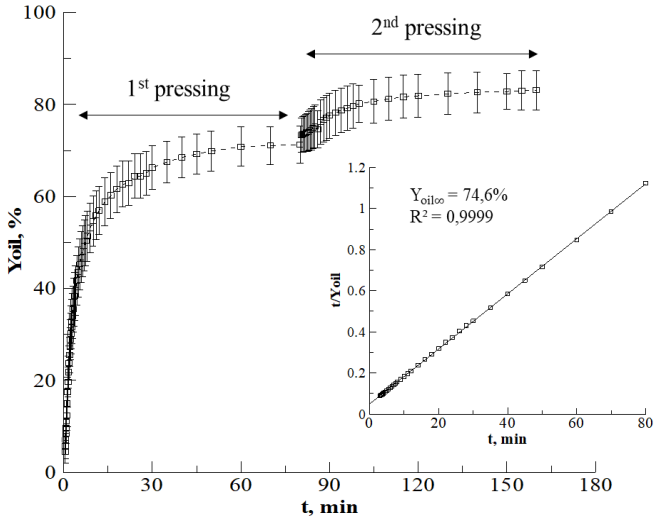


Figure 4 – Evolution of oil yield Y_{oil}. Pressing was performed at 100 bars and 80°C for 80 min. Insert presents the relation t/Y_{oil} versus t according to Peleg model. Maximum oil yield is estimated from the reverse of slope, i.e. 74.6%.

III.3. Glucosinolates extraction

Optimization was performed using grinding as reference pretreatment and followed by liquid/solid extraction. Results were then compared with crude meal (untreated)+optimized extraction and HVED assisted extraction.

III.3.1. Effect of solvent composition

The choice of appropriate solvent is a key factor for effective extraction. In this study we used only green solvents (water and ethanol) to replace conventional methanol. For this purpose, the efficiency of sinigrin and gluconapin extraction was evaluated using different water/ethanol mixtures. The extraction kinetics are presented in figure 5. Curves show similar shapes whatever the solvent composition. It can be clearly observed that GSL (sinigrin and gluconapin) are mainly released during the first 5 min. Then GSL extraction increases very slowly demonstrating exponential behavior. Similar behaviors were observed in previous works for the extraction of others biomolecules (polyphenols, proteins) from different green biomasses (Mhemdi *et al*., 2016; Wang *et al*., 2018a, 2018b).
Moreover, curves show that the extraction efficiency is very dependent on the solvent composition. In fact, the extraction yield is inversely proportional to the richness of the mixture in ethanol: the lower is the ethanol percentage the higher is the extraction yield of sinigrin and gluconapin. For instance, after 5 min of extraction the yield of sinigrin attained 39.2, 51.9 and 82.5% in mixtures with ethanol content respectively 100, 80 and 40%. This impact may be related to formation of more hydrogen bonds of GSL having better affinity with water. The impact of ethanol addition on the efficiency of gluconapin extraction was even more important, because only 6.5% gluconapin were extracted in 100% of ethanol. This result may be very useful if the extraction of gluconapin is not desirable. This Difference between sinigrin and gluconapin diffusivity can easily be explained by their chemical structure: in fact; the presence of one further carbon on its lateral alkyl chain makes gluconapin more apolar than sinigrin.

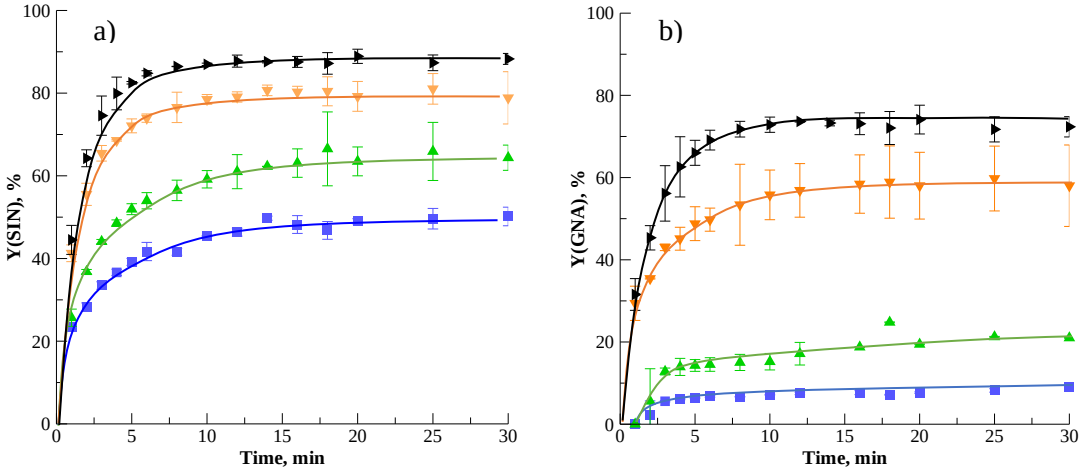


Figure 5 - Sinigrin (a) and gluconapin (b) extraction kinetics in different ethanol/water mixtures: 40% ethanol (►), 60% ethanol (▼), 80% ethanol (▲) and 100% ethanol (■). Extraction conditions: 40 °C, 10 g of solvent per g of sample and stirring at 500 rpm.

In the other hand, it was observed than when proportion of water in solvent becomes predominant (>80%), GSL tend to be degraded after around 5 min (figure 6) The degradation is relatively slow and probably due to the residual activity of myrosinase. Extraction in water performed from non-cooked meal have shown that GSL were instantly damaged. It can be supposed that high concentration of ethanol (>40%) blocks enzymes activity while water is a favorable environment for enzymatic reactivation.

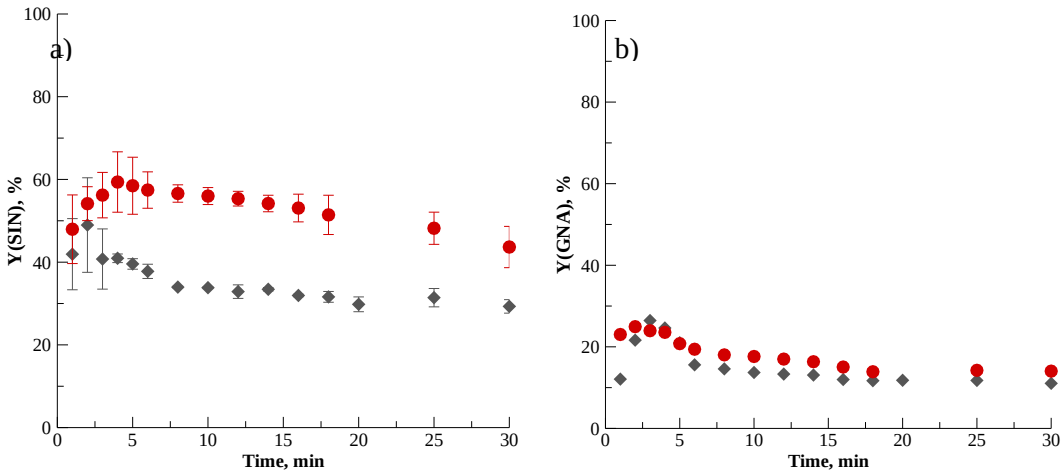


Figure 6 – Degradation of a) sinigrin and b) gluconapin during extraction with pure water (●) and 20% ethanol (♦).

Proteins extraction kinetics are presented in figure 7. Proteins were not practically recovered using solvents with high ethanol content (80 and 100%). This leads to a very high selectivity of GSL recovery (> 98%). Proteins extraction can be enhanced by reducing the percentage of ethanol in ethanol/water solution. For instance, the extraction yield of proteins was multiplied by 10 (from 0.7 to 7%) when ethanol content in solution was decreased to respectively 60 and 40%. This should be attributed to higher solubility of proteins in water. Consequently, selectivity of GSL extraction decreases, but remains still high (>92.5%). It can be concluded that ethanol addition to water permits more selective extraction of

glucosinolates and preserves better meal proteins. In a previous study (Wang *et al*., 2018b), it was shown that using 50% ethanol and 50% water gives the best selectivity of phenolics extraction from apple pomace.

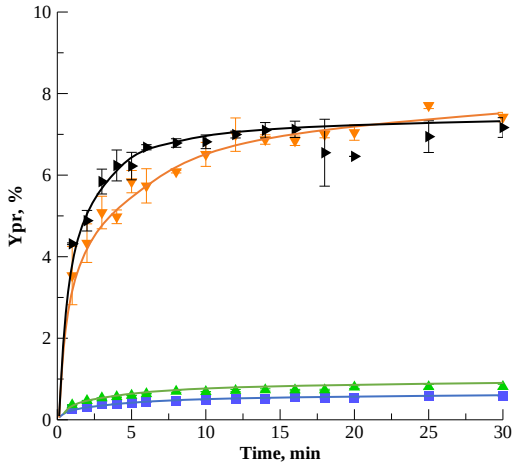


Figure 7 – Kinetics of proteins extraction in different ethanol/water mixtures: 40% ethanol (►), 60% ethanol (▼), 80% ethanol (▲) and 100% ethanol (■). Extraction conditions: 40 °C, 10 g of solvent per g of sample and agitation at 500 rpm.

Among the percentages of ethanol evaluated in this study and considering both the efficiency and the selectivity of extraction, 40% ethanol was the best solvent for sinigrin and gluconapin recovery from mustard meal.

III.3.2. Effect of temperature

Figure 8 shows the extraction kinetics of sinigrin and gluconapin at different temperatures. Generally, it can be noticed that higher temperature improves GSL extraction. For sinigrin, increasing the temperature up to 40°C enhanced the extraction kinetics, but the kinetic curves were nearly the same at 40 and 60 °C. The final extraction yield was about 88% for both temperatures. The effect of temperature is more important on gluconapin extraction. For instance, the extraction curves showed an improvement with temperature up to 60°C. Moreover, the diffusion coefficient (table 3) was increased from 2.93 $x10^{-11}$ at 20°C to 5.58 $x10^{-11}$ at 40°C and 6.16 $x10^{-11}$ m^2/s at 60°C. This could be explained by the effect of heating on the tissue structure. With increase of temperature from 20 to 60 °C, tissue modifications and cell damage can happen, facilitating GLS extraction. Enhancement of solutes extraction at higher temperatures was shown for different plant materials (Mhemdi *et al*., 2012; Mokrani & Madani, 2016; Almohammed *et al*., 2017; Sato *et al*., 2017). In the other hand, HPLC analysis (figure 10) showed that GSL remain intact in the range of tested temperatures.

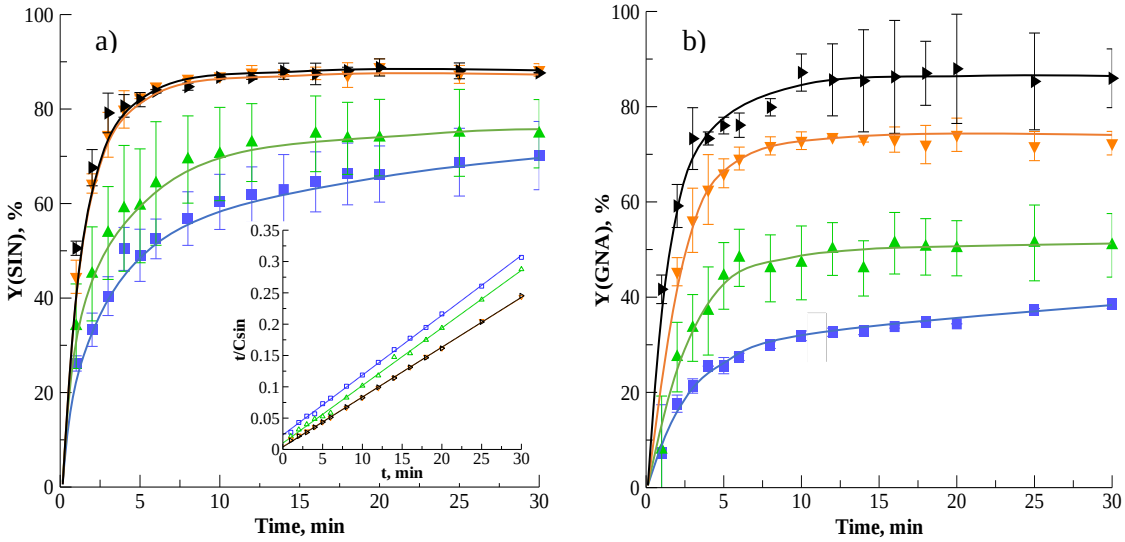


Figure 8 - Sinigrin (a) and gluconapin (b) extraction kinetics at different temperatures: 20 (■), 30 (▲), 40 (▼), and 60°C (►). Extraction conditions: 40% ethanol, 10 g of solvent per g of sample and agitation at 500 rpm. Insert is t/C_{SIN} plotted versus t according to Eq. (10) (Peleg model).

Table 3 – Influence of temperature of extraction on diffusion coefficient of sinigrin and gluconapin

Temperature (°C)	20	30	40	60
Sinigrin				
R^2*	0.9991	0.9994	0.9994	0.9997
$C_{SIN\infty}$ (µmol/g DM)	104.70	110.08	126.10	125.54
D (m^2/s)	5.33 x10^{-11}	5.75 x10^{-11}	7.36 x10^{-11}	7.29 x10^{-11}
Gluconapin				
R^2	0.9947	0.9816	0.9979	0.9987
$C_{GNA\infty}$ (µmol/g DM)	7.71	10.37	13.86	16.45
D (m^2/s)	2.93 x10^{-11}	4.48 x10^{-11}	5.58 x10^{-11}	6.16 x10^{-11}

**Correlation factor for linear regression from Peleg model (Eq. 10)*

Figure 9 shows the proteins extraction kinetics at different temperatures. Enhancement of proteins extraction at higher temperatures is accompanied by lower extraction selectivity of GSL (94% at 20°C and 91.8% at 60°C). However the global earnings in terms of GSL recovering at high temperature seems to be insufficient compared to energy requirements. For instance, extraction of additional quantity of gluconapin (increase on 17.5% at 60°C compared to 40°C) needs considerably higher energy consumption (increase of 75%). An extraction in milder conditions is preferential. Based on the obtained results, an optimal temperature of 40°C was chosen for the subsequent process optimization.

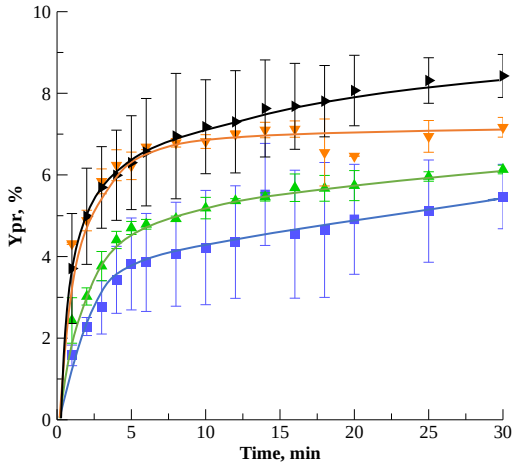


Figure 9 - Proteins extraction kinetics at different temperatures: 20 (■), 30 (▲), 40 (▼), and 60°C (►). Extraction conditions: 40% ethanol, 10 g of solvent per g of sample and stirring at 500 rpm.

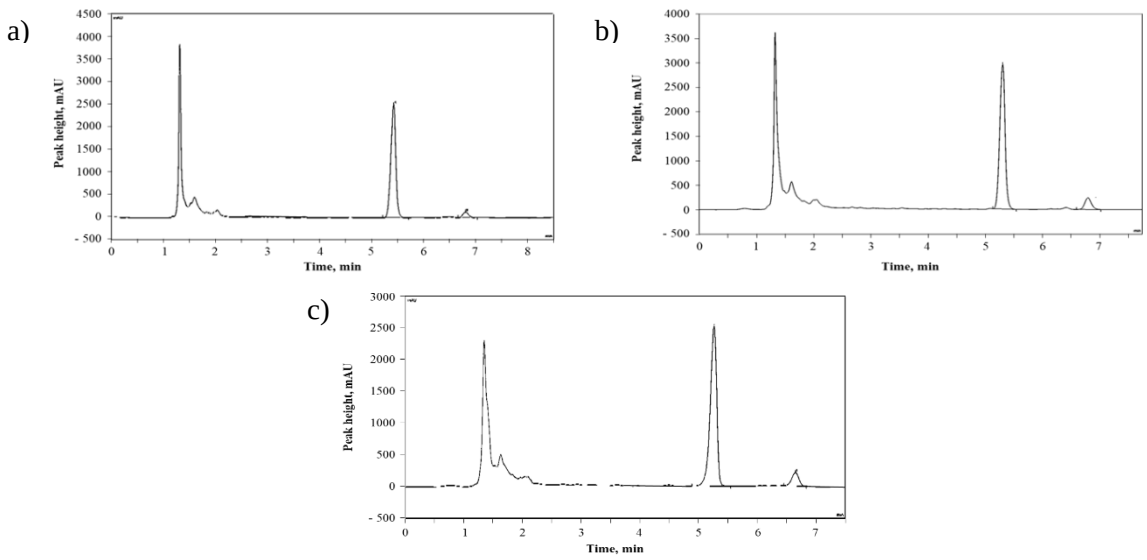


Figure 10 – HPLC chromatograms of glucosinolates extracted from defatted mustard meal at a) 20°C, b) 40°C, c) 60°C. Extraction conditions: 40% ethanol, 10 g of solvent per g of sample and stirring at 500 rpm.

III.3.3. Effect of liquid-solid ratio

Figure 11 presents kinetics of sinigrin and gluconapin extraction (40°C, 40% ethanol) at different L/S ratios. Increasing L/S ratio from 5 to 10 enhanced extraction kinetics and nearly doubled sinigrin and gluconapin diffusivity (table 4). For instance, the final extraction yield raised from 66.5% to 88.3% for sinigrin and from 44.6% to 73.7% for gluconapin when L/S ratio increased from 5 to 10. On the other hand, increasing the liquid/solid ratio from 10 to 20 has no significant effect on the extraction of sinigrin and gluconapin due to the free solutes diffusion in the high quantity of solvent.

Table 4 – Impact of ratio liquid/solid on diffusion coefficient of sinigrin and gluconapin

Ratio liquid to solid	5	10	20
Sinigrin			
R^2	0.9989	0.9994	0.9994
C_∞ (µmol/g DM)	95.42	126.10	124.75
D (m²/s)	4.66 x10^{-11}	7.36 x10^{-11}	6.69 x10^{-11}
Gluconapin			
R^2	0.9964	0.9979	0.9973
C_∞ (µmol/g DM)	9.41	13.86	13.70
D (m²/s)	3.15 x10^{-11}	5.58 x10^{-11}	5.29 x10^{-11}

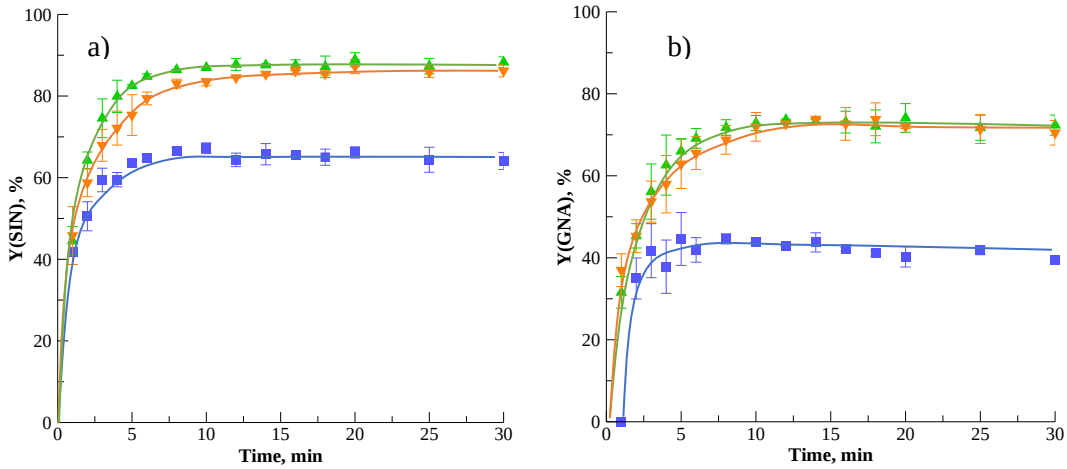


Figure 11 - Sinigrin (a) and gluconapin (b) extraction kinetics at different liquid-solid ratio (w:w): 5 (■), 10 (▲), 20 (▼). Extraction conditions: 40°C, 40% ethanol.

The impact of the liquid/solid ratio is less impressive on the extraction of proteins (figure 12). The extraction yield of proteins did not exceed 7% ensuring good selectivity of extraction. Since the liquid solid ratio of 10 gives a good extraction performance and better selectivity, it has been selected for the following experiments.

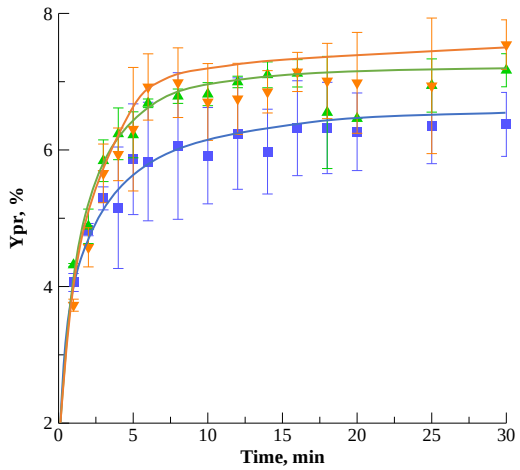


Figure 12 - Proteins extraction kinetics for different liquid-solid ratios (w:w): 5 (■), 10 (▲), 20 (▼). Extraction conditions: 40% ethanol, 40°C and stirring at 500 rpm.

Finally, the following extraction conditions were selected for the seed meal: 40% ethanol in 10-fold excess (w:w) at 40°C. This protocol has enabled to recover during 8 min respectively 88% and 73.7% of sinigrin and gluconapin with respective selectivity of 92.7% and 92.5%. The energy consumed for the operation was 577 kJ/kg including grinding as pretreatment. About 72% of the total energy was was consumed by solvent heating. Nutritional quality of the residual meal (with a protein content of 36.1%) was preserved. HPLC analysis has revealed the latter contains 15.52 µmol sinigrin/ DM and 3.73 µmol gluconapin/ DM. Thus, the meal have been 'detoxified' and can be considered as a 'simple cake' (GSL content fixed between 20 and 35 µmol/g DM). Such meal can be used for animal feeding since its GSL content is consistent with traditional farmers' meal (18.5 µmol/g DM) (Labergère, 2006).

III.3.4. Influence of pretreatments

III.3.4.1. Grinding

Figure 13 shows the total extraction yield of sinigrin and gluconapin from the untreated and grinded press cake in the optimal extraction conditions previously determined (40% ethanol, 40°C and liquid/solid ratio of 10) at different times. The impact of grinding is impressive. In fact, the extraction yields from untreated press cake did not exceed 20% after 8 min and 40 % after 30 min of extraction for both sinigrin and gluconapin against 88% and 73.7% respectively from the ground meal. Although its efficiency for the extraction of sinigrin and gluconapin, grinding is a high energy consuming operation. In our case it represented 20% of the total energy consumption. Generally, grinding also leads to the high damages of tissues leading to non-selective extraction of targeted molecule. As a result, the extract purification can be technically complicated and very energy costly.

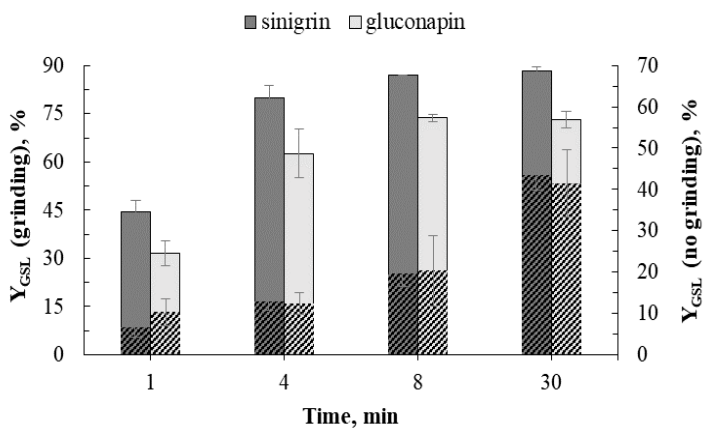


Figure 13 – Comparison of sinigrin and gluconapin extraction yields after different times for ground (filled areas) and untreated meal (shaded areas).

III.3.4.2. HVED assisted extraction

Figure 14 presents the extraction yields of sinigrin, gluconapin, and proteins from the cake pretreated by high voltage electrical discharges (HVED) at U = 40 kV with different number of pulses n. Without electrical pre-treatment (control sample), the extraction yields were only 8% and 16% for gluconapin and sinigrin respectively (n=0). These yields were significantly increased when the cake was treated by HVED. The application of HVED in liquid creates high-pressure waves and bubbles cavitation. These phenomena lead to fragmentation of solid material and enhancement of extraction (Vorobiev and Lebovka, 2010; Boussetta *et al.*, 2009). Similar trends were previously observed for the extraction of

some valuable compounds, including proteins and polyphenols (Vorobiev and Lebovka, 2010). However, the evolution of the extraction yield versus the number of pulses depends on the target molecule (in our study sinigrin and gluconapin). In fact, it can be seen that gluconapin yield increased linearly with pulses number. For sinigrin the behavior is quite different. The extraction yield increased up to n = 350 pulses and it remains nearly constant for higher number of pulses. Applying 350 pulses allowed the recovery of 97.2% of sinigrin but only 63.9% of gluconapin. Increasing the pulses number up to 500 pulses led to extract 75.6% of gluconapin. In these conditions, the effective time treatment was 5 ms and the residence time of meal in the chamber was 500 s (≈ 8 min). Temperature of the liquid medium increased linearly with the number of pulses from 31°C to 43°C after 500 pulses. Therefore, results show there is no need to add further extraction operation since the target molecules (sinigrin and gluconapin) were efficiently extracted and the electric treatment corresponds finally to an extraction in water with a ratio L/S 5 at 30-40°C. It can be noticed that glucosinolates were not damaged during the HVED treatment despite an extraction in water, which contradicts to the previous results (grinding+extraction in water). This may be attributed to the effect of the electrical treatment on myrosinase. Indeed, some previous works dealt with the efficiency of electrical treatment as alternative technology on the inactivation of enzyme and microorganisms instead of conventional thermal processing methods. The intensity and the number of pulses are the main factors influencing the enzyme activity (Qin *et al*., 1994; Martín-Belloso and Elez-Martínez, 2005; Zhao and Yang, 2017). A reduction of 70% of residual activity of polyphenoloxidase from apple juice have been obtained by combining pulsed electric field (PEF) treatment at 38.5 kV/cm and heating at 50°C (Sanchez-Vega *et al*., 2009). Therefore, it can be speculated that residual activity of myrosinase have been decreased by the application of HVED, allowing extraction in water in which glucosinolates are highly solubles.

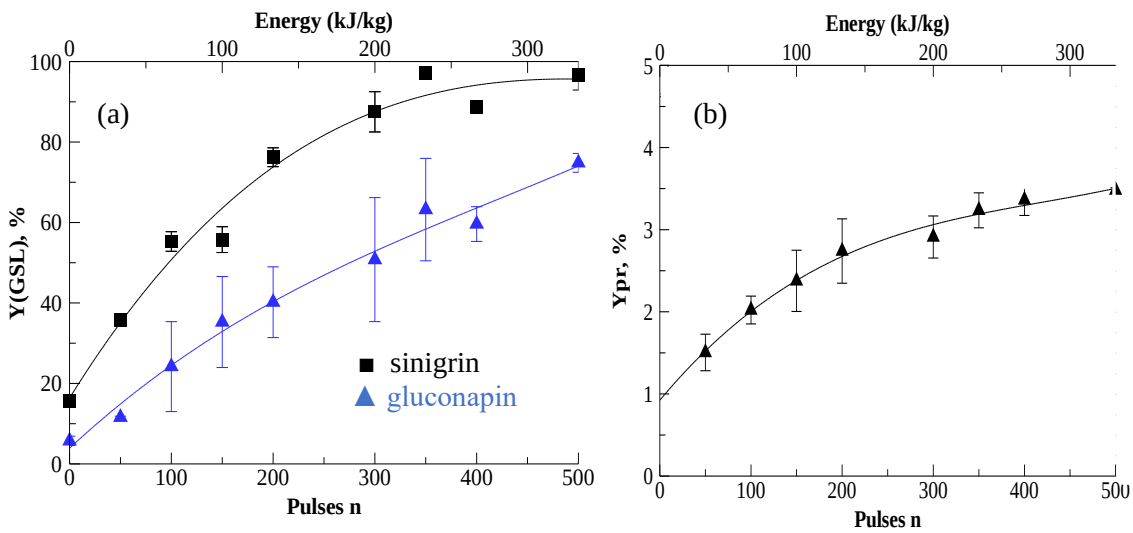


Figure 14 – Evolution of the yields of GSL (Y_{SIN} and Y_{GNA}) (a) and proteins (b) during the HVED treatment versus the pulses number and the energy input. HVED treatment is performed at U = 40 kV.

Obtained results have also shown that HVED treatment is more selective for the extraction of smaller molecules since yields of proteins extracted during HVED application were two times lower in compare to grinding reaching only 3.2% in 350 pulses. Grinding makes solutes more available for diffusion due to high cells damage and 4% of proteins were immediately extracted in 40% ethanol. HVED extraction were performed on crude meal and its fragmentation were ruled with the number of electrical discharges. Until 200 pulses, the meal fragmentation was not efficient enough to facilitate the extraction of proteins

due to their high molecular weight, compared to small molecules like sinigrin and gluconapin, which can be easily diffused with minimal cells damage, and only 1.5% of proteins were extracted after 50 discharges. On the other side, the extraction in HVED chamber took place initially around 30°C while optimal solid/liquid extraction was performed at 40°C. This shows higher selectivity of the HVED process towards proteins compared to the grinding in optimal conditions (96.8% vs 92.7%). Table 5 sums up the main performances obtained for each process. Finally, analyzes carried out after HVED with n=350 pulses (E_{HVED} = 233.3 kJ/kg) have shown that the residual cake contained only 6.8 µmol/g DM of GSL (2.0 and 4.8 µmol/DM of sinigrin and gluconapin respectively). It can be claimed that meal was fully detoxified by HVED treatment and can be used for animal feeding. Obtained extract was also analyzed and resultants showed that sinigrin and gluconapin were intact after the electrical treatment (figure 15)

Table 5 – Performances of processes used for the extraction of GSL

Extraction process	Diffusion (without pretreatment)	Grinding + diffusion	HVED assisted extraction
Pretreatment duration	-	30 s	3.5 ms
Liquid to solid ratio	10		5
Solvent	Eau/ethanol 60/40 (v:v)		water
Temperature	40°C		30°C
Extraction duration	30 min	8 min	5.8 min
Y_{SIN}/Y_{GNA} (%)	43.4/41.4	88.3/73.7	97.2/63.9
S_{SIN}/S_{GNA} (%)	92.7/92.4	92.9/91.6	96.8/95.6
E_t (kJ/kg)	542	577	233
Residual GSL content after extraction (µmol/ g MS)	89,8	19,2	6,8

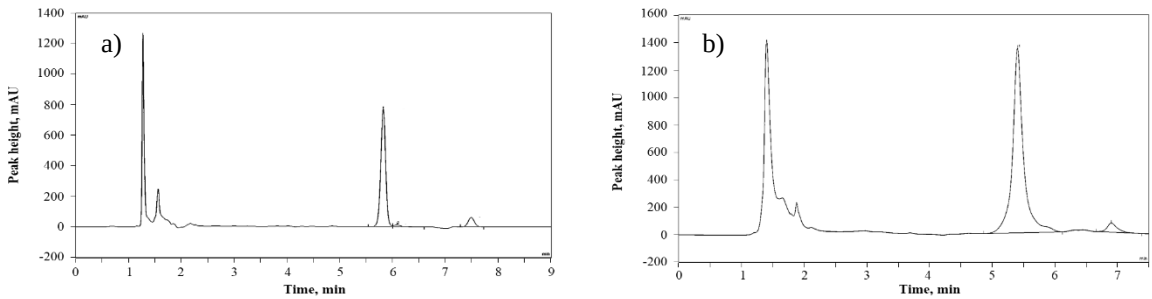


Figure 15 – HPLC chromatogram of glucosinolates extracted from defatted mustard meal a) without grinding in optimal extraction conditions b) after HVED treatment at 40kV and 350 pulses

Conclusion

GSL (sinigrin and gluconapin) can be effectively recovered from mustard seeds after defatting by pressing and following extraction of grinded meal in ethanol water solution at 40°C, with 40% of ethanol and a liquid/solid ratio of 10. Application of HVED (40kV, up to 500 pulses) instead of grinding allowed recovery 97% of sinigrin and 75% of gluconapin. Compared to grinding, HVED assisted extraction is more rapid (5 min at *n*=350 vs. 8 min), more efficient (97% vs 87%) and less energy costly (233 kJ/kg vs. 577 kJ/kg). In addition, HVED assisted extraction is more selective because only 3.2% of proteins were co-extracted with GSL. HVED can be considered as an alternative green process for the intensification of extraction of GSL since no additional organic solvent (ethanol) was needed. The

nutritional quality of the residual cake after extraction has been conserved with high protein content and very low concentration in GSL, being thus considered as a « simple zero » cake very suitable for animal feeding.

Acknowledgments

We thank Mr. Jérôme Gervais and "Chambre d'Agriculture de la Côte-d'Or" (Bretenière, France) for providing seeds. We also thank SAS PIVERT for their financial support.

References

Adda, P., Boussetta, N., Lesaint, O., Vorobiev, E (2016). 'High-Voltage Electrical Discharge Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Grape Seeds'. In: D. Miklavcic. Handbook of Electroporation, Springer, pp. 2799-2824.

Adda, P., Lesaint, O., Boussetta, N., Vorobiev, E. (2018). 'Vapor bubble and streamer initiation in water under long duration impulses', *{IEEE} Trans. Dielectr. Electr. Insul.*, 25(5), pp. 1967-1973.

Almohammed, F., Koubaa, M., Khelfa, A., Nakaya, M., Mhemdi, H. and Vorobiev E. (2017). 'Pectin recovery from sugar beet pulp enhanced by high-voltage electrical discharges', *Food. Bioprod. Process*, 103, pp. 95-103.

Bennett, R. N., Mellon, F. A. and Kroon, P. A. (2004). 'Screening crucifer seeds as sources of specific intact glucosinolates using ion-pair high-performance liquid chromatography negative ion electrospray mass spectrometry', *J. Agric. Food Chem.*, 52(3), pp. 428–438.

Bhandari, S. R., Jo, J. S. and Lee, J. G. (2015). 'Comparison of glucosinolate profiles in different tissues of nine brassica crops', *Molecules*, 20, pp. 15827–15841.

Bogaert, L., Mhemdi, H. and Vorobiev, E. (2018). 'Impact of pretreatments on the solid/liquid expression behavior of canola seeds based on the simplified computational method', *Ind. Crop. Prod.*, 113, pp. 135-141.

Bohinc, T., Goreta-Ban, S., Ban, D. and Trdan, S. (2012). 'Glucosinolates in plant protection strategies: A review', *Arch. Biol. Sci.*, 64(3), pp. 821–828.

Bones, A. M. and Rossiter, J. T. (1996). 'The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry', *Physiol. Plant.*, 97, pp. 194–208.

Boussetta, N., Lanoisellé, J.L., Bedel-Cloutour, C. and Vorobiev, E. (2009). 'Extraction of soluble matter from grape pomace by high voltage electrical discharges for polyphenol recovery: Effect of sulphur dioxide and thermal treatments', *J. Food Eng.*, 95(1), pp. 192-198.

Bradford, M.M. (1976). 'A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding'. *Anal. Biochem*. 72, pp. 248–254.

Cherubini, F. (2010). 'The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals', *Energ. Convers. Manage.*, 51(7), pp. 1412-1421.

Clarke, D. B. (2010). 'Glucosinolates, structures and analysis in food', *Anal. Methods*, 2(4), pp. 310–325.

Cools, K. and Terry, L. A. (2012). 'Comparative study between extraction techniques and column separation for the quantification of sinigrin and total isothiocyanates in mustard seed', *J. Chromatogr. B*, 901, pp. 115–118.

Crank, J. (1975). *The mathematics of diffusion*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, UK.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. and Talalay, P. (2001). 'The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants', *Phytochemistry*, 56, pp. 5–51.

Grubb, C. D. and Abel, S. (2006). 'Glucosinolate metabolism and its control', *Trends Plant Sci.*, 11(2), pp. 89–100.

Guerrero-Diaz, M. M., Lacasa-Martínez, C. M., Hernández-Piñera A., Martínez-Alarcón, V. and Lacasa-Plasencia, A. (2013). 'Evaluation of repeated biodisinfestation using Brassica carinata pellets to control Meloidogyne incognita in protected pepper crops', *Span. J Agric. Res.*, 11(2), pp. 485–493.

Holst, B. and Williamson, G. (2004). 'A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds', *Nat. Prod. Rep.*, 21(3), pp. 425–447.

ISO 659 (2009). 'Oilseeds – Determination of oil content (Reference method)'.

ISO 5983-2 (2009). 'Animal feeding stuffs – Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content'.

ISO 9167-1 (1992). 'Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Part 1: Method using high-performance liquid chromatography'.

Karcher, A. and El Rassi, Z. (1999). 'Capillary electrophoresis of glucosinolates and their degradation products', *Electrophoresis*, 20(15–16), pp. 3181–3189.

Koubaa, M., Mhemdi, H., Sanlaville, Q. and Vorobiev, E. (2016). 'Recovery of Oil, Erucic Acid, and Phenolic Compounds from Rapeseed and Rocket Seeds', *Chem. Eng. Technol.*, 39(8), pp. 1431-1437.

Labergère, C. (2006). 'Les tourteaux gras ou tourteaux expeller et leur valorisation en alimentation animale', CETIOM, Service Valorisation et Transformation des graines, 67p.

Martín-Belloso, O. and Elez-Martínez, P. (2005). 'Enzymatic Inactivation by Pulsed Electric Fields', *Emerg. Technol. Food Process.*, pp. 155-181.

Merah, O. (2015). ‘Genetic Variability in Glucosinolates in Seed of Brassica juncea : Interest in Mustard Condiment’, *J. Chem.*, pp. 1–6.

Mhemdi, H., Bals, O., Grimi, N. and Vorobiev, E. (2012). ‘Filtration diffusivity and expression behaviour of thermally and electrically pretreated sugar beet tissue and press-cake’, *Sep. Purifi. Technol.*, 95, pp. 118-125.

Mhemdi, H., Koubaa, M., El Majid, A. and Vorobiev, E. (2016). ‘Solute and gas assisted mechanical expression for green oil recovery from rapeseed hulls’, *Ind. Crop. Prod.*, 92, pp. 300-307.

Mokrani, A. and Madani, K. (2016). ‘Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit’, *Sep. Purifi. Technol.*, 162, pp. 68-76.

Parniakov, O., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N. and Vorobiev, E. (2014). ‘Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels’, *Food Res. Int.*, 65, pp. 337–343.

Peleg, M. (1988). ‘An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves’, *J. Food Sci.*, 53(4), pp. 1216-1217.

Qin, B.-L., Zhang, Q., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G. and Pedrow, P.D. (1994). ‘Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields of different voltage waveforms’, *{IEEE} Trans. Dielectr. Electr. Insul.* 1(6), pp. 1047-1057.

Sanchez-Vega, R., Mujica-Paz, H., Marquez-Melendez, R., Ngadi, M.O. and Ortega-Rivas, E. (2009). ‘Enzyme inactivation on apple juice treated by ultrapasteurization and pulsed electric fields technology’, *J. Food. Process. Pres.*, 33(4), pp. 486-499.

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P. T. W. and Desmarchelier, J. M. (1998). ‘Biofumigation potential of brassicas’, *Plant Soil*, 201(1), pp. 103–112.

Sato, T., Fukuda, F., Nihei, K. and Itoh, N. (2017). ‘Effect of temperature and pressure on the extraction of strawberry receptacles with a mixture of supercritical carbon dioxide and entrainers’**,** *J. Supercrit. Fluid.*, 130, pp. 23-29.

Sotelo, T., Lema, M., Soengas, P., Cartea, M. E. and Velasco, P. (2015). ‘In vitro activity of Glucosinolates and their degradation products against Brassica-pathogenic bacteria and fungi’, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, pp. 432–440.

Tsao, R., Yu, Q. Potter, J. and Chiba, M. (2002). ‘Direct and Simultaneous Analysis of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Mustard Samples by High-Performance Liquid Chromatography’, *J. Agric. Food Chem.*, 50(17), pp. 4749–4753.

Vorobiev, E. and Lebovka, N. (2010). ‘Enhanced extraction from solid foods and biosuspensions by pulsed electrical energy’, *Food Eng. Rev.*, 2, pp. 95–108.

Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2018a). 'Comparison of conventional and ultrasound-assisted aqueous extraction of soluble matter and phenolic compounds from apple flesh', *Eur. Food. Res. Technol.*, 224(9), pp. 1683-1689.

Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N., Vorobiev, E. (2018b). 'Effects of ultrasound treatment and concentration of ethanol on selectivity of phenolic extraction from apple pomace', *Food. Sci. Technol.*, 53(9), pp. 2104-2109.

Wathelet, J.-P., Iori, R., Leoni, O., Quinsac, A. and Palmieri, S. (2004). 'Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation', *Agroindustria*, 3(3), pp. 257–266.

Zhao, W. and Yang, R. (2017). 'Pulsed Electric Fields for Inactivation of Endogenous Enzymes in Foods', Handbook of Electroporation, Springer, Cham, pp. 2239-2251.

III.2.2. Extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons ont également été utilisés comme traitement afin d'endommager les parois cellulaires et améliorer l'extractibilité des glucosinolates. L'extraction assistée par US a été réalisée dans les conditions d'extraction optimisées précédemment définies via une solution d'éthanol à 40%, à 40°C, avec un ratio solide-liquide de 10. Le traitement est dans un premier temps réalisé à température constante avec différentes puissances afin d'évaluer l'effet mécanique des US. La Figure III-2 montre que les ultrasons ne présentent pas d'impact significatif sur l'endommagement des parois cellulaires avec des rendements qui restent sensiblement proches de ceux obtenus sans traitement même à puissance élevée : par exemple le rendement d'extraction pour 30 min passe seulement de 43.4% sans traitement (tourteau brut) à 49.4% à 400W pour la sinigrine, et de 36.8% à 38.1% pour la gluconapine.

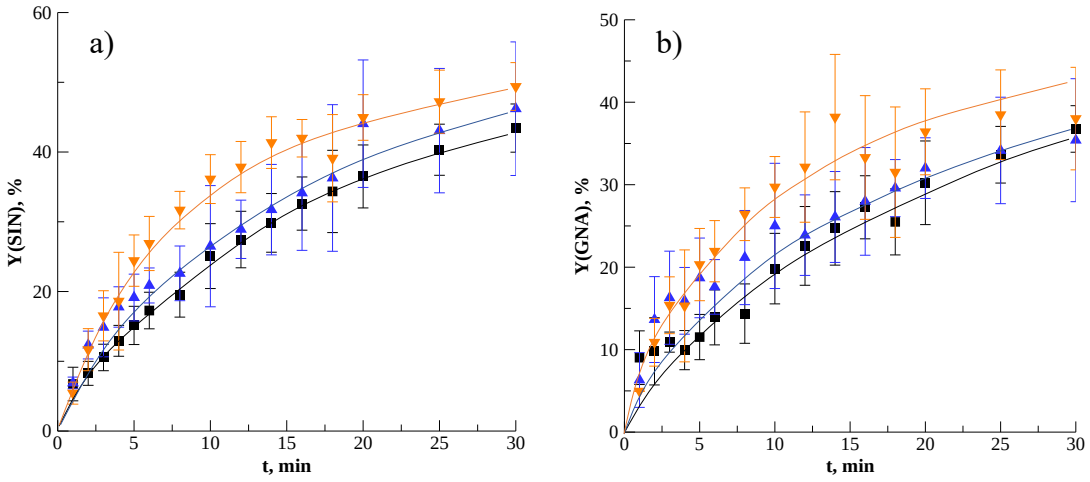


Figure III-2 - Cinétiques d'extraction de a) sinigrine b) gluconapine en fonction de la puissance des ultrasons (■) sans traitement (tourteau brut) (▲) 200, (▼) 400W. Conditions opératoires : 40% éthanol, 40°C, 10g de solvant par g de matière.

Le calcul des rendements pour une durée d'extraction infinie d'après le modèle de Peleg et les coefficients de transfert des GSL confirment également le faible effet des ultrasons sur l'endommagement du tourteau (Tableau III-2) : la concentration infinie augmente seulement de 81.3 µmol/g MS pour la sinigrine (Y∞ = 63%) et 9.1 µmol/g MS pour la gluconapine (Y∞ = 61%) à 84.0 µmol/g MS (Y∞ = 65%) et 9.4 µmol/g MS (Y∞ = 63%) à 400W. Le traitement par ultrasons ne parait par conséquent pas adapté comme procédé d'intensification pour l'extraction de biomolécules à partir du tourteau.

Tableau III-2 – Influence du traitement US sur les rendements infinis et les coefficients de transfert des GSL

Traitement	Ø	200 W	400 W
Sinigrine			
C_∞ (µmol/g MS)(1)	81.3	84.4	84.0
$k.10^{-2}$ (min^{-1})	4.32	5.68	6.86
R^2	0.972	0.919	0.914
Gluconapine			
C_∞ (µmol/g MS)	9.1	10.2	9.4
$k.10^{-2}$ (min^{-1})	3.30	4.01	5.83
R^2	0.967	0.930	0.910

(1) estimés d'après le modèle de Peleg

Les extractions assistées par US sans contrôle de la température montrent que les rendements d'extraction sont considérablement améliorés en augmentant la puissance du fait de l'augmentation de la température du milieu (Figure III-3). Une puissance plus élevée entraîne une augmentation plus rapide de la température favorisant la libération des solutés. Le rendement d'extraction de la sinigrine à 30 min passe par exemple de 43.4% sans traitement à 50.8% à 100W, 61.3% à 200W et 80% à 400W. La forte augmentation de température à puissance élevée (ΔT=36°C à 400W, 30 min) imposerait cependant la necessité de réguler la température au cours de l'extraction afin d'éviter les pertes de solvant ou la dégradation thermique de certains composés et limiter l'extraction de so-solutés indésirables.

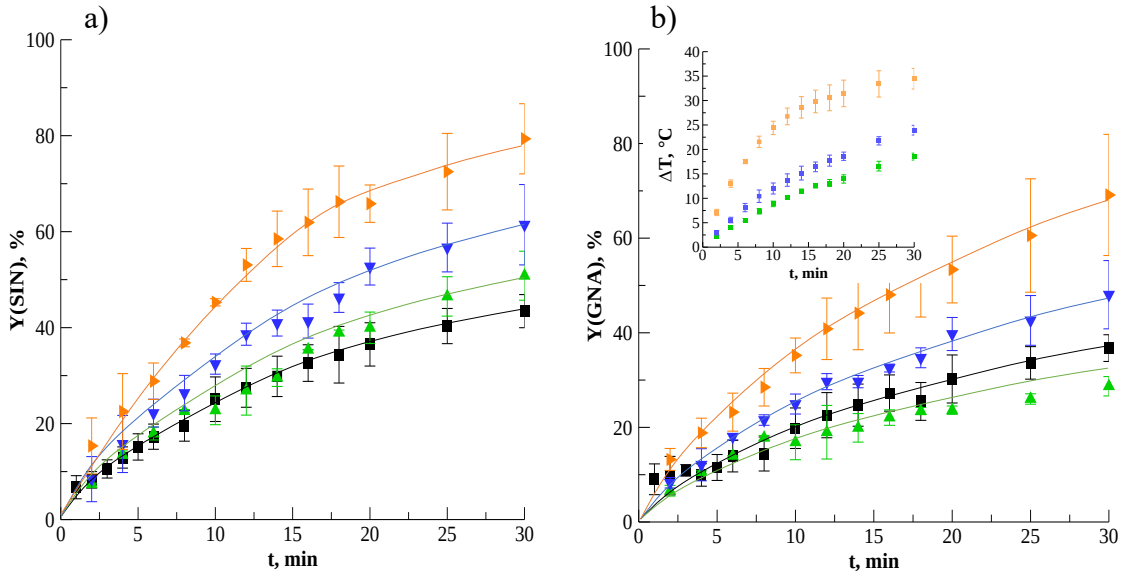


Figure III-3 - Cinétiques d'extraction de a) sinigrine b) gluconapine au cours de l'extraction assistée par US en fonction de la puissance (■) sans traitement (▲) 100 W, (▼) 200 W, (►) 400 W. L'insert représente l'élévation de température au cours du temps en fonction de la puissance.

En effet la Figure III-4 montre que l'extraction des protéines est également favorisée à haute température. L'augmentation du rendement est négligeable à 100W par rapport à l'extraction sans traitement du fait de la plus faible élévation de température par rapport à 200W et 400W. Le rendement à 30 min passe de 3.3% sans traitement à 4.3% à 200W et est quasiment doublé à 400W (5.8%) (T>60°C après 6 min de traitement).

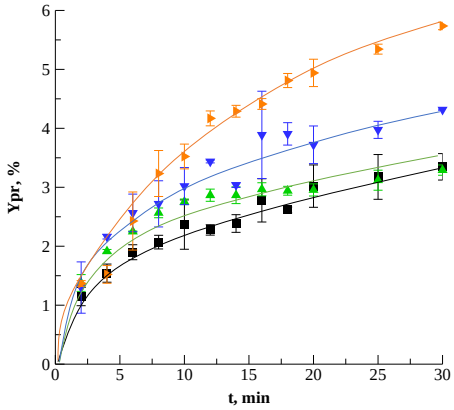


Figure III-4 - Cinétiques d'extraction des protéines au cours de l'extraction assistée par US en fonction de la puissance (■) sans traitement (▲) 100 W, (▼) 200 W, (►) 400 W.

III.2.3. Comparaison des différents procédés d'extraction et bilan

Les performances des trois méthodes d'extraction précédemment étudiées (diffusion avec broyage (*E*), extraction assistée par ultrasons (*US*), décharges électriques haute tension (*DEHT*)) sont comparées Figure III-5 en termes de rendement d'extraction, sélectivité et d'efficacité énergétique (énergie consommée en kJ/kg par rapport à la quantité extraite de GSL), pour un temps d'extraction équivalent (8 min). Pour les décharges électriques, 8 min correspond au temps de séjour des graines dans la cellule pour un temps de traitement effectif de 5 ms (500 impulsions de 10 µs, à une fréquence de 1 Hz).

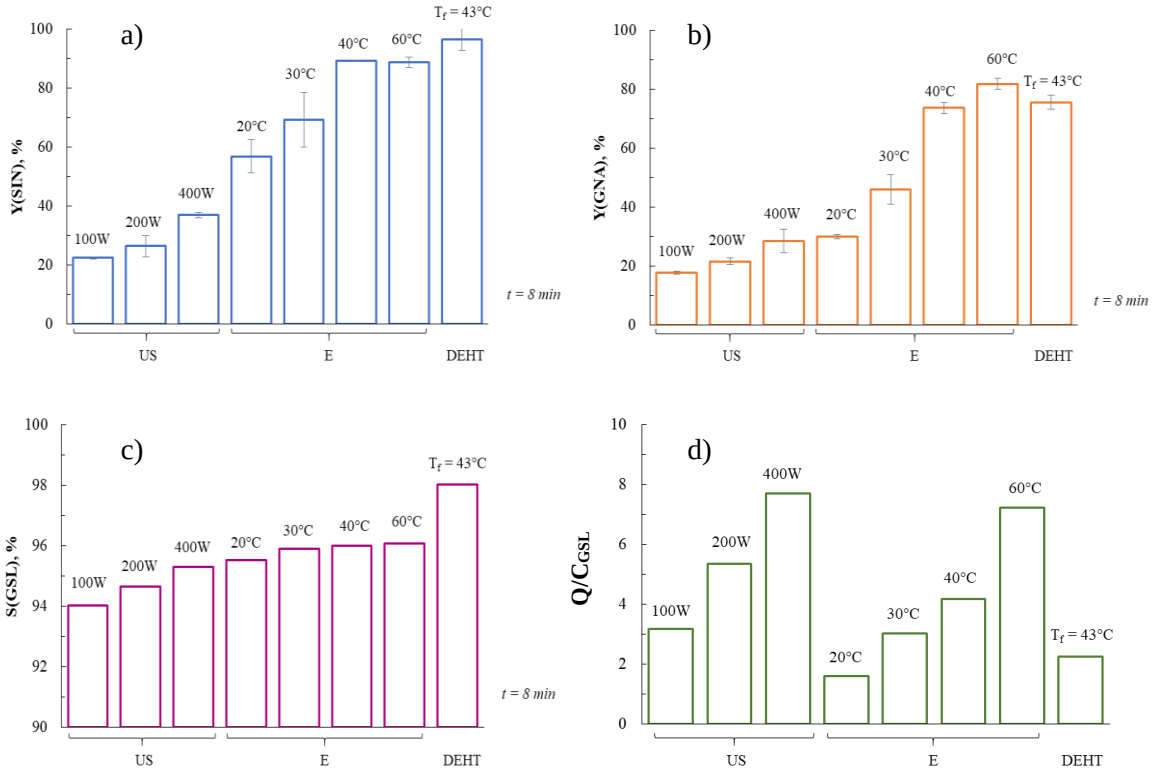


Figure III-5 – Rendement en a) sinigrine b) gluconapine, c) sélectivité globale d'extraction et d) paramètre d'efficacité énergétique, obtenus par extraction conventionnelle E (T=20-60°C) avec broyage, extraction assistée par US (P=100-400W) et extraction assistée par DEHT (40 kV)

Il apparait que les DEHT donnent les meilleurs rendements d'extraction (97 et 75.6% de sinigrine et gluconapine, respectivement) par rapport à une extraction par diffusion à température plus élevée (88.8 et 79.9% de sinigrine et gluconapine respectivement, $E_{60°C}$) et l'extraction assistée par US à forte puissance (36.9 et 28.5%, 400W, T_{finale} = 60°C) pour également la meilleure sélectivité (98% vs 96.1% $E_{60°C}$ vs 95.3% US_{400W}). Au-delà de la température, le degré d'endommagement du tourteau semble le facteur critique pour l'extraction des glucosinolates. Les résultats US ont montré que le phénomène de cavitation présentait peu d'impact sur la destructuration du tourteau avec des rendements qui restaient similaires à un tourteau non traité. Le broyage initial de la matière permet une diffusion initiale rapide des glucosinolates mais dont l'extraction atteint rapidement un plateau vers 5 min quelles que soient les conditions (solvant, température, ratio L/S). L'efficacité des DEHT repose sur les effets physiques et mécaniques des décharges électriques puisque la température au cours du traitement reste relativement faible. La génération des ondes de choc, s'accompagnant également généralement de formation de bulles de cavitation, joue un rôle important dans la fragmentation du matériel, facilitant l'extraction des glucosinolates. Les DEHT combinent ainsi les effets des US (cavitation) et du broyage assurant l'amélioration de l'extraction des GSL avec l'augmentation du degré d'endommagement du tourteau avec le nombre d'impulsions appliquées (Figure III-6).

Figure III-6 – a) Tourteau brut b) Aspect du tourteau résiduel après un traitement DEHT (40 kV) de 5 ms

Enfin les DEHT se révèlent le plus intéressant de par leur efficacité énergétique (2,2) deux fois plus faible que l'extraction par diffusion dans les conditions optimisées (4.2) et 3 fois plus faible que l'extraction par US dans les conditions les plus sévères (8,1, US_{400W}). Les DEHT représentent ainsi un procédé innovant, efficace et peu coûteux pour l'extraction sélective de biomolécules de faible poids moléculaire à partir de matière végétale.

III.3. Purification des glucosinolates

III.3.1. Purification des glucosinolates par résines échangeuses d'ions

III.3.1.1. Résumé de l'article

Cet article a pour objectif la purification des extraits riches en glucosinolates par chromatrographie via l'utilisation de résines échangeuses d'anions. La littérature rapporte de nombreuses techniques chromatographiques pour l'isolation et la purification des glucosinolates via la chromatographie sur colonne en utilisant l'alumine, la chromatographie à contre-courrant ou la chroamtographie liquide haute performance. La norme ISO 9167-1 préconise l'utilisation d'une résine Sephadex menant à la désulfatation des glucosinolates. Or les glucosinolates doivent être récupérés dans leur forme intacte pour exploiter leur activité biologique. La séparation par échange d'ions est basée sur l'adsorption des molécules sur une résine matricielle chargée. L'adsorption se produit en parallèle de la libération d'autres ions présents sur la matrice, entrainant un échange d'ions. Les ions adsorbés sont ensuite récupérés via une étape de désorption avec un éluant.

L'étude est dans un premier temps réalisée en batch où le jus est mis en contact avec une certaine quantité de résine sous agitation. Deux résines anioniques (forte et faible) ont été préalablement étudiées vis-à-vis de leur capacité d'adsorption et sélectivité des glucosinolates. Les analyses ont montré que la résine forte présente de meilleurs taux et capacité d'adsorption par rapport à la résine, liée à une meilleure affinité des glucosinolates avec l'amine quaternaire de la résine forte (groupe fonctionnel) par rapport à l'amine tertiaire de la résine faible. L'analyse de la résine par FTIR après adsorption montre entre autres une diminution significative de la bande à 3100-3500 cm^{-1} indiquant la libération des ions OH- du support matriciel, remplacés par la sinigrine donc on retrouve des pics caractéristiques par comparaison avec le spectre de la sinigrine commerciale (standard). Les résultats montrent également que la température présente un effet bénéfique sur l'adsorption avec l'augmentation des taux et capacités d'adsorption de la résine avec la température. Les isothermes obtenues ont permis d'étudier le mécanisme d'adsorption à travers l'application des modèles de Langmuir et Freuudlich. Le modèle de Langmuir a présenté une meilleure corrélation avec les données expérimentales, indiquant une adsorption en monocouche. Les cinétiques d'adsorption suivent un modèle de pseudo second ordre et l'application du modèle de diffusion intraparticulaire a mis en évidence plusieurs mécanismes contrôlant le processus d'adsorption. L'application du modèle de Temkin a également montré que la réaction d'adsorption est endothermique ($\Delta H=Q>0$). La résine forte a été sélectionnée pour la suite de l'étude.

L'optimisation de la désorption des glucosinolates a été réalisée en étudiant l'influence du sel d'élution, de sa concentration et du sel d'élution. L'utilisation de NaCl à 1M a permis la récupération de 73% de la sinigrine avec une pureté de jus de 80%. Une solution de NaOH (2%, 2 mL/g_{resine}) est utilisée pour la régénération de la résine.

Finalement, le procédé a été testé en dynamique (colonne). Les résultats ont montré la nécessité de travailler à faible temps d'élution (augmentation du temps de séjour du jus) afin d'augmenter la désorption des glucosinolates. 49.3% de la sinigrine et 10.8% de la gluconapine ont été désorbés à 2.6 BV/h. L'augmentation de la force éluante par la diminution du pH de l'éluant a permis d'augmenter ces taux à 64.5% et 28% respectivement. L'isolation des glucosinolates par résines échangeuses d'ions est une technique simple et efficace et une comparaison des performances d'adsorption/désorption de plusieurs résines fortement anioniques pourrait être explorée dans l'avenir.

III.3.1.2. Article

Isolation and purification of glucosinolates by macroporous anion-exchange resin

Mathieu HEBERT, Emmanuel SERRA, Houcine MHEMDI, Eugène VOROBIEV

Abstract

Glucosinolates (GSL) (β-thioglucoside-*N*-hydroxysulfates) are rich-sulfur secondary metabolites raising potential biofumigation interest due to their biologicial properties. Sinigrin and gluconapin are the main glucosinolates presented in brown mustard seeds (*Brassica juncea*). These glucosinolates are very suitable for the development of phytosanitory formula due to their fungicidal, bactericidal and insecticidal effects. In this work, isolation and purification of sinigrin and gluconapin extracted from defatted mustard seeds was studied meaning macroporous anion exchange resins. A strongly and a weakly anionic resin were first tested according to the nature of functional group and through their selectivity towards glucosinolates. Anion-exchange resin purification was done in both static (batch) mode in order to determine the optimal operating conditions, and purification was then tested in a dynamic (continuous) mode (column) to validate the process. In a static mode, the adsorption behavior and characteristics of both resins were compared. The results show that the strongly basic resin PA312LOH demonstrates better adsorption of glucosinolates and Freundlich isotherm permits the fitting of experimental data. PA312LOH resin was selective for glucosinolates purification towards the proteins. This effect of selectivity was also supported by IR analysis. The desorption of glucosinolates was then investigated. Firstly, optimizing of operational conditions was done in static (batch) experiments by studying the effects of salt concentration and the eluate-resin ratio. This preliminary optimization allowed recovering 72.9% of intact sinigrin. Juice purity was increased from 43.05% to 79.63%. Dynamic (continuous mode) experiments allowed recovery of 64.5% of sinigrin and 28% of gluconapin modifying the eluent ionic strength and the flow rate. Glucosinolates purification using macroporous anion exchange resins is economical, safety and environmentally friendly method, and a life cycle of resins can be significantly increased thanks to the simple regeneration process using NaOH solution.

Keywords: *Brassica juncea*, glucosinolates anion-exchange resin, purification

I. Introduction

Glucosinolates (GSL) (β-thioglucoside-*N*-hydroxysulfates) are rich-sulfur secondary metabolites raising potential biofumigation interest due to their biologicial properties. These molecules are inactive in their native form but they are precursors of various highly reactive products presenting fungicidal, bactericidal and insecticidal properties (Fahey *et al.*, 2001; Holst and Williamson, 2004; Grubb and Abel, 2006; Diaz *et al.*, 2013; Sotelo *et al.*, 2015). This raises the interest of GSL as natural biopesticides and suitable biofumigant agents (Sarwar *et al.*, 1998; Holst and Williamson., 2004) for crop protection instead of chemical products (Bohinc *et al.*, 2012). *Brassica juncea*, commonly known as Indian or brown mustard, represents one of the main plants rich in GSL. Sinigrin and gluconapin are the major GSL in mustard seeds (Figure). They are inactive unless interacting with an endogene enzyme called myrosinase (ß-thioglucosidase, E.C. 3.2.1.147) to produce allyl and but-3-enyl isothiocyanates (AITC & BITC) respectively (Bones and Rossiter, 1996; Karcher *et al.*, 1999). These hydrolysis products are biologically reactive, but they are very volatile. In this context, GSL should be recovered and purified in their native form to formulate suitable biofumigant agent.

The isolation and purification of glucosinolates have been documented meaning different chromatography methods including alumina column chromatography (Zhou *et al*., 2005; Song *et al*., 2006; Xie *et al*., 2012), preparative high-speed counter-current chromatography (Fahey et al., 2003), preparative high performance liquid chromatography (Rochfort *et al*., 2006 ; Lee *et al*., 2011), and strong ion-exchange centrifugal partition chromatography (Toribio *et al*., 2007 ; Hamzaoui *et al*., 2012). These techniques are mainly used to isolate glucosinolates as standards for direct commercial use. Globally, mentioned techniques have unsatisfying recovering yield, can use environmentally harmful chemical products, and present restrictions of scale-up.

The purpose of our study is to propose an alternative, efficient and simple method for the isolation and purification of glucosinolates using macroporous ion-exchange resins. As compared to previously cited methods, this technique is more environmentally friendly, adapted for the continous production at large scale and less energy costly. The separation by ion exchange resine is based on the adsorption of the ionized targeted molecules on the resin matrix. The trapping of ions occurs along with the accompanying release of other ions, resulting in ions exchange. The trapped ions are then recovered during the desorption step using an eluent. Ion-exchange resins are widely used in different separation purification and decontamination processes: typically for water softening and purification, sugar manufacturing, metals separation (Kiefer and Höll, 2001), fruit juice purification (Delmousse and Poupinel, 1951, Vera et al., 2003; Reynaud et al., 2016), and pharmaceuticals manufacturing (Elder, 2005).

The literature review reveals that the applicability of ion-exchange resin technique for the purification of GSL was very few studied yet and purification of GSL is commonly proposed through ISO 9167-1, where a DEAE Sephadex resin leads to desulphation of GSL. In this line, our work is aimed to study and to optimize the purification of intact GSL using ion-exchange resin. For this purpose, mustard seeds were first pressed to obtain oil and a defatted meal rich in GSL. Solid/liquid extraction was performed using water/ethanol mixture for GSL extraction. The obtained crude juice was rich in GSL in their native form, but it contains many impurities such as proteins, sugars, colloids, etc. Purification of this juice was investigated using strongly (PA312LOH) and weakly anionic resins (RAM1). The study was performed in static mode to optimize the process by tuning experimental conditions (temperature, resin/juice ratio, time). Selectivity of separation was considered and experimental adsorption kinetics

were modeled. Finally, the studied process was tested and validated in dynamic mode at the laboratory scale.

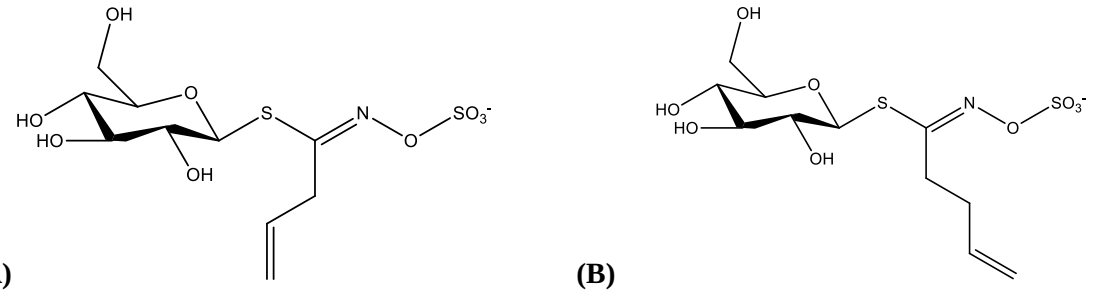


Figure 1 – Chemical structure of (A) sinigrin and (B) gluconapin

II. Material and methods

II.1. Chemicals and reagents

Sinigrin monohydrate as standard was purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Glucotropeoalin was provided by Terres Inovia (Ardon laboratory, France). Acetonitrile, ethanol, tetraheptylammonium bromide, sodium phosphate monobasic anhydrous werepurchased from Fischer Scientific (Illkirch, France). Bradford reagent and salts pellets KCl and NaCl were provided by VWR (Strasbourg, France).

II.2. Ion exchange resins

Two types of macroporous ion-exchange resin have been investigated for the purification including a strongly basic anion exchange resin PA312LOH and a weakly basic anion-exchange resin RELITE RAM1 supplied by Mitsubishi Chemical (Tokyo, Japan). Physical properties of resins are summurized in Table 1. The resins were cleaned with deionized water before their use.

Table 1 - Physical properties of the macroporous ion-exchange resins used

Parameter	PA312LOH	RELITE RAM1
Polymeric matrix	Styrène	Styrène-DVB
Functional group	Quaternary amine	Tertiary amine
Density (g/mL)	1.1	1.03 – 1.05
Exchange capacity (eq/L)	0.9	1.5
Particle diameter (mm)	0.45	0.7
Moisture content (%)	43-55	50-58

II.3. Preparation of juice

The crude juice was prepared from brown mustard seeds (*Brassica juncea*, Etamine) cultivated and harvested in Dijon in 2017 and supplied by Chambre d'Agriculture Côte d'Or (Bretenière, France). HPLC analysis have shown that seeds are rich in oil (33.9 %), proteins (28.1 %) and glucosinolates: sinigrin (94.7 µmol/g DM) and gluconapin (10.9 µmol/g DM).

First of all, seeds were subjected to a thermal treatment to inactivate the myrosinase, an endogene enzyme responsible for GSL hydrolysis. The inactivation was performed by dipping a sealed bottle

containing the seeds in hot bathwater (Julabo SW22) at 90°C during 70 min. Analysis showed that this thermal treatment allowed almost total (97%) inactivation of the enzyme. Treated seeds are then flaked (cylinder Trilabo 100 x 200 grinder) and twice pressed at 80°C for 60 min using a laboratoy hydraulic press (Creusot-Loire, France). 84% of the oil was extracted, and obtained press-cake was used for GSL extraction.

GSL recovery was performed meaning a solid/liquid extraction under controlled stirring and temperature conditions. Optimization study permitted recover 90% of the intact glucosinolates during 8 min using water/ethanol solution (60/40, v:v) and temperature 40°C. The obtained juice was rich in glucosinolates (3.46 and 0.27 g/L of sinigrin and gluconapin, respectively) and proteins (1.95 g/L). The objective of the following purification step is to separate GSL and proteins in order to obtain a purified juice rich in GSL

II.4. Juice purification

Anion-exchange resin purification was first done in a static (batch) mode in order to determine the optimal operating conditions, and purification was then tested in a dynamic (continuous) mode (column) to validate the process.

II.4.1 Static mode (batch) purification

II.4.1.1. Adsorption and desorption

Static mode (batch) experiments were performed by mixing 50 mL of the crude juice with a constant mass of resin (resin concentration was 10 to 100 g/L) in a flask under controlled stirring (300 rpm), and temperature (20-60°C) for 120 min. Liquid samples were taken regularly. Samples were filtered through 0.45 µm membrane filter and analyzed by HPLC for GSL quantification. For each sample, the adsorption capacity q_e (mg/g) and the ratio of adsorption E (%) were calculated using Eq (1) and (2) respectively:

$$q_e = \frac{(C_0 - C) \times V}{m_r} \quad \text{(Eq. 1)}$$

$$E = \left[\frac{(C_0 - C)}{C_0} \right] \times 100 \quad \text{(Eq. 2)}$$

q_e represents the mass of solute adsorbed on 1 g resin at adsorption equilibrium point. E represents the part of solute adsorbed at adsorption equilibrium point.C_0 and C (mg/mL) represent the initial and actual concentration of GSL, V (mL) is the initial volume of juice, and m_r is the mass of resin (g).

At the end of the adsorption step, resins were recovered, washed with deionized water, and the desorption was carried out under stirring of 300 rpm at 30°C for 120 min. The influence of the eluent (KCl, NaCl), its concentration (0.3 to 1.5 mol/L) and the solid-liquid ratio (20 to 40 mL/g_{resin}) were investigated. Samples were taken regularly and analyzed to determine the concentration of desorbated GSL in the eluent. The desorption ratio D (%) was calculated using Eq (3).

$$D = \left[\frac{C_d \times V_d}{(C_0 - C_e) \times V} \right] \times 100 \quad \text{(Eq. 3)}$$

Where C_d is the concentration of desorbate in the eluent (mg/mL), C_e is the equilibrium concentration of adsorbate in solution (mg/mL), and V_d is the volume of eluent (mL)

II.4.1.2. Modelling of adsorption process
II.4.1.2.a. Isotherms of adsorption

Experimental data were fitted with Langmuir and Freundlich equations, most frequently applied models for the description of solutes adsorption.
The Langmuir equation is a simple model, which describes a monolayer adsorption with equal adsorption sites. The adsorption capacity and concentration of solute in solution at the equilibrium are bond according to the Eq. 4:

$$q_e = \frac{q_0 K_L C_e}{1 + K_L C_e} \qquad \text{(Eq. 4)}$$

Where q_e and q_0 are respectively the adsorption capacity at the equilibrium and the maximal adsorption capacity (mg/g), C_e is the equilibrium solute concentration (mg/mL), and K_L (mL/mg) is the adsorption equilibrium constant. The favorability of the adsorption described by the model of Langmuir can be represented with a dimensionless parameter R_L defined as follow:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_0} \qquad \text{(Eq. 5)}$$

With C_0 is the initial concentration of the solute adsorbed. Values of R_L, defined as separation factor, indicate the favorability of the adsorption: unfavorable when $R_L>1$, favorable when $0<R_L<1$ and irreversible when $R_L=0$.
The Freundlich equation (Eq. 6) describes a multilayer adsorption with heterogeneous behavior of adsorption sites. It can also be used to describe a monolayer adsorption:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \qquad \text{(Eq.6)}$$

Where K_F and n are the empirical constants. K_F represents an indicator of adsorption capacity and the ratio 1/n is an indicator of sorption favorability. The value of parameter 1/n between 0.1 and 0.5 indicates a good feasibility of adsorption, while adsorption can be less favorable when the parameter 1/n is higher than 0.5, and it can be very difficult to happen when 1/n exceeds 1 (Treybal, 1981).
The thermodynamic behavior of adsorption was studied and characterized using Temkin equation:

$$q_e = \frac{RT}{\Delta Q} \ln(K_T C_e) \qquad \text{(Eq. 7)}$$

Where K_T (mL.g^{-1}) is the equilibrium constant and ΔQ (J.mol^{-1}) is the Temkin constant related to sorption heating.

II.4.1.2.b. Adsorption kinetics

The description of mechanism of adsorption of glucosinolates were modeled using pseudo first order model (Lagergren model) (Eq. 8) and pseudo second order model (Eq. 9) (Kajjumba *et al*., 2018) :

$$\ln\left(q_e - q_t\right) = \ln q_e - K_1 t \qquad \text{(Eq. 8)}$$

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{q_e} t + \frac{1}{K_2 q_e^2} \qquad \text{(Eq. 9)}$$

Where q_t is the actual adsorption capacity, K_1 is the constant rate (min^{-1}) estimated by plotting $ln\ (q_e\text{-}q_t)$ versus t, and K_2 (g/mg.min) is the constant rate estimated by plotting t/q_t versus t.
The intra-particle diffusion model was used to investigate the mechanism of diffusion. This model is commonly decribed according to the equation of Webber and Morris (Eq. 10) :

$$q_t = K_i t^{0.5} + C \qquad \text{(Eq. 10)}$$

With K_i is the intra-particle diffusion rate constant ($mg/g.min^{0.5}$) and C is an indicator of of boundary layer thickness.

II.4.1.3. Regeneration of resins

After desorption experiments, the resins were regenerated meaning a solution of NaOH. Concentration of NaOH (2-8%) and the liquid/solid ratio (2 to 8 mL/g) were used. Washing continued for 30 min under the stirring (300 rpm). After the washing, resins were rinsed with deionized water to remove the regenerant solution and a new cycle of adsorption/desorption was performed. Efficiency of regeneration has been evaluated by comparing kinetics of adsorption of sinigrin from new and treated resin.

II.4.2 Dynamic purification

Dynamic adsorption and desorption experiments were carried out in a glass column with internal diameter of 22 mm. Column was manually packed with a 3 cm bed of resin giving a total volume of 11.4 cm^3. 50 mL of juice was flowed through the column with a flow rate of 5.3 BV/h meaning a peristaltic pump.
The adsorbed-loaded column was then washed with deionized water and eluted with a salt solution for the desorption. The adsorption and desorption experiments were performed in the optimal conditions previously determined in the static mode. The impact of the flow rate (2.6-5.3 BV/h) and pH of eluent on the desorption efficiency was tested. Samples were collected every 4 mL for the analysis of GSL to evaluate the efficiency of separation.

II.5. Analysis

II.5.1. Juice purity

Chromatographic purity was determined based on HPLC response of GSL (area%) towards others peaks detected such as:

$$P_r = \frac{\Sigma A_{GSL}}{\Sigma A_{HPLC}} \qquad \text{(Eq. 11)}$$

Where ΣA_{GSL} are the summed areas of GSL (sinigrin and gluconapin) and ΣA_{HPLC} are the summed areas of detected components (glucosinolates and impurities). The purity of raw juice was estimated to 43.05% according to the HPLC chromatogram (Figure 2).

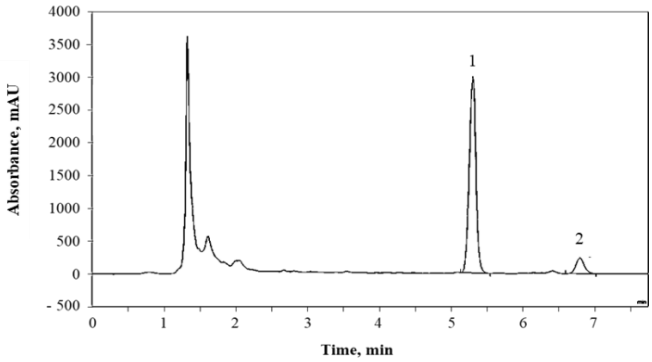


Figure 2 – HPLC chromatogram (229 nm) of raw juice. Retention times of sinigrin (1) and gluconapin (2) are respectively 5.3 and 6.9 min.

II.5.2. Determination of GSL content

The GSL concentration in juices was determined by reversed phase ion-pair liquid chromatography. HPLC experiments were performed on a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series equipped with Diode Array Detectors (DAD-3000 RS and MWD-3000 RS). A C18 column (Prontosil 250 x 4,6 mm 5.0 µM) was used for the analyses. Mobile phase consists in an acetonitrile-water solution (45%) with NaH_2PO_4 at 10 mM and THABr as counterion at 5 mM conditioned at pH 7.0. Analyses are performed with a mobile phase flow rate of 1,5 mL/min, UV wavelength of 229 nm, column temperature of 35°C. 20 µL of the sample are injected in the chromatograph, the elution is carried out in isocratic mode. A standard calibration curve was constructed from solutions of standard sinigrin from 0.1 mM to 4 mM. Gluconapin is determined by an internal method using glucotropaeolin as internal standard.

II.5.3. Determination of proteins content

The concentration of proteins in the juice was determined according to the Bradford method. The details of analysis are presented in Technical Bulletin for Bradford Reagent (B 6916, Sigma Aldrich).

II.5.4. Infrared characterization (FTIR)

Ion-exchange resins were analyzed before and their use, by Fourier transform infrared spectroscopy from press discs using a Nicolet iS5 ID1 Transmission FTIR Spectrometer (Thermo Scientific) and FTIR spectra were recorded in the range of 4000-400 cm^{-1}, averaging the data of 16 successive scan. In briefly, press dics were prepared from a mixture of resin and KBr pellets as powder. The functional groups of macroporous resin were characterized. The standard of sinigrin (commercial sinigrin monohydrate) was also analyzed and the different spectra were compared.

II.5.5. Statistical analysis

All the experiments were repeated at least three times. Means and standard deviations were calculated and presented on the figures as error bars.

III. Results and discussion

III.1. Optimization of the adsorption/desorption in a static (batch) mode

III.1.1. Adsorption kinetics and ratios of adsorption

Figure 3 presents the kinetics of adsorption of sinigrin (Fig. 3a) and gluconapin (Fig. 3b) using strongly basic resin (PA312LOH) and weakly basic resin (RAM1) at different concentrations under static conditions (30 °C, 300 rpm). It can be noticed that the adsorption ratio of both sinigrin and gluconapin increased highly at the beginning of process before reaching a plateau after about 60-70 min for sinigrin, and more rapidly (after 40 min) for gluconapin (Fig 3). For gluconapin, the adsorption ratio obtained at the same conditions is even higher than for sinigrin. For example, 83.2% of gluconapin was finally adsorbed using strongly basic resin PA312LOH at the concentration 20 g/L, while just 72.9% of sinigrin was adsorbed by this resin having the same concentration. It may be supposed than gluconapin have better affinity with the resin functional group than sinigrin. For instance, gluconapin was totally adsorbed after 30 min by the resin PA312LOH having the concentration of 30 g/L (Fig. 3a). However, more than 80 min were needed to adsorb nearly total quantity of sinigrin by the same resin, which was even more concentrated (40 g/L) (Fig. 3b). The difference of adsorption behavior between gluconapin and sinigrin may be attributed to their different chemical structure and their interaction with the functional group of resins. In fact, the occurrence of the further carbon on the side chain of gluconapin compared to sinigrin may induce more inductive effect (+I) and better stabilization of the complex formed with the amine group of the resin. In the other hand, the difference may be explained by the lower concentration of gluconapin in the crude juice as compared to sinigrin (0.27 vs 3.46 g/L).This difference of behavior of adsorption between both glucosinolates can also be found in Wang et al. (2014), where adsorption ratio of gluconapin was higher than sinigrin whatever the adsorbent. These results show that a selective separation of glucosinolates could be performed.

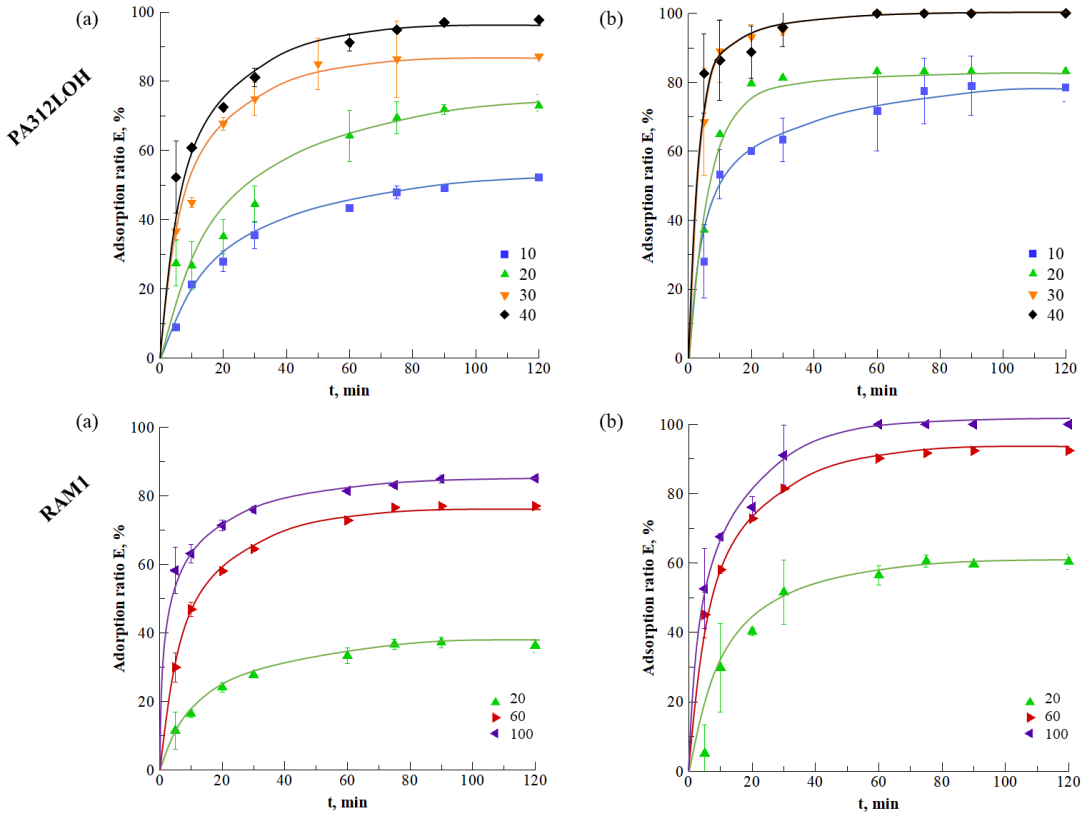


Figure 3 - Kinetics of adsorption of a) sinigrin and b) gluconapin using strongly basic resin (PA312LOH) and weakly basic resin (RAM1) at various solid-liquid ratio (g_{resin}/L_{juice}) under static conditions (30°C, 300 rpm).

Comparison of the tested resins show that the strongly basic resin PA312LOH is more efficient for the GSL adsorption as compared to the weakly basic resin RAM1 (Figure 4). Generally, the equilibrium adsorption capacity was twice higher with resin PA312LOH for both gluconapin and sinigrin (Figure): the adsorption capacity was increased from 58.2 to 127.5 mg/g and 9.1 to 14.2 mg/g for sinigrin and gluconapin respectively with the strong resin in comparison with the weakly one. The adsorption capacity for sinigrin is highly higher than gluconapin due to its initial higher concentration in the feed juice. This difference towards glucosinolates adsorption could be associated to the nature of the functional group. The quaternary amine group ($-N^+(CH_3)_3$) present in the PA312LOH resin can interact more efficiently with the anionic sulfate part SO_3^- of glucosinolates as compared to the tertiary amine of the RAM1 $N(CH_3)_2$, leading to a higher adsorption capacity. This result was preliminary confirmed by the measurement of pH increasing during adsorption. Analysis showed that the pH was increased from 6.1 to 10.3 for the strongly resin while it increased only until 6.7 with the weakly one. When PA312LOH resin was mixed with water, the pH increased from 7.3 to 7.7. These results indicate more OH^- anions were released after the adsorption of glucosinolates on the strong resin. The more glucosinolates are adsorbed, the more OH^- anions are released and higher is the pH showing higher affinity for adsorption. The better efficiency of strongly basic resins compared to weakly ones for the adsorption of glucosinolates was also put forward in Wang *et al*. (2014). It could be also noticed that the adsorption characteristics of the PA312LOH resin towards glucosinolates are very similar to the D261 resin used in the cited work, with equilibrium reached at 50 min for the adsorption of sinigrin on D261 resin at 20°C (Wang *et al*., 2012).

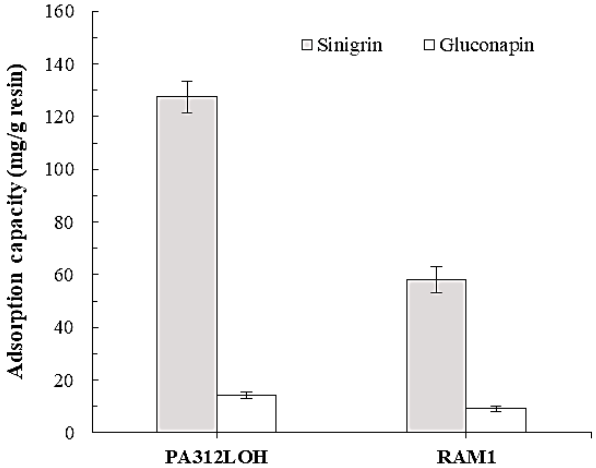


Figure 4 - Comparison of adsorption capacity of two macroporous anion-exchange resins towards glucosinolates

In order to better characterize the interactions between the resins and the adsorbed glucosinolates, PA312LOH resin was characterized by FTIR before and after adsorption, and at the end of the desorption step. The obtained spectra are presented in Figure 5. It can be observed that the functional group –$N^+(CH_3)_3$ is displayed by the spectral band around 885 cm^{-1}. Its presence can also clearly be identified thanks to vibrations of O-H bond linked with the quaternary charged nitrogen as $N^+(CH_3)_3$--OH^-. Before the adsorption (unused resin), O-H stretching and bending vibration are represented respectively by the broad band in 3,100-3,500 cm^{-1} and band in 1,640 cm^{-1}. Small peak in 975 cm^{-1} related to the O-H deformation vibration is also an indicator of the hydroxyl group. After the adsorption, these peaks and particularly the band in 3100-3500 cm^{-1} were decreased significantly, indicating that the most of O-H groups were replaced by the adsorbed sinigrin and gluconapin. Moreover, the peak of the adsorbed sinigrin can be found with peaks in 1060 cm^{-1} and 1270 cm^{-1}, as compared with the standard of sinigrin. After desorption, these peaks are significantly decreased, confirming the desorption of sinigrin.

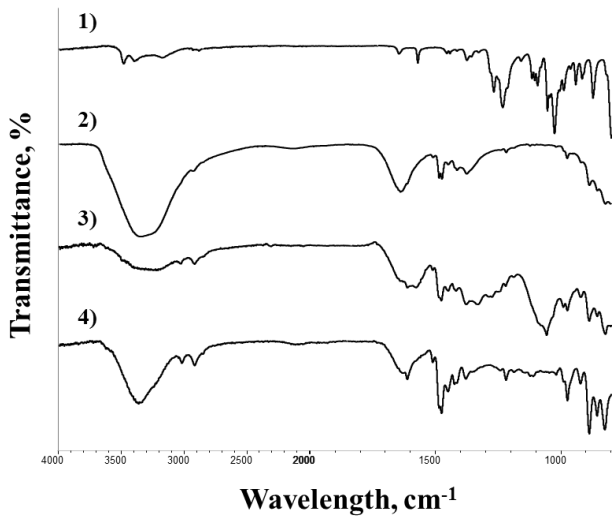


Figure 5 - IR spectra of 1) standard of sinigin 2) original PA312LOH resin 3) resin after adsorption 4) resin after desorption.

Considering the previous analysis, the mechanism of adsorption/desorption of the strongly basic resin PA312LOH can be illustrated by Figure 6.

.

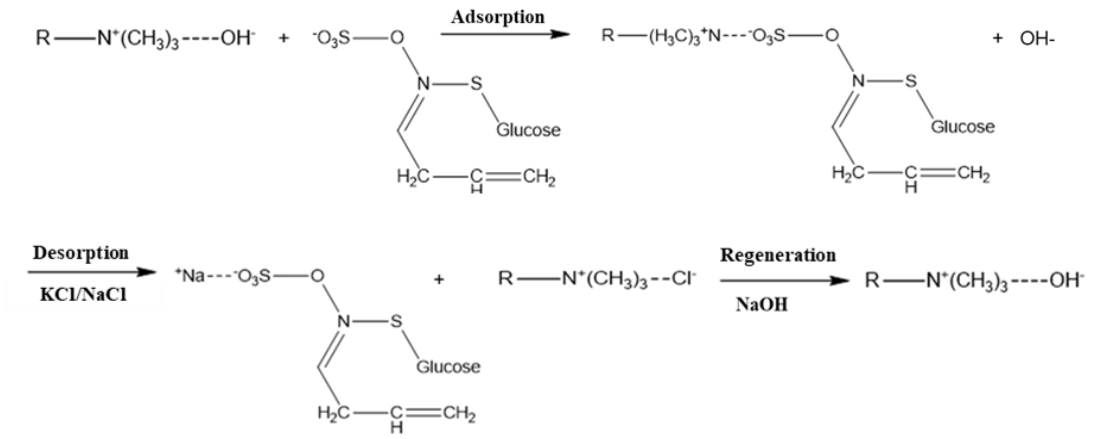


Figure 6 – Illustration of the mechanism of adsorption and desorption of glucosinolate (illustrated with sinigrin) using strongly basic anion-exchange resin PA312LOH

In order to evaluate the selectivity of adsorption, the proteins content in the juice was measured before and after adsorption. Results showed that proteins were not adsorbed by the resin and the concentration of proteins in the solution remained the same as in a crude extract. This may be explained by the fact that proteins are positively charged in the initial solution (pH 6.1) so they cannot react effectively with a resin of the same charge. PA312LOH resin was selected to study the impact of temperature on the adsorption efficiency.

III.1.2. Isotherms of adsorption

The adsorption temperature was varied in the range of 20-60°C and the adsorption kinetics were determined. Figure 7 shows that the temperature increase leads to more rapid adsorption kinetics. For example, for the resin PA312LOH (concentration 20 g/L) adsorption ratio of sinigrin and gluconapin increased respectively from the values of 61.3 and 77.6% at the temperature of 20°C to the values of 91.7% and 100% at the temperature of 60°C. Effect of the temperature is less pronounced at higher resin concentrations permitting better adsorption of glucosinolates. Results suggest that the adsorption reaction was endothermic, which is quite uncommon. To confirm this statement, the experimental results were fitted with Temkin model. Results (Table 2) show the heat adsorption values are positive $\Delta Q>0$ confirming that the reaction is endothermic and the low temperature is a limiting factor for the adsorption.

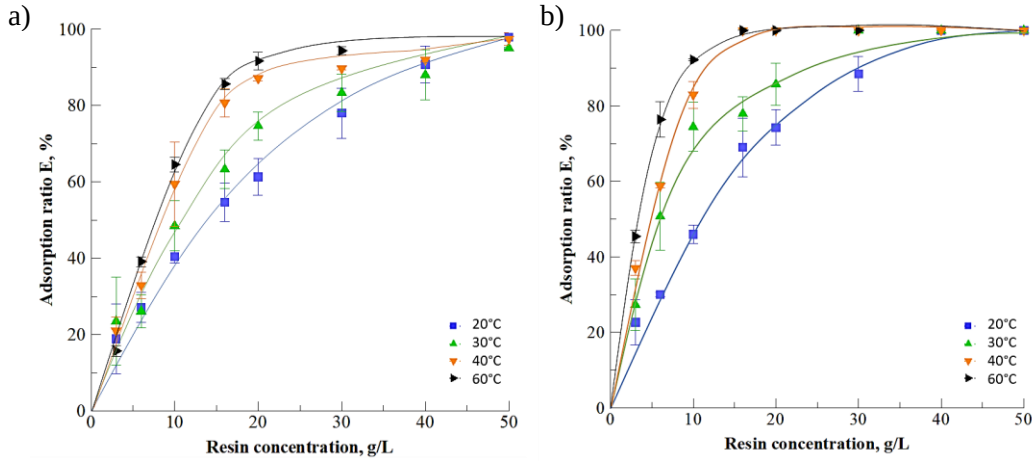


Figure 7 – Adsorption ratio of a) sinigrin and b) gluconapin in function of PA312LOH resin concentration. Experiments were carried out at different temperatures in static conditions.

Table 2 – Temkin parameters estimated by fitting experimental adsorption data for the sinigrin at various temperatures

T (°C)	20	30	40	60
ΔQ (J/mol)	32.57	41.82	45.59	55.21
K_T (mL/g)	2.52	8.71	21.31	74.77
R^2	0.931	0.990	0.930	0.932

Experimental data were fitted by Langmuir and Freundlich equations (Figure 8). Results (Table 3) exhibit that the Langmuir model described better the adsorption of both sinigrin and gluconapin on the PA312LOH resin with higher correlation coefficient (R^2 = 0.90-0.99) compared to the Freundlich model (R^2 = 0.81-0.97). Both models indicate the favorability of the glucosinolates adsorption on the studied PA312LOH resin. The values of favorability indicators (R_L = 0.05-0.2 in Langmuir equation and 1/n= 0.2-0.5 in Freundlich equation) show that the adsorption was favorable. Results at 60°C match with the limit temperature of resin use. Nevertheless, data clearly indicate that the maximum adsorption capacity increased (from 167.2 to 268.1 mg/g and from 20.5 to 84.8 mg/g respectively for sinigrin and gluconapin) with the temperature passing from 20 to 60°C and that the present adsorption was endothermic. Similar results were obtained by Wang *et al.* (2012) for the adsorption of sinigrin using the macroporous resin D621.

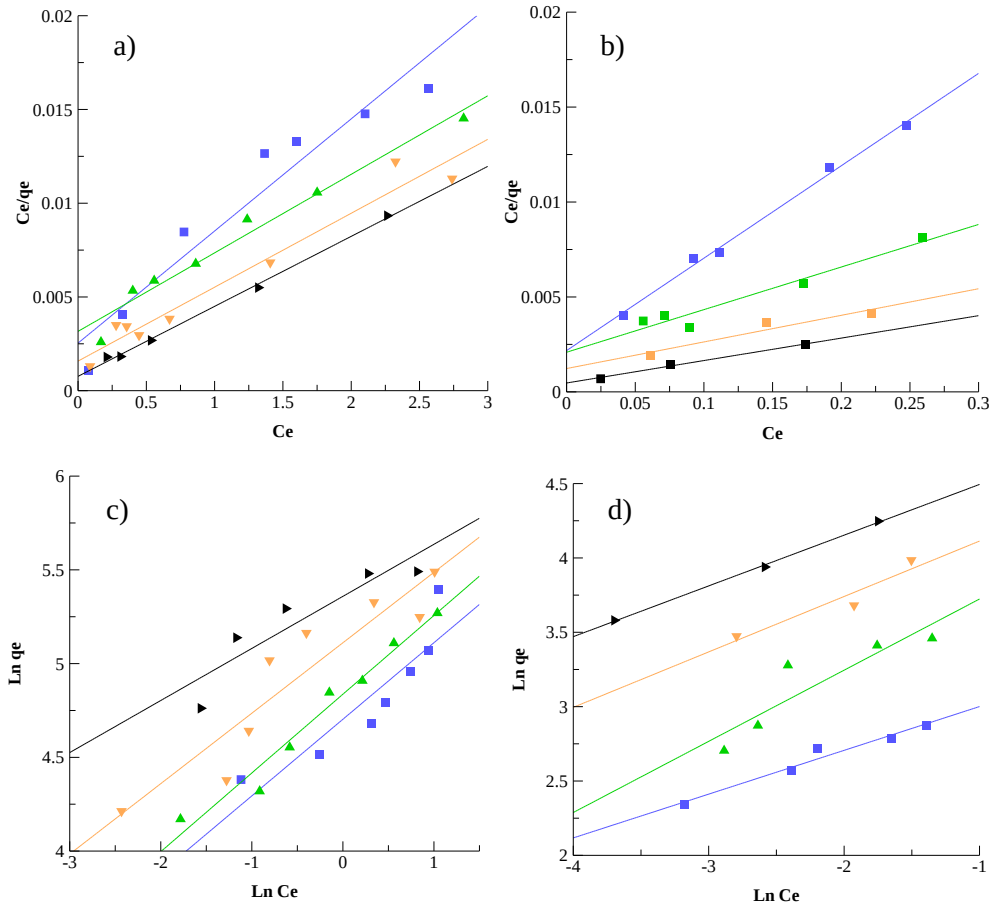


Figure 8 – Modelisation of glucosinolates adsorption on PA312LOH resin at different temperatures (■) 20°C, (▲) 30°C, (▼) 40°C, (►) 60°C : a) sinigrin and b) gluconapin using Langmuir model ; c) sinigrin and d) gluconapin using Freundlich model.

Table 3 - Langmuir and Freundlich adsorption parameters of sinigrin and gluconapin on PA312LOH resin at different temperatures

		20°C	30°C	40°C	60°C
Sinigrin	*Langmuir model*				
	R^2	0.929	0.903	0.953	0.997
	q_0 (mg/g)	167.2	194.2	261.1	268.1
	K_L	2.35	2.04	2.00	4.88
	R_L	0.11	0.12	0.12	0.05
	Freundlich model				
	R^2	0.866	0.973	0.873	0.833
	K_F	109.9	124.0	165.7	212.4
	1/n	0.23	0.48	0.38	0.28
Gluconapin	*Langmuir model*				
	R^2	0.994	0.94	0.914	0.989
	q_0 (mg/g)	20.5	44.6	71.4	84.8
	K_L	22.34	11.38	10.72	25.16
	R_L	0.11	0.20	0.20	0.10
	Freundlich model				
	R^2	0.963	0.817	0.91	0.999
	K_F	27.1	66.7	89.1	125.9
	1/n	0.29	0.48	0.37	0.34

III.1.3. Mechanism of adsorption

Adsorption kinetics of sinigrin and gluconapin on the PA312LOH resin (concentration of 20 g/L, 30°C) were fitted using pseudo first order and pseudo second order models (Figure 9). The values of respective correlations coefficients R^2 and the constant rates are given in the Table 4. Results show that the pseudo second order model describes better the adsorption kinetics for both sinigrin and gluconapin with higher values of R^2. Moreover, the value of equilibrium adsorption capacity q_e estimated for gluconapin using pseudo second order model is very similar to that obtained experimentally. Higher q_e values were estimated for sinigrin using pseudo first and pseudo second order models (respectively 145.8 and 148.4) in compare to the experimental q_e data (127 .5 mg/g). This supposes that the equilibrium adsorption was not still reached for sinigrin after 120 min. Constant rate K_2 of gluconapin was higher than that of sinigrin. This confirms that the equilibrium adsorption of gluconapin was reached faster than that of sinigrin (40 min vs 70-80 min).

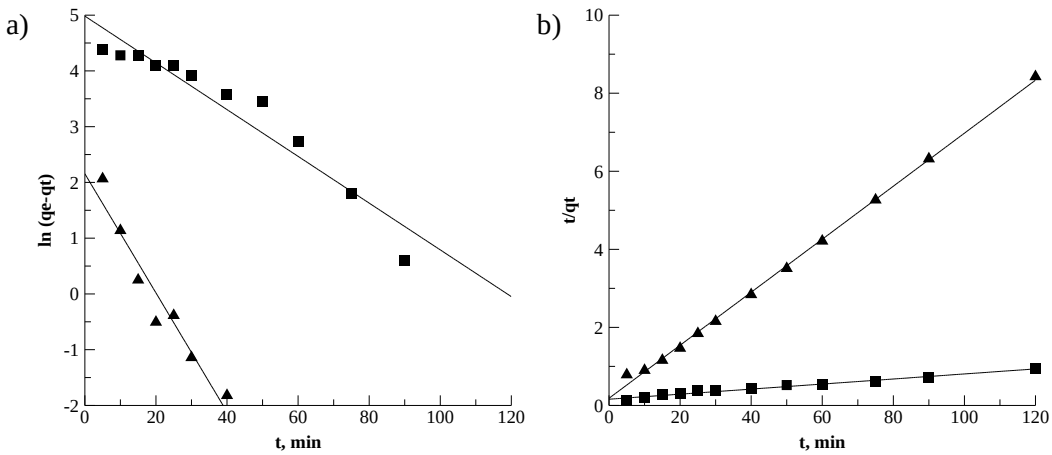


Figure 9 – Description of the kinetics adsorption of glucosinolates on PA312LOH resin using a) pseudo first order model b) pseudo second order model. (■) sinigrin and (▲) gluconapin (resin concentration 20 g/L, 30°C)

The equation of Webber and Morris was used to investigate the mechanism of diffusion. It can be seen that the plot of q_t vs $t^{0.5}$ (Figure 10) gives different linear sections for both sinigrin and gluconapin. The existence of these different sections supposes different adsorption mechanisms. The first linear section represents the solute adsorption on the adsorbent's surface, while the second one represents the intra-particle diffusion, which is limiting step for the adsorption process. Table 4 presents the respective constant rates K_{i1} and K_{i2} for each linear section. The value of K_{i1} obtained for the first section is considerably higher than the value of K_{i2} obtained for the second section for both sinigrin and gluconapin. Indeed, the adsorption of glucosinolates on the resin surface is a rapid process with a high adsorption rate. Once saturation of resin surface is reached, adsorbates move to the intern pores by diffusion, which is a slow process.

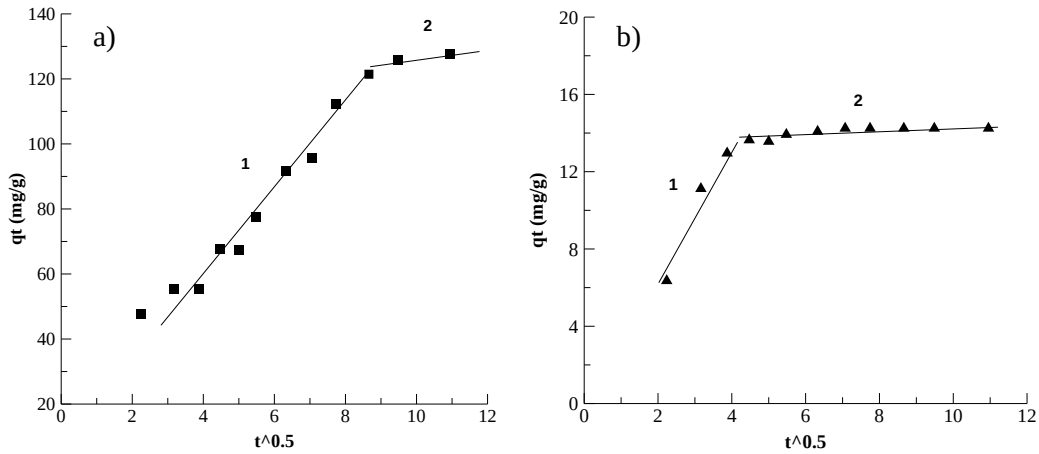


Figure 10 – Representation of the intra-particular diffusion for the adsorption of a) sinigrin and b) gluconapin on PA312LOH resin.

Table 4 - Kinetics parameters for the adsorption of glucosinolates from mustard juice on PA312LOH resin

Kinetics parameters	Sinigrin	Gluconapin
Pseudo first order		
R^2	0.921	0.936
q_e (mg/g)	145.8	8.63
$K_1.10^{-2}$ (min^{-1})	4.19	10.68
Pseudo second order		
R^2	0.985	0.998
q_e (mg/g)	148.4	14.7
$K_2.10^{-2}$ (g/mg.min)	0.10	2.51
q_e experimental (mg/g)	127.5	14.2
Intra-particle diffusion		
R_1^2	0.967	0.926
K_{i1} ($mg/g.min^{-0.5}$)	11.60	3.29
C_1	16.03	0.27
R_2^2	0.821	0.665
K_{i2} ($mg/g.min^{-0.5}$)	2.48	0.104
C_2	79.86	13.3

III.1.2. Desorption with PA312LOH resin in static mode

III.1.2.1. Influence of the salt concentration

KCl and NaCl were selected for the desorption in static mode based on their ability to solubilize glucosinolates. Indeed, glucosinolates can be easily dissolved in KCl or NaCl solutions to form an ionic salt with K^+ or Na^+. The influence of salt concentration on the desorption ratio of sinigrin in KCl and NaCl solutions maintained at 30°C under stirring (300 rpm) for 90 min is presented in Figure 11. Results show that the desorption ratio of sinigrin increased with higher salt concentration up to some threshold value of about 1 mol/L. NaCl demonstrated better capacity of elution than KCl due to the higher ionic strength. This traduces higher proportion of Na^+ to be fixed on the resin matrix and replacing glucosinolates. However, desorption ratio of sinigrin did not increase from its maximal value (37.7%) with NaCl concentration beyond the threshold value of 1.0 mol/L. Therefore, 1.0 mol/L NaCl solution was chosen for further desorption experiments.

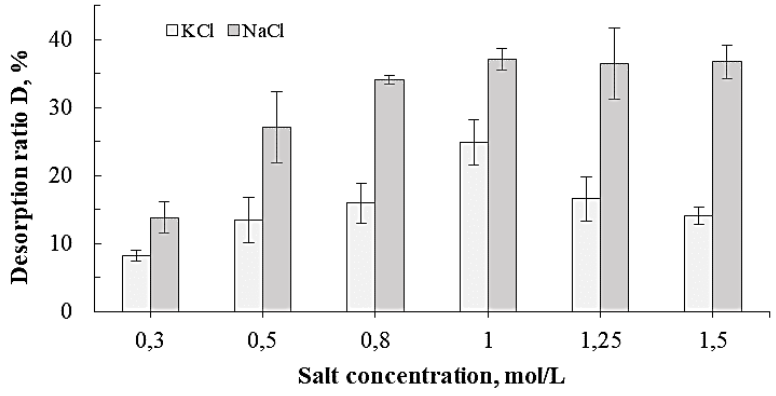


Figure 11 - Influence of salt concentration on the desorption ratio of sinigrin in KCl and NaCl solutions maintained at 30°C under stirring (300 rpm) for 90 min (static mode of desorption).

III.1.2.2. Kinetics of desorption

Figure 12 presents desorption kinetics of sinigrin in function of the volume of added eluent (mL/g_{resin}) (using 1.0 mol/L NaCl solution). Data show that the desorption ratio increased rapidly at the beginning of process before reaching some plateau after about 60 min. On the other hand, increasing the eluent volume from 20 to 50 mL/g_{resin} allowed higher desorption ratio, increased from 37.7% to 50%. This is possibly due to the higher quantity of cations Na^+ to be fixed on the resin matrix to attain the equilibrium state with bigger volume of added eluent. The reached equilibrium after 60 min of desorption suggests a saturation of resin by operating in static (batch) process.

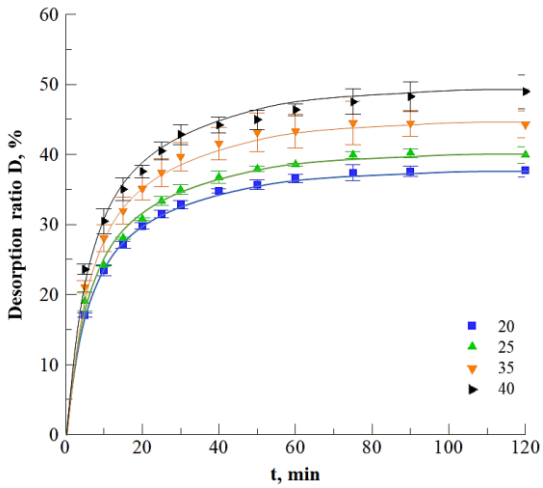


Figure 12 - Kinetics of desorption of sinigrin with various volumes of eluent (mL/g_{resin}) using 1,0 M NaCl (30°C, 300 rpm).

This desorption ratio was overpassed by performing several times batch desorption to maximize the sinigrin recovery (Figure 13). Resin was recovered by filtration after each step and washed with deionized water. The effect of eluent became negligible beginning from the third desorption. Operation with three desorptions allowed recovering 72.7% of sinigrin. HPLC chromatogram of the juice after PA312LOH resin treatment (Figure 14) showed that the initial peaks of impurities have been considerably decreased and sinigrin was isolated. Juice purity P_r (Eq. 7) was increased from 43.05% to 79.63% for sinigrin after adsorption-desorption in a static mode. However, it can be noticed that

gluconapin was not detected in the eluted juice after purification in a static mode. It could be explained by previous adsorption results since gluconapin affinity with resin was higher than sinigrin affinity. Also, initial low content of gluconapin in the extract complicated its detection in the eluted juice.

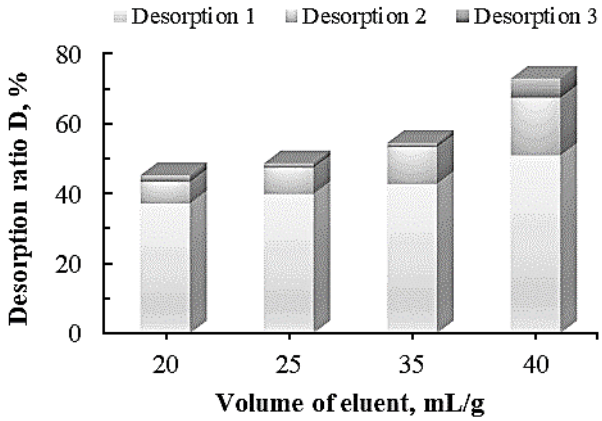


Figure 13 - Desorption ratio of sinigrin after several desorptions using 1.0 NaCl and various liquid-solid ratios (30°C)

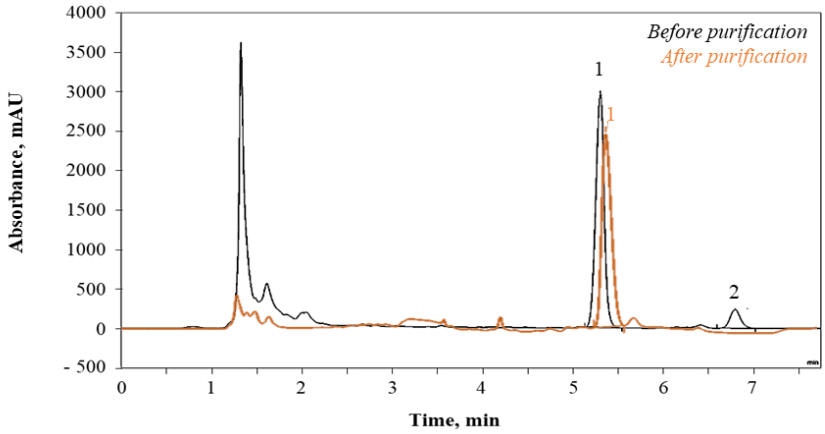


Figure 14 – HPLC chromatogram (229 nm) of glucosinolates (1. sinigrine; 2. gluconapine) juice before and after the treatment with PA312LOH resin

III.1.3. Regeneration of resins

A NaOH solution was used to regenerate PA312LOH resin in order to restore its initial exchange capacity. The influence of NaOH concentration and the liquid/solid ratio (mL_{NaOH}/g_{resin}) was studied. After regeneration, the resin was reused for the adsorption of sinigrin. In all adsorption experiments the temperature was maintained at 30°C and the resin concentration was fixed at 40 g/L. The final adsorption ratios for the fresh and regenerated resin are presented in Figure 15. NaOH was efficient to regenerate the PA312LOH resin even at low concentration (2%) and low liquid/solid ratio (2 mL/g). For instance, resin regeneration with 2% NaOH aqueous solution permitted obtain the adsorption ratio of 96,6% versus 97.8% for a fresh resin for 120 min of absorption (Figure 15a). Therefore a 2% NaOH aqueous solution was chosen for the regeneration. Washing the resin with 2 mL/g of 2% NaOH was very efficient. Similar adsorption ratio was attained for sinigrin using fresh and washed resins (Figure 15b). Desorption experiments performed on regenerated resins showed similar desorption ratios as for the fresh resin.

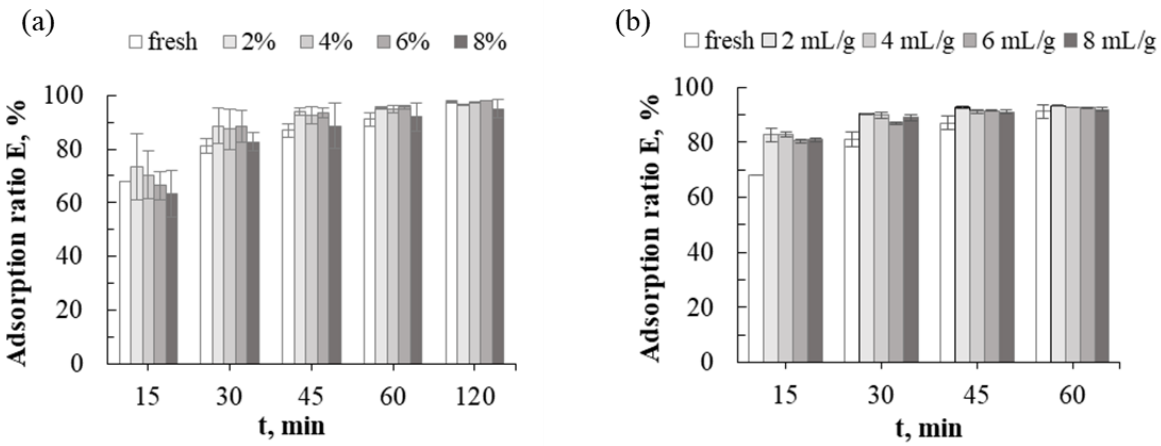


Figure 15 – Adsorption ratios of sinigrin for different adsorption durations after the PA312LOH resin regeneration by NaOH solutions. a) Experiments with variable NaOH concentrations and fixed liquid/solid ratio of 8 mL_{NaOH}/g_{resin}; b) for variable liquid/solid ratios and fixed NaOH concentration of 2%.

III.2. Dynamic (continuous) mode experiments

The adsorption of 50 mL of juice on the packed column was performed at 5.3 BV/h and 30°C. Analysis of the collected fractions show that glucosinolates were fully adsorbed on the bed resin (Figure 16) and separated from proteins that were fully recovered in the residual juice (no adsorption). Indeed concentration of proteins in fractions was similar to that of the crude juice (1.95 g/L).

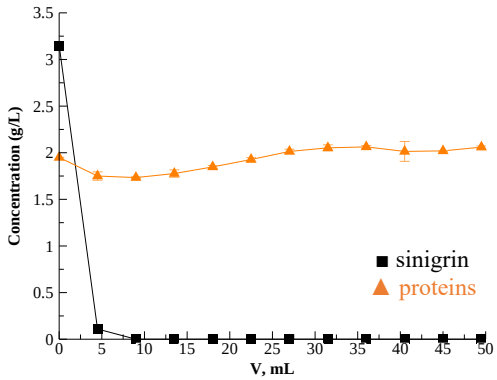


Figure 16 – Concentration of sinigrin and proteins in the residual juice during the dynamic adsorption at 5.3 BV/h, 30°C

Dynamic (continuous) mode desorption was performed using 1.0 mol/L NaCl solution. For the continuous mode experiments, the selection of an appropriate flow rate is important to perform solutes desorption. Figure 17 shows desorption kinetics of glucosinolates (sinigrin and gluconapin) in function of the volume of NaCl solution pumped continuously through the column with packed layer of PA312LOH resin; a) sinigrin and b) gluconapin concentration in NaCl solution (pH 6,86) pumped at two different flow rates (5.3 to 2.6 BV/h). The glucosinolates desorption rate in eluate was increased from 40,4 % to 49.3% for sinigrin and from 1.2% to 10.8% for gluconapin when the flow rate of NaCl solution (pH 6,86) was decreased from 5.3 to 2.6 BV/h. This can be explained by a longer residence time of NaCl solution in the column (6 min for the flow rate 2.6 BV/h) in compare to the residence time of 3 min for the flow rate of 5.3 BV/h. However, the recovery of sinigrin was considerably decreased in

the portions of eluate beyond V_{NaCl} = 40 mL and the recovery of gluconapin was practically absent in the portions of eluate beyond V_{NaCl} = 20 mL (Fig. 17 a,b). Similarly to the static (batch) process, the gluconapin was less recovered than sinigrin. Increasing the eluent strength by modifying pH was then investigated. Decreasing the pH value of the eluate solution from 6.86 to 4.01 permitted increase the glucosinolates recovery from 49.3% to 64.5% for sinigrin and from 10.8% to 28% for gluconapin. This implies using eluate solutions with low pH to remove affinity between the resin matrix and glucosinolates. Others salts with theoretically better ionic strength such as magnesium and calcium chloride were not tested due to their toxicological aspects.

Further analysis by comparing several strongly anion resins for the adsorption and desorption of glucosinolates should be investigated in future.

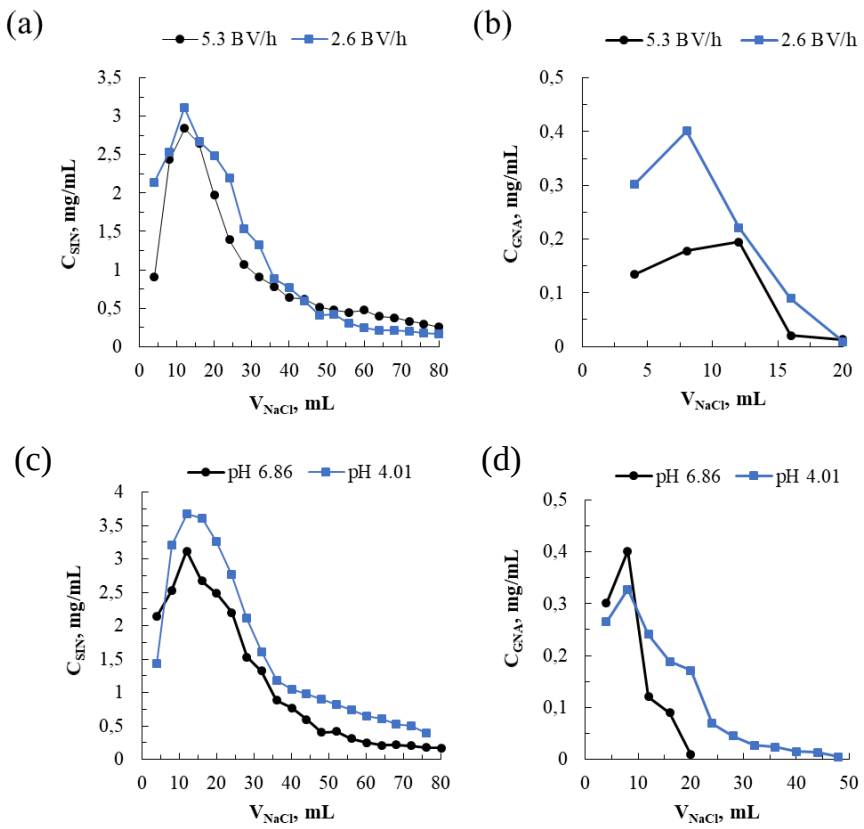


Figure 17 - Desorption kinetics of glucosinolates (sinigrin and gluconapin) in function of the volume of NaCl solution pumped continuously through the column with layer of PA312LOH resin; a) sinigrin and b) gluconapin concentration in NaCl solution (pH 6,86) pumped at two different flow rates (5.3 to 2.6 BV/h); c) sinigrin and d) gluconapin concentration in NaCl solutions (pH 6,86 and 4.01) pumped at the flow rates 2.6 BV/h.

Conclusion

Separation of sinigrin and gluconapin from crude aqueous extracts of brown mustard seeds (*Brassica juncea*) was studied in the batch (static) and continuous (dynamic) modes using macroporous anion-exchange resins. Strongly basic resin PA312LOH demonstrated better affinity towards glucosinolates due to quaternary amine as functional group. Experiments revealed that the temperature allowed increasing maximal adsorption capacity of both sinigrin and gluconapin on the resin PA312LOH, and the adsorption kinetics can be described according to the Freundlich model. The PA312LOH resin was selective towards the glucosinolates adsorption and excluding the proteins adsorption. Optimization of the elution process was performed in static (batch) regime, and 72.9% of the isolated sinigrin was recovered thanks to a 1.0 mol/L NaCl aqueous solution. 64.5 % of sinigrin and 28% of gluconapin were recovered using continuous (dynamic) mode. IR analysis have allowed to examine the effect of resin on glucosinolates during the separation process. HPLC analysis showed there are only peaks of glucosinolates reamining after treatment with PA312LOH resin. Finally, it was demonstrated that resins can be easily regenerated using a 2% NaOH solution, which ensure a good life cycle for the purification process. It can be concluded that anion-exchange chromatography is a simple and effective technique to perform isolation of glucosinolates.

Acknowledgments

We thank Mr. Jérôme Gervais and “Chambre d’Agriculture de la Côte-d’Or” (Bretenière, France) for providing seeds. We also thank SAS PIVERT for their financial support and DIAION Company for having provided us free samples of resins.

References

Bohinc, T., Goreta-Ban, S., Ban, D., Trdan, S. (2012), « Glucosinolates in plant protection strategies: A review », *Arch. Biol. Sci*., 64(3), 821–828.

Bones, A. M. and Rossiter, J. T. (1996). ‘The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry’, *Physiol. Plant*., 97, pp. 194–208.

Delmousse, G. and Poupinel J.C. (1951). US2667417A. “Purification and stabilization of fruit juices by ion exchange treatment”.

Elder, D.P. (2005), “Pharmaceutical Applications of Ion-Exchange Resins”, *J. Chem. Educ*, 82(4), pp. 575.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T. and Talalay, P. (2001). ‘The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants’, *Phytochemistry*, 56, pp. 5–51.

Fahey J. W., Wade K .L., Stephenson K. K. and Chou F. E. (2003).’Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography’, *J. Chromatogr. A*, 996(1-2), pp. 85-93

Grubb, C. D. and Abel, S. (2006). ‘Glucosinolate metabolism and its control’, *Trends Plant Sci*., 11(2), pp. 89–100.

Guerrero-Diaz, M. M., Lacasa-Martínez, C. M., Hernández-Piñera A., Martínez-Alarcón, V. and Lacasa-Plasencia, A. (2013). 'Evaluation of repeated biodisinfestation using Brassica carinata pellets to control Meloidogyne incognita in protected pepper crops', *Span. J Agric. Res.*, 11(2), pp. 485–493.

Hamzaoui, M., Hubert, J., Reynaud, R. Marchal, L., Foucault, A. and Renault, J.H. (2012). 'Strong ion exchange in centrifugal partition extraction (SIX-CPE): Effect of partition cell design and dimensions on purification process efficiency', *J. Chromatogr. A*, 1247, pp. 18-25.

Holst, B. and Williamson, G. (2004). 'A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds', *Nat. Prod. Rep.*, 21(3), pp. 425–447.

Kajjumba, G.W., Emik, S., Ongen, A., Ozcan, H.K. and Aydin, S. (2018). 'Modelling of Adsorption Kinetic Processes—Errors, Theory and Application', Sorption, IntechOpen Limited.

Karcher, A., Melouk, H.A., El Rassi, Z. (1999), « High-performance liquid phase separation of glycosides. 5. Determination of individual glucosinolates in cabbage and rapeseed by laser-induced fluorescene capillary electrophoresis via the enzymatically released isothiocyanate aglycon », *J. Agric. Food Chem.*, 47(10), 4267–4274.

Kiefer, R. and Höll, W. H. (2001). 'Sorption of Heavy Metals onto Selective Ion-Exchange Resins with Aminophosphonate Functional Groups', *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, pp. 4570-4576.

Lee I. and Boyce M. C. (2011). 'Extraction and Purification of Glucoraphanin by Preparative High-Performance Liquid Chromatography', *J. Chem. Educ.*, 88(6), pp. 832-834.

Reynaud, E., Duvat, C., Baudouin, S. and Meurisse, J. (2016). US20190216112A1. "Deacidified cranberry juice and process for preparing same".

Rochfort S., Caridi D., Stinton M., Trenerry V. C. and Jones R. (2006). 'The isolation and purification of glucoraphanin from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high performance liquid chromatography', *J. Chromatogr. A*, 1120(1-2), pp. 205-210.

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P. T. W. and Desmarchelier, J. M. (1998). 'Biofumigation potential of brassicas', *Plant Soil*, 201(1), pp. 103–112.

Song L., Thornalley P. J. and Iori R. (2006). 'Purification of major glucosinolates from Brassicaceae seeds and preparation of isothiocyanates and amine metabolites', *J. Sci. Food Agric.*, 86(8), pp. 1271-1280

Sotelo, T., Lema, M., Soengas, P., Cartea, M. E. and Velasco, P. (2015). 'In vitro activity of Glucosinolates and their degradation products against Brassica-pathogenic bacteria and fungi', *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, pp. 432–440.

Toribio, A., Nuzillard, J.M., Renault, J.H. (2007), « Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates », *J. Chromatogr. A*, 1170(1-2), 44-51.

Treybal R. E. (1981). Mass Transfer Operation, Tata McGraw Hill, Singapore.

Vera, E., Dornier, M., Ruales, J., Vaillant, F. and Reynes R.M. (2003). "Comparison between different ion exchange resins for the deacidification of passion fruit juice", *J. Food Eng*., 57(2), pp. 199-207.

Wang, T., Liang H. and Yuan Q. (2012). 'Separation of sinigrin from Indian mustard (Brassica juncea L.) seed using macoporous ion-exchange resin', *Korean J. Chem. Eng*., 29(3), pp. 396-403.

Wang T., Liang, H. and Yuan, Q. (2014). "Separation and Purification of Sinigrin and Gluconapin from Defatted Indian Mustard Seed Meals by Macroporous Anion Exchange Resin and Medium Pressure Liquid Chromatography", *Sep. Sci. Technol*., 49(12), pp. 1838-1847.

Xie Z., Wang R., Wu Y., Yang L., Wang Z. and Li Y. (2012). 'An efficient method for separation and purification of glucosinolates stereoisomeres from radix isatidis', *J. Liq. Chrom. Relat. Tech*., 35(1), pp. 153-161.

Zhou, J., Qui A. and Hu J. (2005). 'Separation and purification of the main glucosinolates from rapeseeds', *Chin. J. Chromatogr*., 23(4), pp. 411-414.

III.3.1.3. Bilan

La chromatographie par échange d'ions a montré sa faisabilité pour l'isolation et la purification des glucosinolates via l'utilisation d'une résine fortement anionique, permettant de séparer sélectivement les glucosinolates et protéines du jus initial. En revanche la désorption des glucosinolates s'est montrée plus difficile en raison de la forte affinité des molécules avec l'amine quaternaire de la résine. Malgré une très bonne sélectivité d'adsorption, des cinétiques rapides et un cycle de vie intéréssants des résines qui peuvent être efficacement régénérées via un lavage par la soude, les quantités d'éluant utilisées devant les taux de désorption non significativement satisfaisant ne pourraient rendre la technique compétitive industriellement ni répondre aux exigences de la bioraffinerie vis-à-vis de la chimie verte. Une étude comparative des performances d'adsorption/désorption de plusieurs résines échangeusions d'anions serait intéressante pour intensifier l'efficacité de la technique et identifier les paramètres physiques (surface BET, surface externe, volume poreux etc.). Pour ces raisons, la purification des extraits bruts a été portée en ultrafiltration, procédé plus fiable, flexible et efficace pour la purification de jus biologiques sans utilisation de produits chimiques annexes. En effet l'utilisation de membranes aux seuils de coupure adaptés permettraient une séparation efficace au vu de la différence de taille moléculaire des molécules mis en jeu (~ 100 g/mol pour les glucosinolates vs 30-70 kg/mol pour les protéines et plus généralement 10-1000 kg/mol pour les espèces colloïdales).

III.3.2. Purification des glucosinolates par ultrafiltration

III.3.2.1. Résumé de l'article

L'article « Dead-end ultrafiltration of glucosinolates juice extracted from mustard defatted meal: effects of operational conditions on permeate quality and membrane fouling » a été soumis dans le journal « Separation Science and Technology » en 2020. L'objectif de cet article est la purification des extraits riches en glucosinolates obtenus par diffusion via l'élimination des protéines et des substances colloïdales afin d'obtenir un filtrat de haute pureté (>90%) et concentrer les protéines dans le rétentat. La filtration membranaire est une technique fiable, efficace et peu coûteuse qui a été utilisée pour la purification et la clarification de jus biologiques sans impacter la qualité du perméat. Le colmatage est cependant un facteur limitant significatif impactant les performances et flux de filtration. Aucune étude n'a été réalisée sur la purification des glucosinolates par ultrafiltration, qui sont généralement éliminés.

La pureté initiale du jus a été estimée à 35.2% d'après sa teneur en glucosinolates, protéines et colloïdes. L'ultrafiltration est portée en mode frontal via une cellule type Amicon, équipée d'un système d'agitation et l'utilisation de membranes en PES. L'influence du seuil de coupure (5-150 kDa), de la pression et de la vitesse d'agitation sur les performances de filtration (flux, rétention des impuretés, résistance membranaire, résistance du gâteau) et le mécanisme de colmatage a été étudiée.

Les membranes à 10 kDa ont présenté des taux de rétention intéressants avec 96.6% de rejet des protéines et 92.7% des colloïdes et une clarification du jus. Les membranes à 5kDa présentent des taux de rétention supérieurs mais sont considérablement moins perméables avec une résistance membranaire deux fois supérieure à 10 kDa et une augmentation du temps de filtration de 30%. L'augmentation de la pression a également permis une meilleure rétention des composés indésirables (93.9% à 1 bar vs 96.4% à 5 bars pour les protéines) liée à la formation d'une couche de dépôt plus dense avec l'augmentation de la pression. Les performances de filtration sans agitation sont inférieures à celle d'une filtration dynamique du fait d'un changement du mécanisme de colmatage : la filtration statique est classiquement régie par la formation de gâteau alors que la filtration avec agitation est caractérisée par un blocage complet des pores lorsque le régime permanent est atteint. Le jus purifié (90%) riche en glucosinolates obtenu (10 kDa, 5 bars, 500 rpm) peut être utilisé en biofumigation via l'exploitation de l'activité biologique des glucosinolates, et le rétentat concentré en protéines mélangé au tourteau pour augmenter sa teneur protéique.

L'élimination du colmatage de la membrane a ensuite été étudiée via un nettoyage chimique en utilisant la cellule Amicon. Différents agents chimiques ont dans un premier temps été utilisés et NaOH a été sélectionné. L'augmentation de la concentration en NaOH de la solution nettoyante, de la pression et du volume de nettoyage est favorable à l'élimination des particules indésirables. 99.5% de la résistance de colmatage a été éliminée et 97.8 de taux de récupération de débit a été obtenu via une solution de NaOH de 5% à 5 bars avec un volume de 75 mL (11 min de nettoyage). Les performances de rétention et les flux de filtration des membranes nettoyées sont similaires à ceux d'une membrane neuve. Le nettoyage chimique a permis de prolonger significativement la durée de vie de la membrane sans altération de sa structure.

III.3.2.2. Article

Dead-end ultrafiltration of glucosinolates juice extracted from mustard defatted meal: effects of operational conditions on permeate quality and membrane fouling

Mathieu HEBERT, Houcine MHEMDI and Eugene VOROBIEV

Abstract

Glucosinolates (GSL) (β-thioglucoside-N-hydroxysulfates) are rich-sulfur secondary metabolites interesting for biofumigation. Sinigrin and gluconapin are the main glucosinolates presented in brown mustard (Brassica juncea) seeds. Dead-end ultrafiltration of a rich by glucosinolates juice expressed from defatted seed meal was studied using polyethersulfone (PES) membranes. The impact of membrane MWCO (5-150 kDa) and process parameters : pressure (1-5 bar) and stirring (0-600 rpm) on the ultrafiltration behavior, permeate quality and fouling mechanism was studied. Most impurities (proteins, colloids) were removed using 10 kDa membrane, which permitted increase juice purity from 35.2% to 90.1%. Different mechanisms of dead-end ultrafiltration were revealed depending on stirring velocity. The irreversible fouling has been efficiently removed after membrane chemical cleaning using NaOH solution.

Keywords: Brassica juncea, glucosinolates, purification, fouling, regeneration

I. Introduction

Glucosinolates (GSL), β-thioglucoside-*N*-hydroxysulfates (or 1-thio-β-D-glucopyranoside), are secondary metabolites produced by cruciferous plant. They are accumulated in many species of *Brassicaceae* family (1). These molecules are inactive in their native form but they are precursors of various highly reactive hydrolysis breakdown products presenting fungicidal, bactericidal and insecticidal properties (1-5). For example, sinigrin and gluconapine are the major GSL in mustard seeds. They are inactive unless interacting with an endogene enzyme called myrosinase (ß-thioglucosidase, E.C. 3.2.1.147) (6-7) to produce allyl and but-3-enyl isothiocyanates (AITC & BITC) respectively. These hydrolysis compounds are highly reactive presenting fungicidal, bactericidal and insecticidal properties making them natural pesticide and biofumigation agent (2,8) instead of chemical crop protection products (9). In order to formulate this natural pesticide, GSL should be isolated (extracted) in their native form and purified to obtain a purified extract concentrated in GSL. Common protocol according to the international standard method (ISO 9167-1) recommends using a boiling aqueous methanol (70% v:v, 75°C). This protocol permits an efficient recovery of GSL but also the co-extraction of many soluble impurities such as colloids, proteins and sugars. The GSL should be purified to isolate them in their native form. On top of that, using methanol as extraction solvent is controversial for its carcinogen aspect.

The isolation and purification of glucosinolates have been documented meaning different chromatography methods (10), including alumina column chromatography (11-13), preparative high-speed counter-current chromatography (14), preparative high-performance liquid chromatography (15,16), strong ion-exchange centrifugal partition chromatography (17). These techniques are mainly used to isolate glucosinolates as standards for direct commercial use. More recently, macroporous ion-exchange resin was proposed for the purification of glucosinolates from crude aqueous extracts (10). Globally, the use of these techniques is held back by their unsatisfying recovering yield, the massive use of chemical products, and the high-energy cost.

Membrane filtration was particularly studied as a promising purification technology (18-20). It has been claimed as reliable and efficient technique to perform separation and clarification of extracts by removing colloidal impurities (pectins, proteins, polysaccharides etc.) without any negative impact on the final filtrated juice's quality (21-23). In fact, membrane processes can operate as highly efficient "sieves", capable of fractionating particle species according to size. The process flexibility, the low energy requirements and the possibilities of scale up are the major advantages of membrane filtration technologies. However, filtration of juices rich on organic molecules leads to a rapid membrane fouling and impacting membrane performances by the decrease of the filtration flux. Membrane pores blocked by juice compounds may not be effectively regenerated by conventional methods (hydraulic unclogging operation such as a countercurrent flushing). Chemical membrane cleaning could be an alternative for removal fouling. Generally, the cleaning efficiency depend of the nature of membrane and the type of chemical agent (alkali, acids, salts, surfactants, chelating agents, enzymes, desinfectants) (24,25).

Membrane purification of glucosinolates has not been reported in the literature and our purpose is to demonstrate the feasibility of purification of a rich-GSL juice using ultrafiltration. The objective was to obtain a high purity rich-glucosinolates filtrate (>90%) and to concentrate the impurities (proteins, colloids) in the retentate. The purified GSL juice can be used on biofumigation, and the concentrated by proteins retentate can be used as animal feed. In order to optimize the membrane ultrafiltration of GSL,

the process was studied in dead-end conditions. The impacts of membrane molecular weight cut-off, transmembrane pressure and stirring on the ultrafiltration kinetics and permeate purity were studied. Finally, removal of the irreversible membrane fouling after purification was investigated meaning a chemical cleaning.

II. Material and Methods

II.1. Juice purification

II.1.1. Preparation of crude juice

The juice used for ultrafiltration was obtained from brown mustard seeds (*Brassica juncea*, Etamine) supplied by Chambre d'Agriculture Côte d'Or (Bretenière, France) from the 2017 and 2018 harvests. Analysis have shown that seeds are rich in sinigrin (94.7-102.0 µmol/g MS) and gluconapin (10.9-13.2 µmol/g MS).

In order to avoid GSL hydrolysis by the myrosinase, this enzyme was first inactivated inside seeds by dipping a sealed bottle containing the seeds in hot bath-water (Julabo SW22) at 90°C during 70 min. Analysis showed that this thermal treatment allowed almost total inactivation (97%) of the enzyme. Treated seeds were then flaked (cylinder Trilabo 100 x 200 grinder) and pressed using a laboratory hydraulic press (Creusot-Loire, France). Two successive pressings were performed at 80°C for 60 min. This resulted in recover of 84% oil.

The obtained defatted press cake was used for GSL extraction meaning a solid/liquid extraction under controlled stirring and temperature. Approximately 90% of the intact glucosinolates were recovered meaning a water/ethanol solution (60/40, v:v) at 40°C in 10-fold excess in 8 min. Obtained crude juice was used for the following purification. It was rich in glucosinolates but also in proteins and colloids (Table 1).

Table 1 – Qualitative composition of raw expressed juice used for purification experiments

Sinigrin (g/L)	Gluconapin (g/L)	Colloïds (g/L)	Proteins (g/L)
3.459±0.003	0.267±0.011	4.930±0.297	1.949±0.046

II.1.2. Ultrafiltration equipment (Amicon cell)

Purification of the expressed GSL-juice was performed in the batch ultrafiltration cell Amicon 8200 (Millipore, France). The cell (200 mL) was equipped with a blade stirrer (Figure 1). Ultrafiltration experiments were carried out at ambient temperature (25°C). Polyethersulfone (PES) membranes (Alting, France) with different nominal molecular weight cut-off (MWCO) were used. The active membrane surface area S was equal to 2.87 x 10^{-3} m². Membranes were preliminary rinsed with distilled water for 15 min and placed at the bottom of the stirred cell. The initial volume V_0 for all the experiments was 100 mL. The volume of permeate V was continuously weighted and recorded using electronic balance PM600 (Mettler-Toledo, France) connected to a computer. The effects of membrane MWCO (5-150 kDa), transmembrane pressure ΔP (1-5 bar), and stirring ω (0-600 rpm) were studied.

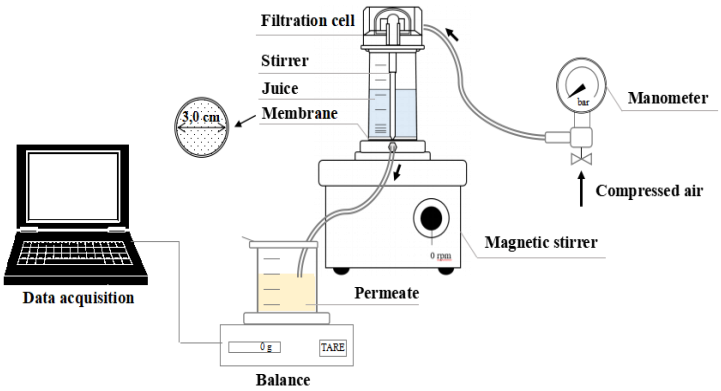


Figure 1 - Experimental set-up for dead-end ultrafiltration experiments

II.1.2. Ultrafiltration characterization

The volume reduction ratio *VRR* was calculated using Eq. (1):

$$VRR = \frac{V_0}{V_0 - V} \tag{1}$$

Where V_0 is the initial volume of retentate and V is the actual volume of permeate.
The filtration flux J ($m^3/m^2.s$) was determined as follow:

$$J = \frac{1}{S}\frac{dV}{dt} \tag{2}$$

Where t is the filtration time (s), and S is the membrane surface area (m^2).
The gel polarization model also proposes a description of filtration flux based on mass-transfer controlled regime when a deposit layer is formed over the entire membrane surface. This regime supposes that the transport of molecules to the surface of deposit is balanced by shear-induced back transport of the foulant to the bulk solution. The steady filtration flux is therefore related with *VRR* according to the following equation:

$$J = k^* - k\ln(VRR) \tag{3}$$

Where $k^*=k\ln(C_c/C_{cs_0})$ is a constant related to the initial steady flux, k (m/s) is the mass transfer coefficient determined by slope of J=f(ln(*VRR*)), C_c is the concentration of foulants in the deposit layer, and C_{cs_0} is the initial concentration of foulant. Extrapolation for J=0 allows determination of the maximal volume retention ratio (VRR_{max}).
Ruth filtration equation (Eq. 4) stipulates the linearity of t/V vs. V relation for the dead-end cake filtration:

$$\frac{t}{V} = \frac{\alpha Cs\rho\mu}{2S^2\Delta P}V + R_m\frac{\mu}{S\Delta P} \tag{4}$$

Where α (m/kg) is the specific cake resistance, R_m (m^{-1}) is the membrane resistance, C_s (%w) is the weight fraction of cake-forming solids in the feed juice, ρ (kg/m^3) is the juice density, and μ (Pa.s) is the juice viscosity. Value of the slope of straight-line *t/V* vs. *V* is proportional to the parameter αCs, which is a measure of membrane fouling due to the deposit formation (26).
Fouling increases with transmembrane pressure. Since C_s remains constant, dependence of αC_s on applied pressure may be described by empirical equation:

$$\alpha C_s = \alpha_0 C_s \left(\Delta P\right)^s \tag{5}$$

Where α_0 and s are constants.

II.1.3. Membrane fouling mechanism

The different mechanisms of membrane fouling can be described by equation (6) (27):

$$\frac{d^2t}{dV^2} = k'\left(\frac{dt}{dV}\right)^n \tag{6}$$

Where *k'* and *n* are the constants. The value of *n* characterizes the type of filtration mechanism, For instance, n=2 corresponds to the complete pore blocking, n=1.5 to the standard pore blocking, n=1 to the intermediate blocking, and n=0 to the cake formation.

II.1.3. Membrane fouling cleaning

The membrane chemical cleaning was also performed using Amicon cell. Firstly, permeate flux of distilled water at ΔP = 3 bar was measured on clean membrane (J_{w_0}) and membrane resistance was measured (R_{m_0}). After the ultrafiltration process, fouled membrane was rinsed with distilled water to remove a deposit cake from the surface. Afterward, permeate flux (J_{wf}) and membrane resistance through fouled membrane (R_{mf}) were measured at the same pressure of 3 bar. Distilled water and 3 chemical agents (HCl, NaCl, NaOH) were used for the regeneration of fouled membrane. The effectiveness of the cleaning operation was evaluated by determining the overall resistance removal R_R and the flux recovery F_R calculated using the following equations:

$$R_R\ (\%) = \left[\frac{(R_{mf} - R_{mc})}{R_{mf}}\right] \times 100 \tag{7}$$

$$F_R\ (\%) = \left[\frac{(J_{wc} - J_{wf})}{(J_{w_0} - J_{wf})}\right] \times 100 \tag{8}$$

Where R_{mf} (m^{-1}) is the additional membrane resistance due to the fouling, calculated as follows:

$$R_{mf} = \frac{\Delta P}{\mu J_{wf}} - R_{m_0} \tag{9}$$

R_{mc} (m^{-1}) is the additional membrane resistance remaining after the cleaning operation, calculated from the equation (10):

$$R_{mc} = \frac{\Delta P}{\mu J_{wc}} - R_{m_0} \tag{10}$$

And R_{m_0} (m^{-1}) is the resistance of clean membrane.

II.2. Analysis of juice

II.2.1. Concentration of proteins

The concentration of proteins in the juice and permeate was determined according Bradford method (28). A volume of 100 µL of solution and 1 mL of Bradford Reagent were mixed. The resulting samples were kept 10 min at room temperature before analysis. The absorbance was then measured at wavelength λ = 595 nm by the UV/Vis UV-6300 PC spectrophometer (VWR, Strasbourg, France).

II.2.2. Concentration of colloids

Colloidal substances presented in the GSL juice are mainly proteins and in some extent polymers, sugars, oxidants etc. The total concentration of colloids in the juice was measured meaning precipitation in ethanol according to Cherniavskaia's method (29). Briefly, 5 mL of the juice were mixed in a flask with 50 mL of 96% ethanol and heated in a boiling reflux during 15 min. The solution was then cooled, and the precipitate was filtered through the ashless filter paper. The filter was finally washed by 100 mL of 90% ethanol and dried until constant weight. The concentration of precipitated colloids was determined using Eq. (11):

$$C_{co} = \frac{m_f - m_0}{0.005} \tag{11}$$

Where C_{co} is the concentration of colloids (g/L), m_0 is the weight of the ashless filter-paper before filtration, and m_f is the weight of the ashless filter-paper with recovered precipitate after drying.

II.2.3. Concentration of glucosinolates

The GSL concentration in juices was determined by reversed phase ion-pair liquid chromatography. HPLC experiments were performed on a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 Series equipped with Diode Array Detectors (DAD-3000 RS and MWD-3000 RS) and a C18 column (Prontosil 250 x 4,6 mm 5.0 µM). Mobile phase consisted in an acetonitrile-water solution (45%) with NaH_2PO_4 at 10 mM and THABr as counterion at 5 mM conditioned at pH 7.0. Analyses were performed with a mobile phase flux rate of 1,5 mL/min, UV wavelength of 229 nm, column temperature of 35°C. 20 µL of the sample were injected in the chromatograph, the elution was carried out in isocratic mode. A standard calibration curve was constructed from solutions of standard sinigrin from 0.1 mM to 3,5 mM. Gluconapin was determined by an internal method using glucotropaeolin as internal standard. Concentration of sinigrin and gluconapin (g/L) are respectively labelled as C_{SIN} and C_{GNA}.

II.2.4. Juice coloration

The coloration of juice was characterized by measuring juice absorbance at 420 nm. The juice was preliminary filtrated through 0.45 µm filter (syringe filter 25 mm GD/XP) and its absorbance was measured using the UV/Vis UV-6300 PC spectrophotometer (VWR, France).

II.2.5. Rejection ratio and purity

The permeate quality was characterized through the membrane capacity of juice compounds (GSL, proteins and colloids) rejection. The rejection ratio τ was calculated by using the following equation:

$$\tau\ (\%) = \left(1 - \frac{C_p}{C_f}\right) \times 100 \tag{12}$$

Where C_p and C_f are respectively the concentration of juice compounds in the permeate and in the feed juice. The rejection ratio was respectively defined for sinigrin (τ_{SIN}), gluconapin (τ_{GNA}), proteins (τ_{pr}), and colloids (τ_{co}). It was supposed that GSL (sinigrin and gluconapin) will not be retained by the membranes and pass to the permeate, while proteins and colloids will be rejected by the membranes.
The purity of juices P_r (feed and permeate) was calculated towards the concentration of glucosinolates and concentration of juice impurities (proteins and colloids) such as:

$$P_r(\%) = \left(\frac{C_{GSL}}{C_{GSL} + C_{pr} + C_{co}}\right) \times 100 \tag{13}$$

Where C_{GSL}, C_{pr} and C_{co} are respectively the total concentration of GSL, proteins and colloids in juices. The purity of raw juice was estimated to 35.2% according to the data of Table 1. The objective was to remove proteins and colloidal substances to reach a high juice purity (>90%).

II.2.6. Statistical analysis

All the experiments were repeated at least three times. Means and standard deviations were calculated and presented on the figures as error bars.

III. Results and discussion

III.1. Selection of membrane

Ruth equation (Eq. 4) is commonly used for the determination of membrane resistance and specific cake resistance by plotting the graphs t/V versus V that can be typically fitted by a straight line. Preliminary experiments were done at a constant pressure of 3 bar under stirring (400 rpm) for the membrane with different MWCO (from 150 to 5 kDa). The curves t/V versus V reveal different behaviors, as shown on Figure 2. Linearity of t/V versus V relation can be observed at the beginning of filtration, and it can be attributed to the cake formation mechanism responsible for the rapid decrease of permeate flux *J*, as shown on Figure 3. This stage is then followed by “steady state” stage of nearly constant flux *J* (when the thickness of formed cake was maintained nearly constant by agitation), and by final stage of flux

declining. Membrane resistance and parameter αC_s were estimated using the initial linear part of t/V versus V curves.

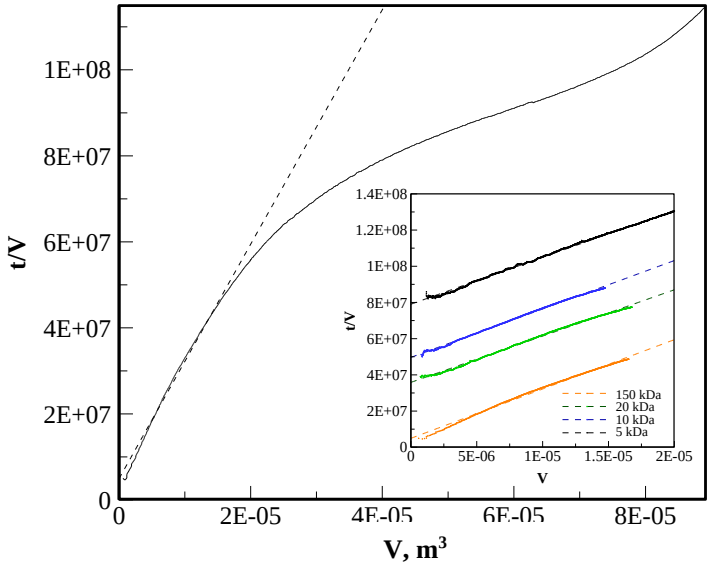


Figure 2 – Relations of *t/V* versus *V* for stirred ultrafiltration (3 bar, 400 rpm) of GSL juice with membrane of 150 kDa. Insert represents the initial part of curves fitted by the straight lines for different membrane pore size (150 – 5 kDa).

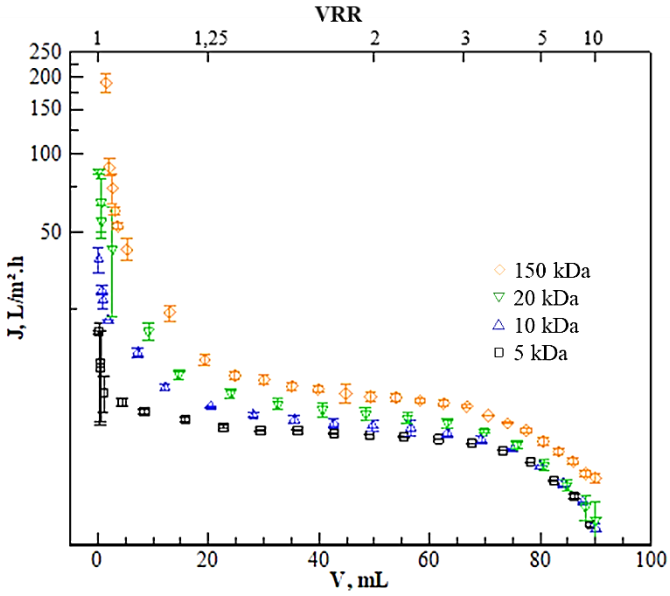


Figure 3 - Permeate flux *J* versus volume of permeate *V* and volume reduction ratio *VRR* for stirred ultrafiltration (3 bar, 400 rpm) of GSL juice.

Data from Table 2 show that both membrane resistance R_m and parameter αC_s increase for smaller MWCO. This leads to lower permeate flux *J*. However, rejection ratios of proteins τ_{pr} and colloids τ_{co} were significantly higher using membranes with lower MWCO (Table 3). For instance, with membrane of 150 kDa, the values of τ_{pr} and τ_{co} were respectively 23.9 and 41.1%, while with membrane of 5 kDa, the values of τ_{pr} and τ_{co} were increased to respectively 98.1 and 93.8%. Juices filtered by membranes with lower MWCO were somewhat lighter (Figure 4). Recovering of glucosinolates in the permeate was different. Sinigrin was not practically rejected by studied membranes (τ_{SIN} = 1.18-2.09%)

and sieved to the permeate. However, gluconapin was partially retained by the membranes with lower MWCO of 5, 10 and 20 kDa (τ_{GNA} = 40.9-29.49 %) while it was not practically retained just by the membrane with MWCO of 150 kDa. This was unexpected due to the similar molecular size and structure of both glucosinolates (359 and 373 g/mol respectively). This different retention behavior of gluconapin and sinigrin by the membranes with lower MWCO should be cleared in future studies. Overall, the 10 kDa membrane gave the most interesting rejection performances, while the 5 kDa membrane did not reject significantly more proteins and colloids in compare to 10 kDa membrane, but was considerably less permeable. For instance, when the 10 kDa membrane was replaced by the 5 kDa membrane, the juice purity P_r toward the glucosinolates was increased from P_r = 89.6 to 91.1 % while the membrane resistance R_m was increased by more than 2 times (from R_m = 4.25 to 9.25×10^{13} m^{-1}). Also, the total filtration time increased by 30%. Based on these results, the 10 kDa membrane was selected for our further experiments.

Table 2 – Effect of membrane MWCO on the parameter αC_s, membrane resistance R_m and total ultrafiltration time t of GSL juice. Stirred dead-end ultrafiltration was done at the pressure of 3 bar, and under the stirring at 400 rpm.

MWCO (kDa)	$\alpha C_s.10^{13}$ (m/kg)	$R_m.10^{13}$ (m^{-1})	t (min)
150	0.99±0.07	0.85±0.01	200
20	1.04±0.06	2.86±0.46	250
10	1.16±0.08	4.25±0.74	292
5	1.31±0.02	9.25±1.95	375

Table 3 - Characterization of the permeate after ultrafiltration with various MWCO membranes (ω = 400 rpm, ΔP = 3 bar)

Parameters	τ_{SIN} (%)	τ_{GNA} (%)	τ_{pr} (%)	τ_{co} (%)	A_{420} nm*	P_r (%)
150 kDa	1.18±0.42	0.14±1.21	23.92±0.74	41.12±4.26	1.472	46.4±0.9
20 kDa	2.97±0.83	29.49±4.78	79.24±3.80	85.50±4.09	1.311	76.0±0.1
10 kDa	2.79±0.98	40.30±1.60	96.61±0.14	92.70±2.70	1.235	89.6±0.1
5 kDa	2.09±0.97	40.90±1.64	98.1±0.02	93.81±1.89	1.131	91.1±0.1

*A_{420} nm = 1.558 in feed juice

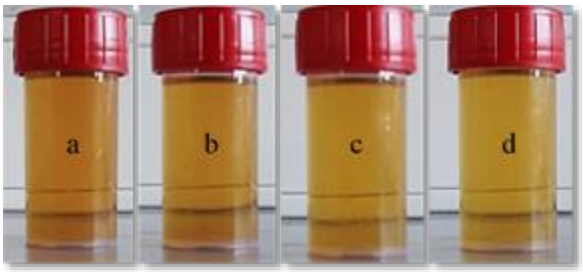


Figure 4 - Permeates after ultrafiltration of feed juice with a) 150 kDa b) 20 kDa c) 10 kDa d) 5 kDa PES membranes. Ultrafiltration was done at the pressure of 3 bar, and under the stirring at 400 rpm.

III.2. Impact of stirring

Ultrafiltration experiments with 10 kDa membrane were carried out at ΔP = 3 bar and different stirring rates, varied from 0 to 600 rpm. Stirring enhanced significantly ultrafiltration kinetics hindering particles deposition on the membrane surface. Increasing stirring velocity up to 500 rpm led to the lower values of parameter αC_s and higher permeate flux (Table 4). No significative difference was noticed by increasing stirring velocity from 500 to 600 rpm in terms of ultrafiltration performances. Considering membrane retention performances under ultrafiltration with agitation, no significant difference was noticed and rejection ratio τ_{pr} (96.6-97.1%) and τ_{co} (92.1-92.7%) as well as juice color (A_{420} = 1.218-1.235) were sensibly similar in function of stirring velocity.

Table 4 – Influence of stirring velocity on ultrafiltration parameters and permeate quality. Ultrafiltration was done through the membrane of 10 kDa at the pressure of 3 bar.

Stirring rate (rpm)	$\alpha Cs.10^{15}$ (m/kg)	t (min)	$J.10^6$ at « steady state » stage ($m^3/m^2.s$)*	τ_{pr} (%)	τ_{co} (%)	A_{420} nm
0	9.55±0.58	1833	0.37	92.1	90.8	1.457
200	1.57±0.16	600	2.12	96.8**	92.5	1.221
400	1.16±0.08	292	2.89			
500	0.84±0.07	272	3.26			
600	0.83±0.13	272	3.28			

*beginning from VRR=1.25

**mean value of the data from 200-600 rpm (no significative difference)

Figure 5 shows that the evolution of permeate flux *J* vs. *VRR* can be approximated by the straight line. The increase of stirring velocity (and therefore higher shear rate) leads to the rise of slopes of the straight lines indicating higher values of mass transfer coefficient (30). Extrapolation of the obtained straight lines (dashed lines in Fig. 5) indicates that lower stirring velocity leads to higher values of maximal VRR_{max} (at J = 0). This may be related to a formation of more concentrated and compressed deposit (filter cake) on the membrane. The extrapolated values of VRR_{max} (at J = 0) and the values of mass transfer coefficient k determined from the slope of J=f(ln(VRR)) (Fig. 5) are presented in Table 5.

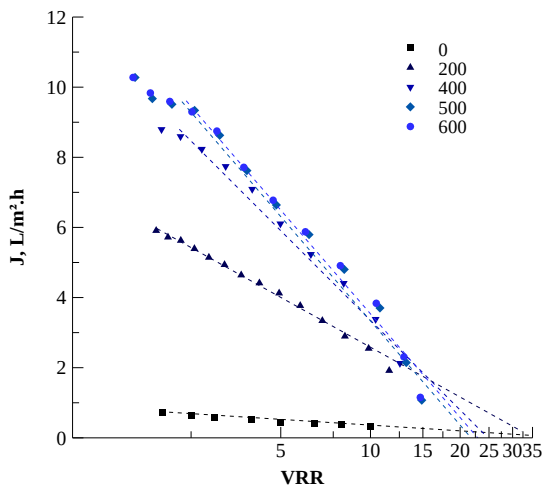


Figure 5 - Filtrate flux *J* versus *VRR* at various stirring rates (rpm)

Table 5 – Influence of stirring velocity on mass transfer parameters (*k* and VRR_{max}). Ultrafiltration was done through the membrane of 10 kDa at the pressure of 3 bar.

Stirring (rpm)	0	200	400	500	600
$k.10^6$ (m/s)	0.07	0.58	1.07	1.16	1.17
VRR_{max} (J=0)	36.48	32.05	24.87	21.96	22.27

On the other part, differences in rejection of colorants and impurities were noticed (Table 4) between both stirred and unstirred ultrafiltrations, with higher retention when ultrafiltration operated under agitation. Behavior of stirred ultrafiltration of different juices was earlier discussed in Loginov *et al*. (2011), Loginova *et al*. (2011), Zhu and Mhemdi (2016). Difference between the behavior of unstirred and stirred dead-end ultrafiltration may be related to the different fouling mechanism occurring. Indeed, while unstirred ultrafiltration was ruled by classic cake formation mechanism, as shown in Figure 6 (n = 0.04 and can be approximated to n ≈ 0 in Eq. 6), stirring changed fouling mechanism. At the stirring velocity 500 rpm, ultrafiltration mechanism was initially close to the mechanism of cake formation (n = - 0.7 and can be approximated to n ≈ 0), and then was more close to the mechanism of complete pore blocking (n=2.48 that can be approximated to n ≈ 2) when the steady state was reached (VRR=1.25). Retardation of particles deposition due to the stirring could explain this alternative membrane fouling. This fouling change occurring during ultrafiltration of juices has also been noticed by Liu *et al.* (2010). Generally, the pore blocking is a common fouling mechanism for the filtration of low concentrated suspensions. Iritani and Katagiri (2016) have proposed combined models based on the conventional simple fouling models. In our case, particles blocked at the inlet of membranes pores could contribute to both cake formation and pore blocking, which could explain the successive fouling mechanisms.

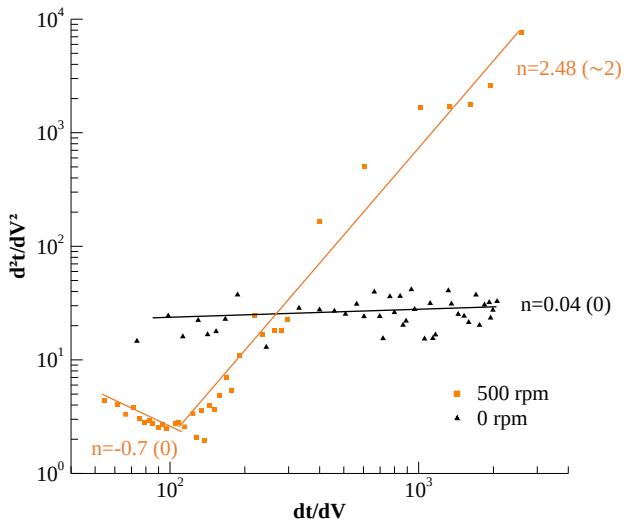


Figure 6 – Modelling of fouling mechanism during ultrafiltration by plotting dt²/dV² vs dt/dV

III.3. Impact of pressure

Figure 7 shows that the parameter αC_s increases with filtration pressure ΔP and therefore layer resistance and total membrane fouling increases with transmembrane pressure. It can be seen that membrane fouling during unstirred ultrafiltration was noticeably higher than during stirred ultrafiltration. Fitting of experimental data by Eq. (5) yields $\alpha_0 C_s = 3.87.10^{13}$ m/kg and s=0.8 for unstirred juice and $\alpha_0 C_s = 2.16.10^{12}$ m/kg and s=1.2 for stirred juice. The value of s is in agreement with the values reported for unstirred filtration of various natural juices and rich proteins juices (34,35). Table 6 shows that the maximal volume reduction ratio VRR_{max} (at J = 0) increases with higher pressure, leading to more concentrated and denser layer deposit on the membrane. In spite of higher transmembrane pressure ΔP, mass transfer coefficient k remains nearly unchanged due to the high compressibility of the cake deposit (s >1). Denser layer deposit under the increased pressures leaded to better retention of proteins and colloids (higher values of τ_{pr} and τ_{co}) and higher purity of permeate P_r (Table 7).

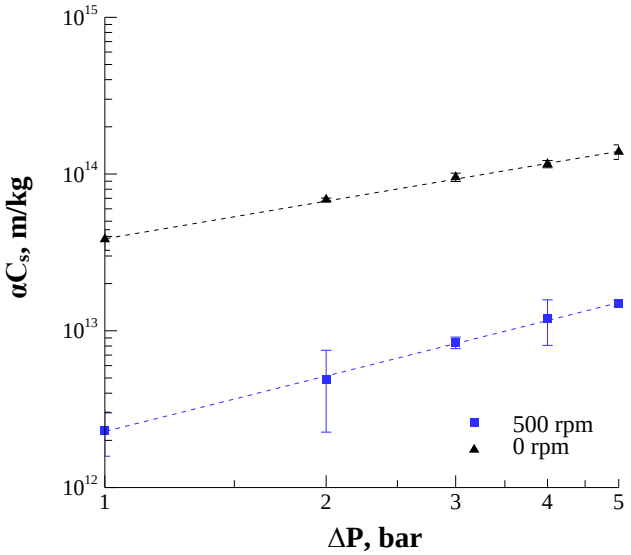


Figure 7 – Parameter αC_s vs pressure ΔP for stirred (500 rpm) and unstirred dead-end ultrafiltration

Table 6 – Influence of transmembrane pressure on the mass-transfer parameters (k and VRR_{max}). Ultrafiltration was done through the membrane of 10 kDa under the stirring of 500 rpm.

ΔP (bar)	1	2	3	4	5
$k.10^6$ (m/s)	1.23	1.19	1.23	1.47	1.39
VRR_{max} (J=0)	18.71	19.26	21.96	25.78	30.92

Table 7 – Influence of transmembrane pressure on the rejection ratios of proteins (τ_{pr}) and colloids (τ_{co}), and permeate purity P. Ultrafiltration was done through the membrane of 10 kDa under the stirring of 500 rpm.

ΔP (bar)	1	2	3	4	5
τ_{pr} (%)	93.87±0.52	95.04±0.56	96.61±0.13	96.24±0.09	96.39±0.29
τ_{co} (%)	91.89±1.14	92.39±1.29	92.50±1.59	92.80±1.58	93.51±0.58
P_r (%)	87.4	88.3	89.6	89.4	90.1

III.4. Membrane fouling

Stirred ultrafiltration (500 rpm, ΔP=5 bar) with PES membrane of 10 kDa, permitted obtain the pure juice (P =90.1%) rich in glucosinolates (C_{GSL} = 3.55 g/L) with a concentration of sinigrin C_{SIN} = 3.39 g/L and gluconapin C_{GNA} = 0.16 g/L. After filtration, the resistance of fouled membrane was estimated after removal of the cake deposit and washing membrane with distilled water. The resistances of new (R_{m0}) and fouled (R_{mf}) membranes were compared meaning filtration of distilled water. The value of R_{mf} was noticeably higher than the value of R_{m0} = $9.30.10^{12}$ m^{-1} with a ratio R_{mf}/R_{m0} = 4.26. This suggests an important membrane fouling. However, after unstirred ultrafiltration membrane fouling was less pronounced resulting a ratio R_{mf}/R_{m0} = 1.6. Such difference in membrane fouling in stirred and unstirred ultrafiltration can be explained by different mechanism of cake formation in both processes. Deposit growing on the membrane surface during unstirred dead-end ultrafiltration corresponds to the cake formation mechanism (Fig. 6). This cake protects better membrane pores from irreversible clogging. Deposit formation on the membrane surface during stirred dead-end ultrafiltration corresponds to the pore blocking mechanism (Fig. 6), which leads to irreversible clogging of membranes pores. In these conditions chemical cleaning of the membrane should be performed.

III.4. Removal of irreversible membrane fouling (chemical cleaning)

III.4.1 Selection of cleaning agent

Figure 8 presents the volume of filtrate V collected during filtration of distilled water (ΔP=3 bar) through clean, fouled and regenerated PES membranes of 10 kDa. Regeneration of the membranes was done with distilled water and 4% (w:v) aqueous solutions of different chemical agents (HCl, NaCl and NaOH). Fouled membranes were obtained after stirred ultrafiltration (500 rpm, ΔP=5 bar. Membrane regeneration with water was inefficient since flux recovery did not exceed F_R = 2% (Figure 8). Between studied chemical agents, NaOH was the most efficient for the membrane regeneration with a flux recovery of F_R =88.4%, compared to HCl and NaCl (F_R =11.1 and 3.7% respectively) (insert in Figure 8). Said *et al*. (36) noticed the same positive effect of NaOH for the chemical cleaning of PES membrane fouled during ultrafiltration of palm oil effluent. In another study, 90% of flux was recovered by soaking PES membranes in solutions of NaOH with a disinfectant (NaOCl) (37). The efficiency of NaOH compared to other agents could be explained by the negative charge of the solution which meets the negative charge of the PES membrane, resulting in generation of a repulsive force between the solution and PES membrane. This contributes to release foulants from the membrane surface. NaOH was then selected for the optimization of membrane cleaning conditions.

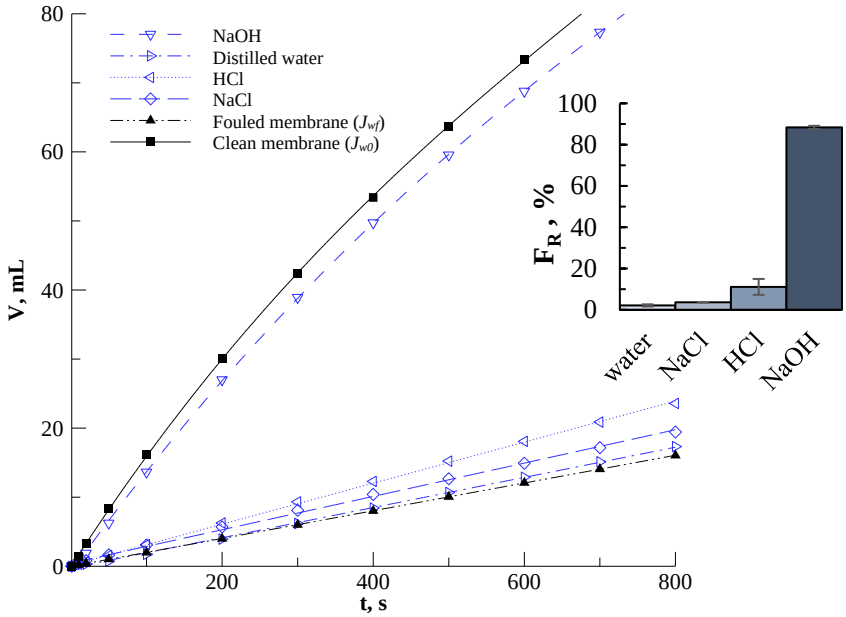


Figure 8 – Volume of filtrate collected during filtration of distilled water (ΔP=3 bar) through clean and fouled PES membrane of 10 kDa and after treatment with 4% (w:v) water solutions of different chemical agents (NaOH, HCL, and NaCl) (ΔP=5 bar). Insert presents the flux recovery F_R after the treatment.

III.4.2. Influence of operating conditions for membrane regeneration

Influence of NaOH concentration, applied pressure and quantity (volume) of the NaOH solution were investigated to improve membrane regeneration. For the study of the first two parameters, the volume of NaOH solution was fixed at V_{NaOH} = 100 mL. Increasing of NaOH concentration C_{NaOH} from 1 to 5% improved significantly the membrane regeneration, as shown in Figure 9a. When the membrane regeneration was proceeded at ΔP=5 bar, flux recovery F_R increased from 31.8% (with 1% NaOH) to 93.4% (with 5% NaOH), and resistance removal R_R increased from 62.1 to 98.7%. Better membrane recovery with higher NaOH content of cleaning solution was also observed by Said et *al*. (2014).

Pressure also plays an important role in the membrane cleaning. Figure 9b shows that increasing pressure from 2 to 5 bar (by using V_{NaOH} = 100 mL and C_{NaOH} = 5%) improved both flux recovery (from 67.1 to 93.4%) and resistance removal (from 91.7 to 98.7%).

Finally, the influence of volume of flushing solution (at fixed C_{NaOH} = 5% and ΔP=5 bar) was investigated (Figure 9c). Membrane regeneration was improved with increase of the volume of flushing solution used in experiments, and both flux recovery F_R and resistance removal R_R were increased. For instance, with increase of V_{NaOH} from 30 to 75 mL, the value of flux recovery F_R increased from 39.4 to 97.8% and the value of membrane resistance removal R_R increased from 75 to 99.5%. Duration of membrane regeneration needed for the membrane recovery was 11 min (V_{NaOH} = 75 mL) and 15 min (V_{NaOH} = 100 mL). This result is in agreement with a study (Levitsky *et al*., 2012) where chemical regeneration of the membraned did not exceed 20 min.

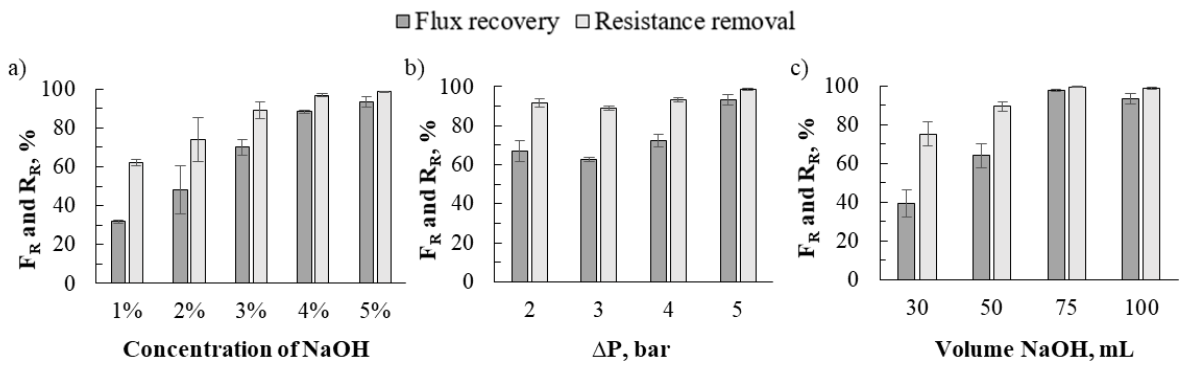


Figure 9 – Influence of (a) NaOH concentration (V_{NaOH} =100 mL, ΔP=5 bar), (b) pressure (V_{NaOH} =100 mL, C_{NaOH} = 5%) (b), and (c) NaOH solution volume (C_{NaOH} =5%, ΔP=5 bar) on the flux recovery F_R and resistance removal R_R of studied PES membrane (10 kDa)

Macroscopic aspect of treated membrane (5% NaOH, 5 bar, 11 min) was similar to a clean one with most foulants removed (Figure 10b).

Purification of juice with treated membrane (5 bar, 500 rpm) showed also that membrane performances were recovered with similar rejection of proteins (τ_{pr} = 96.4 vs. 94.9%) and colloids (τ_{co} = 93.5 vs. 92.9%) and filtration kinetics (Figure 10a), which show the impact of treatment on membrane structure was minimal.

Table 8 – Rejection ratio of proteins and colloids after ultrafiltration of crude glucosinolates juice with clean and treated membrane (10 kDa, 5 bar, 500 rpm)

Rejected components	τ_{pr} (%)	τ_{co} (%)	A_{420} nm
Clean membrane	96.39±0.29	93.51±0.58	1.221
Treated membrane	94.93±0.13	92.90±0.93	1.193

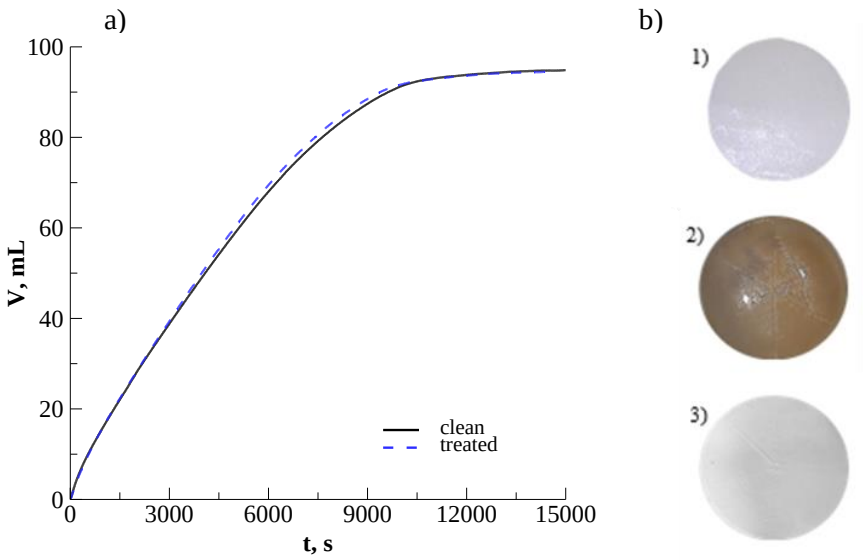


Figure 10 – a) Comparison of filtration kinetics of crude GSL juice with cleand and treated 10 kDa PES membrane (ΔP = 5 bar, 500 rpm), b) Macroscopic aspect of 1) clean 2) fouled and 3) treated membrane

Conclusion

In this study dead-end ultrafiltration of crude juice expressed from defatted meal of mustard seeds was investigated. Best impurities rejection (>96%) was obtained using a 10 kDa membrane giving a high quality permeate (≈90%) rich in glucosinolates that could be very suitable for biofumigation strategy. The retentate concentrated in proteins can also be valorized by mixing it with defatted cake for animal feeding. Differences in rejection performances and membrane fouling were noticed depending on filtration mode (stirred or unstirred). A complete blocking mechanism was responsible for the irreversible membrane fouling, which is important limiting factor of dead-end ultrafiltration. Efficient chemical cleaning using NaOH solution removed most of foulants (99%) and restored initial membrane performances.

Acknowledgements

We thank Mr. Jérôme Gervais and "Chambre d'Agriculture de la Côte-d'Or" (Bretenière, France) for providing seeds. We also thank SAS PIVERT for their financial support.

References

1. Fahey, J.W; Zalcmann, A.T.; Talalay, P. (2001) The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, *56*: 5–51.
2. Holst, B.; Williamson, G. (2004) A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 21 (3): 425–447.
3. Grubb, C.D.; Abel, S. (2006) Glucosinolate metabolism and its control. *Trends Plant Sci.*, 11 (2): 89–100.
4. Guerrero-Diaz, M.M.; Lacasa-Martínez, C.M.; Hernández-Piñera, A.; Martínez-Alarcón, V.; Lacasa-Plasencia, A. (2013) Evaluation of repeated biodisinfestation using Brassica carinata pellets to control Meloidogyne incognita in protected pepper crops. *Span. J Agric. Res.*, 11 (2): 485–493.
5. Sotelo, T.; Lema, M.; Soengas, P.; Cartea, M.E.; Velasco, P. (2015) In vitro activity of Glucosinolates and their degradation products against Brassica-pathogenic bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81: 432–440.
6. Bones, A.M.; Rossiter, J.T. (1996) The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant.*, 97: 194–208.
7. Karcher, A.; Melouk, H.A.; El Rassi, Z. (1999) High-performance liquid phase separation of glycosides. 5. Determination of individual glucosinolates in cabbage and rapeseed by laser-induced fluorescene capillary electrophoresis via the enzymatically released isothiocyanate aglycon. *J. Agric. Food Chem.*, 47 (10): 4267–4274.
8. Sarwar, M.; Kirkegaard, J.A.; Wong, P.T.W.; Desmarchelier, J.M. (1998) Biofumigation potential of brassicas. *Plant Soil*, 201 (1): 103–112.
9. Bohinc, T.; Goreta-Ban, S.; Ban, D.; Trdan, S. (2012) Glucosinolates in plant protection strategies: A review. *Arch. Biol. Sci.*, 64 (3): 821–828.
10. Wang, T.; Liang, H.; Yuan, Q. (2012) Separation of sinigrin from Indian mustard (*Brassica juncea L.*) seed using macroporous ion-exchange resin. *Korean J. Chem. Eng*., 29 (3): 396-403.
11. Zhou, J.; Qui, A.; Hu, J. (2005) Separation and purification of the main glucosinolates from rapeseeds. *Chin. J. Chromatogr.*, 23 (4): 411-414.

12. Song, L.; Thornalley, P.J.; Iori, R. (2006) Purification of major glucosinolates from Brassicaceae seeds and preparation of isothiocyanates and amine metabolites. *J. Sci. Food Agric.*, 86 (8): 1271-1280
13. Xie, Z.; Wang, R.; Wu, Y.; Yang, L.; Wang, Z.; Li, Y. (2012) An efficient method for separation and purification of glucosinolates stereoisomeres from *radix isatidis*. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 35 (1): 153-161.
14. Fahey, J.W.; Wade, K.L.; Stephenson, K.K.; Chou F.E. (2003) Separation and purification of glucosinolates from crude plant homogenates by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A*, 996 (1-2): 85-93
15. Rochfort, S.; Caridi, D.; Stinton, M.; Trenerry, V.C.; Jones R. (2006) The isolation and purification of glucoraphanin from broccoli seeds by solid phase extraction and preparative high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1120 (1-2): 205-210.
16. Lee, I.; Boyce, M.C. (2011) Extraction and Purification of Glucoraphanin by Preparative High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chem. Educ.*, 88 (6): 832-834.
17. Toribio, A.; Nuzillard, J.M.; Renault, J.H. (2007) Strong ion-exchange centrifugal partition chromatography as an efficient method for the large-scale purification of glucosinolates. *J. Chromatogr. A*, 1170 (1-2): 44-51.
18. Zhu, Z.; Mhemdi, H.; Ding, L.; Bals, O.; Jaffrin, M.Y.; Grimi, N.; Vorobiev, E. (2015) Dead-end dynamic ultrafiltration of juice expressed from electroporated sugar beets. *Food Bioprocess Technol.*, 8 (3): 615–622.
19. Zhu Z.; Mhemdi H. (2016) Dead end ultra-filtration of sugar beet juice expressed from cold electrically pre-treated slices: Effect of membrane polymer on fouling mechanism and permeate quality. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 36: 75-82.
20. Almohammed, F.; Mhemdi, H.; Vorobiev, E. (2017) Purification of juices obtained with innovative pulsed electric field and alkaline pressing of sugar beet tissue. *Sep. Purifi. Technol.*, 176: 156-164.
21. Cassano, A.; Marchio, M.; Drioli, E. (2007) Clarification of blood orange juice by ultrafiltration:analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination* 212: 15–27.
22. Onsekizoglu, P.; Savas Bahceci, K.; Jale Acar, M. (2010) Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: a comparative quality assessment. *J. Membr. Sci*. 352: 160–165.
23. Laorko, A.; Li, Z.; Tongchitpakdee, S.; Chantachum, S.; Youravong, W. (2010) Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. *J. Food Eng*. 100: 514–521.
24. Shi, X.; Tal, G.; Hankins, N.P.; Gitis, V. (2014) Fouling and cleaning of ultrafiltration membranes: A review. *J. Water Process Eng.*, 1: 121–138.
25. Suchecka T.; Gradkowski M. (2016) Methods of chemical regeneration of polymeric membranes. *Problemy Eksploatacji – Maintenance Problems*, 183-196.
26. Loginov, M.; Loginova, K.; Lebovka, N.; Vorobiev, E. (2011) Comparison of dead-end ultrafiltration behaviour and filtrate quality of sugar beet juices obtained by conventional and “cold” PEF-assisted diffusion. *J. Membr. Sci.*, 377: 273-283.
27. Grenier, A.; Meireles, M.; Aimar, P.; Carvin P. (2008) Analysing flux decline in dead-end filtration. *Chem. Eng. Res. Des.*, 8: 1281-1293.
28. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72: 248–254.

29. Cherniavskaia, L.; Pustohod, A.; Ivolga, N. (1995) *Technochemical control of granulated sugar and refined sugar*. Moscow: Kolos.
30. Su, Z.-G.; Colton, C.K. (1993) Crossflow Membrane Filtration in *Protein Purification Process Engineering*, edited by Harrison Roger; CRC Press.
31. Loginova, K.; Loginov, M.; Vorobiev, E.; Lebovka, N.I. (2011) Quality and filtration characteristics of sugar beet juice obtained by "cold" extraction assisted by pulsed electric field. *J. Food Eng.*, 106 (2): 144–151.
32. Liu, D.; Savoire, R.; Vorobiev, E.; Lanoisellé, J.L. (2010) Effect of Disruption Methods on the Dead-End Microfiltration Behavior of Yeast Suspension. *Sep. Sci. Technol.*, 45: 1042-1050.
33. Iritani, E.; Katagiri, N. (2016) Developments of Blocking Filtration Model in Membrane Filtration. *Kona Powder Part J.*, 33: 179-202.
34. Ho, C.-C.; Zydney, A.L. (2002) Transmembrane pressure profiles during constant flux microfiltration of bovine serum albumin. *J. Membr. Sci*. 209: 363–377.
35. Iritani, E.; Nagaoka, H.; Katagiri, N. (2008) Determination of filtration characteristics of yeast suspension based upon multistage reduction in cake surface area under step-up pressure conditions. *Sep. Purifi. Technol*. 63: 379–385.
36. Said, M.; Mohammad A.W.; Nor, M.T.M.; Abdullah, S.R.S.; Abu Hasan, H. (2014) Chemical cleaning of fouled polyethersulphone membranes during ultrafiltration of palm oil mill effluent. *Membr. Water Treat*., 5 (3): 207-2019.
37. Skorvan O.; Holba M.; Bodik I.; Mikulasek P. (2012) Comparison of PES membrane chemical cleaning efficiency using different protocols. *Procedia Eng.*, 44: 1860-1863.
38. Levitski I.; Naim R.; Duek A.; Gitis V. (2012) Effect of time in Chemical Cleaning of Ultrafiltration Membranes. *Chem. Eng. Technol*. 35 (5): 941-946.

III.4. Conclusion générale et perspectives

Ce projet de thèse a porté sur la mise en place, l'étude et l'optimisation d'un schéma de valorisation des graines de moutarde brune dans un concept de bioraffinerie. Ce schéma de valorisation est notamment centré sur la valorisation des glucosinolates, molécules actives à fort potentiel d'application en biofumigation en tant que produit phytosanitaire biosourcé. Le sujet a été traité dans une approche globale de valorisation qui intégre les acteurs en amont et en aval de la chaine de transformation. Cette thèse s'est articulée autour de différents axes de travail : l'inactivation de la myrosinase dans les graines de moutarde, l'extraction de l'huile par pressage mécanique et l'extraction et la purification des glucosinolates.

Le premier défi a porté sur l'inactivation de la myrosinase pour éviter la dégradation des glucosinolates. La littérature fournissait de nombreuses données qualitatives sur les conditions d'inactivation de l'enzyme après son extraction mais très peu sur les conditions d'inactivation intrinséqument dans les graines sans extraction préalable. Différents prétraitements thermiques (chauffage conventionnel, chauffage micro-ondes) et hydrostatique (CO_2 supercritique) ont été utilisés et leur influence sur l'activité enzymatique et la conservation des composés d'intérêt a été étudiée.

Une méthode pour mesurer l'activité enzymatique a été mise en place. L'inactivation thermique de la myrosinase a été dans un premier temps étudié extrinsèquement après l'extraction de l'enzyme afin d'évaluer sa stabilité thermique. Les hydrolyses menées ont révélé une activité maximale de l'enzyme à 40°C et sa dénaturation à partir de 50°C. Les essais expérimentaux ont montré que l'enzyme était fortement dénaturée à partir de 70°C et totalement inactive à partir de 75°C pendant 10 min. La modélisation des cinétiques d'inactivation ont permis d'appréhender le mécanisme d'inactivation de l'enzyme en milieu aqueux. Deux modèles (le modèle biphasique et le modèle à étapes sucessives) corrèlent bien avec les données expérimentales.

Les essais d'inactivation intrinsèque de l'enzyme dans les graines ont montré la nécessité d'opérer dans des conditions plus sévères pour inactiver l'enzyme : un chauffage à 80°C pendant 70 min est nécessaire pour une inactivation totale de l'enzyme sans dégrader les glucosinolates et les protéines contenus dans les graines. A plus haute température (90°C), l'inactivation est plus rapide (40 min) mais le traitement dégrade la sinigrine et surtout la gluconapaine. La modélisation a montré une bonne corrélation des cinétiques d'inactivation avec un modèle de 1er ordre. Ceci montre que le mécanisme d'inactivation de l'enzyme intrinséquement est différent de l'inactivation extrinséque. Le calcul des coefficients cinétiques de désactivation montre que l'inactivation intrinséque est plus dure à cause d'une barrière énergétique plus élevée. Le traitement par micro-ondes à 3W/g a montré des similitudes avec la cuisson à 80°C, montrant que la température des graines et le temps d'exposition sont les principaux facteurs significatifs responsables de l'inactivation, indépendamment du mode de chauffage. Un traitement à des puissances plus élevées dégrade les GSL à cause d'une augmentation importante de la température. Le traitement en conditions supercritiques a montré le potentiel d'inactivation par CO_2 dans des conditions supercritiques (67.5 MPa et 68°C) mais la lenteur de la cinétique d'inactivation et la dégradation des GSL lors du traitement limitent le potentiel de ce procédé pour une implémentation industrielle.

Sur les bases des résultats obtenus, une inactivation intrinséque de l'enzyme à 80°C pendant 70 min a été sélectionnée en amont de l'extraction de l'huile. Les conditions sont en effet proches de celles appliquées pour la cuisson des graines oléagineuses dans le procédé conventionnel de trituration.

L'extraction de l'huile a été réalisée par pressage mécanique. L'application d'un double pressage à 100 bars et 80°C a permis d'obtenir un rendement global d'extraction de 84% et de concentrer les glucosinolates (144-158 µmol/g MS) et les protéines (36-40%) dans le tourteau.

Le tourteau obtenu a été utilisé pour en extraire les GSL dans leur état natif. L'extraction a été réalisée en couplant la diffusion avec un prétraitement par décharges électriques de haute tension pour intensifier les phénomènes de transfert. L'objectif est de maximiser l'extraction des GSL, minimiser l'extraction des protéines et utiliser uniquement des solvants verts pour remplacer le méthanol habituellement utilisé. Une étude paramétrique a été tout d'abord réalisée pour optimiser les paramètres d'extraction solide/liquide. L'impact du solvant, de la température et du ratio solide-liquide ont été étudiés. Les conditions optimisées (solvant eau/éthanol 60/40 (v:v), 40°C, ratio L/S de 10, 8 min) ont permis de récupérer 90% de la sinigrine et 75% de la gluconapine.

L'application d'un prétraitement par DEHT à 40kV pendant 3.5 ms a permis de récupérer 97% de sinigrine et 65% directement lors du traitement sans opération de diffusion subsidiaire. Une meilleure sélectivité d'extraction est obtenue par DEHT par rapport au broyage+diffusion à 40°C avec moins de protéines extraites (3.2 contre 6.8%). Le tourteau résiduel après séchage conserve une haute teneur protéique (40.3%) et une très faible concentration en glucosinolates (6.8 µmol/g MS) permettant son utilisation en alimentation animale. Par rapport au broyage+diffusion, l'utilisation des DEHT permet un gain énergétique considérable (233 vs 577 kJ /kg).

La purification des extraits obtenus riches en glucosinolates a été étudiée ensuite selon deux techniques : chromatographie d'échange d'ions et ultrafiltration.
Pour la chromatographie, une résine forte et faiblement basique ont dans un premier temps été comparées sur la base de leur sélectivité et capacité d'adsorption des glucosinolates. Les cinétiques d'adsorption ont été étudiées et modélisés. Il en ressortait que la résine forte présente de meilleurs taux et capacité d'adsorption que la résine faible. L'étude de l'influence de la température sur l'efficacité de l'adsorption des glucosinolates a permis de mettre en évidence le caractère endothermique de la réaction d'adsorption dont le mécanisme repose sur le modèle monocouche de Langmuir. La désorption des glucosinolates a été optimisée en mode statique et 72.9% de la sinigrine isolée a pu être récupérée via élution avec une solution de NaCl à 1M à 30°C. La pureté de l'extrait a augmenté de 43.1 à 79.7%. Des essais dynamiques sur colonne ont permis la récupération de 64.5% de la sinigrine et 28% de la gluconapine en faisant varier le débit d'élution et le pH de la solution éluante.

La filtration membranaire a été etudiée en mode frontal à l'aide d'une cellule de laboratoire. L'influence du seuil de coupure de la membrane, la pression et la vitesse d'agitation a été étudié et optimisé. L'efficacité du procédé a été évaluée par le suivi cinétique et le calcul des paramètres caractéristiques de filtration (résistance du gâteau, membrane, débit de filtration) et par la mesure de la pureté du permet. L'utilisation d'une membrane 10 kDa a permis la rétention de 96.6% des protéines et 92.7% des colloïdes et d'obtenir un perméat d'une pureté d'environ 90%. La modélisation des cinétiques de filtration a mis en évidence l'existence d'une combinaison de modes de colmatage avec agitation. Ce colmatage a été efficacement éliminé via un nettoyage chimique des membranes par une solution de NaOH à 5%, 5 bars pendant 11 min sans impacter les performances de filtration et prolongeant ainsi significativement le cycle d'utilisation de membrane d'ultrafiltration. Le jus produit riche en glucosinolates (3.36 g/L de sinigrine et 0.16 g/L de gluconapine) pourra ainsi être utilisé pour le

développement d'une formule phytosanitaire pour la protection des cultures et la biodésinfection des sols.

La combinaison de la purification du jus par ultrafiltration suivie de l'isolation des glucosinolates par chromatographie d'échange d'ions pourrait être interessante pour obtenir des jus de très haute pureté (>95%).

Au terme de ce travail, plusieurs voies d'investigation supplémentaires pourraient être engagées :

Sur le plan scientifique, plusieurs phénomènes méritent d'être étudiés en profondeur pour mieux comprendre les mécanismes associés.

>> Pour la myrosinase, il serait intéressant de mieux comprendre l'origine de la différence observée entre inactivation intrinséque et extrinséque en s'intéressant à la structure moléculaire de l'enzyme. En effet il est connu que l'efficacité de l'enzyme est surtout liée à sa conformation 3D. La caractérisation de l'impact du traitement (thermique, hydrostatique) sur la structure de l'enzyme permettrait d'établir les corrélations structure/activité nécessaire à la compréhension des phénomènes étudiés.

>> Une caractérisation plus approfondie des graines à l'issue des différents traitements serait également nécessaire pour vérifier la conservation de la qualité des composés d'intérêt (composition en acide gras et en acides aminés).

>> Concernant la partie extraction, il serait important d'élucider l'impact des DEHT sur les cellules pour mieux comprendre l'origine de la sélectivité d'extraction observée lorsqu'un traitement par DEHT est appliqué. Plus généralement, la caractérisation de l'impact des traitements (US, DEHT) sur la structure et l'endommagement cellulaire serait intéressante. De plus l'impact de l'extraction sur la valeur nutritive du tourteau résiduel (digestibilité, valeur énergétique) devrait être évalué et comparé au tourteau brut obtenu directement après extraction de l'huile.

>> La purification par chromatographie d'échange d'ions mériterait une étude plus approfondie comme évoqué précédemment pour intensifier l'efficacité de la technique via une étude comparative des performances de plusieurs résines échangeuses d'anions.

>> Finalement, il faut aborder la partie formulation pour développer une formule phytobiotique à base des GSL purifiés et tester l'efficacité des produits formulés *in vitro* et *in vivo*.

Sur le plan technologique, il serait important d'extrapoler les procédés optimisés à l'échelle pilote en vue de leur validation notamment pour l'ultrafiltration via l'utilisation de systèmes tangentiels ou à disques rotatifs afin d'obtenir des débits de traitements plus élevés (> 50 L/m².h).

Par ailleurs, il est nécessaire de faire une évaluation des impacts économiques et environnementaux du schéma de bioraffinage proposé.

III.5. Références bibliographiques

Agerbirk, N. and Olsen, C.E. (2012). 'Glucosinolate structures in evolution', *Phytochemistry*, 77, pp. 16–45.

Al-Gendy, A.A. and Lockwood, G.B. (2003). 'GC-MS analysis of volatile hydrolysis products from glucosinolates in Farsetia aegyptia var. ovalis', *Flavour Fragr. J.*, 18, pp. 148–152.

Almohammed, F. (2017). *Application des électrotechnologies pour une valorisation optimisée de la betterave à sucre dans un contexte de bioraffinerie*. Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne. Compiègne, France.

Angus, J.F., Gardner, P.A., Kirkegaard, J.A. and Desmarchelier, J.M. (1994). 'Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus', *Plant Soil*, 162*(1)*, pp. 107–112.

Balasundaram, B., Harrison, S. and Bracewell, D. G. (2009). 'Advances in product release strategies and impact on bioprocess design', *Trends Biotechnol.*, 27, pp. 477–485.

Baltacıoğlu, H., Bayindirli, A. and Severcan, F. (2013). 'Inactivation of Mushroom Polyphenoloxidase (PPO) by Thermosonication', in *4th International Conference on Food Engineering and Biotechnology*, pp. 55–58.

Barba, I., Bellostas, N., Peterson, I.L., Puiggros, A., Sørensen, J.C., Sørensen, S. and Sørensen, H. (2005). 'Myrosinases, glucosinolates and transformation products in *Brassica*, *Raphanus* and *Sinapis*: Physico-chemical properties and activity of myrosinase isoenzymes', *G.C.I.R.C.*, bulletin n°22.

Barba, F., Brianceau, S., Turk, M.F. and Boussetta, N. (2015). 'Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric. fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of bio-compounds from fermented grape pomace', *Food Bioprocess. Technol.*, 8(5), pp. 1139–1148.

Barbetti, M.J., Banga, S.S. and Salisbury, P.A. (2012). 'Challenges for crop production and management from pathogen biodiversity and diseases under current and future climate scenarios – Case study with oilseed Brassicas', *Field Crops Res.*, 127, pp. 225–240.

Bellostas, N., Sørensen, J.C. and Sørensen, H. (2007). 'Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four Brassica species of the U-triangle for their biofumigation potential', *J. Sci. Food Agric.*, 87(8), pp. 1586–1594.

Bennett, R.N., Mellon, F.A. and Kroon, P.A. (2004). 'Screening crucifer seeds as sources of specific intact glucosinolates using ion-pair high-performance liquid chromatography negative ion electrospray mass spectrometry', *J. Agric. Food Chem.*, 52(3), pp. 428–438.

Bhandari, S.R., Jo, J.S. and Lee, J.G. (2015). 'Comparison of glucosinolate profiles in different tissues of nine brassica crops', *Molecules*, 20, pp. 15827–15841.

Bhattacharya, A., Li, Y., Wade, K.L., Paonessa, J.D., Fahey, J.W. and Zhang, Y.(2010). 'Allyl isothiocyanate-rich mustard seed powder inhibits bladder cancer growth and muscle invasion', *Carcinogenesis*, 31(12), pp. 2105–2110.

Björkman, R. and Lönnerdal, B. (1973) 'Studies on myrosinase III. Enzymatic properties of myrosinases from *Sinapis Alba* and *Brassica napus* seeds', *BBA – Enzymology*, 327(1), pp. 121–131.

Bolton, G., LaCasse, D. and Kuriyel, R. (2006). 'Combined models of membrane fouling: Development and application to microfiltration and ultrafiltration of biological fluids', *J. Membr. Sci.*, 277(1–2), pp. 75–84.

Bones, A.M. (1990). 'Distribution of ß-thioglucosidase activity in intact plants, cell and tissue cultures and regenerant plants of Brassica napus', *J. Exp. Bot..*, 41, pp. 737–744.

Bones, A.M. and Rossiter, J.T. (1996). 'The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry', *Physiol. Plant.*, 97, pp. 194–208.

Bones, A.M. and Rossiter, J.T. (2006) 'The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates', *Phytochemistry*, 67(11), pp. 1053–1067.

Boussetta, N. (2010). *Intensification de l'extraction des polyphénols par électrotechnologies pour la valorisation des marcs de champagne*. Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne. Compiègne, France.

Boydston, R.A. (2004). 'Take cover from the elements - Brassica cover crops can control weeds and reduce the use of crop protectants in vegetable rotations', *American Vegetable Grower*, pp. 18–19.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem*. 72, 248–254.

Brahim, M. (2016). *Délignification assistée par traitements physiques et chimiques à partir de résidus de colza*. Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne. Compiègne, France.

Brans, G., Schroën, C.G.P.H., Van der Sman, R.G.M. and Boom, R.M. (2004). 'Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges', *J. Membr. Sci.*, 243(1-2), pp. 263–272.

Briens, C., Piskorz, J. and Berruti, F. (2008). 'Biomass valorization for fuel and chemicals production. A Review', *Int. J. Chem. Reactor Eng.*, 6(1), pp.

Brown, P.D. and Morra, M.J. (1996). 'Hydrolysis products of glucosinolates in *Brassica napus* tissues as inhibitors of seed germination', *Plant Soil*, 181, pp. 307–316.

Burton, W., Salisbury, P. and Potts, D. (2003). 'The Potential of canola quality *Brassica juncea* as an oilseed crop for Australia', in *Proc. 13th Biennial Australian Res. Assembly on Brassicas*, pp. 62–64.

Bussy, A. (1840) 'Sur la formation de l'huile essentielle de moutarde', *Journal de pharmacie et de chimie*, 27, pp. 464–471.

Cai, M., Wang, S., Zheng, Y. and Liang, H. (2009). 'Effects of ultrasound on ultrafiltration of *Radix astragalus* extract and cleaning of fouled membrane', *Sep. Purifi. Technol.*, 68(3), pp. 351–356.

Carvalheiro, F., Duarte, L.C. and Girio, F.M. (2008). 'Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments', *J. Sci. Ind. Res.*, 67(11), pp. 849–864.

Cheng, S.M. and Zhu, S.D. (2009). 'Lignocellulosic feedstock biorefinery. The future of the chemical and energy industry', *Bioresources*, 4(2), pp. 456–457.

Cherniavskaia L., Pustohod A., & Ivolga N. (1995), *Technochemical control of granulated sugar and refined sugar*. Moscow: Kolos.

Chuang, C.J., Wu, C.Y. and Wu, C.C. (2008). 'Combination of crossflow and electric field for microfiltration of protein/microbial cell suspensions', *Desalination*, 233, pp. 295–302.

Chung, W.C., Huang, J.W., Huang, H.C. and Jen, J.F. (2003). 'Control, by Brassica seed pomace combined with *Pseudomonas boreopolis*, of damping-off of watermelon caused by Pythium sp.', *Can. J. Plant. Pathol.*, 25(3), pp. 285–294.

Clarke, D. B. (2010) 'Glucosinolates, structures and analysis in food', *Anal. Methods*, 2(4), pp. 310–325.

Cole, R. A. (1976) 'Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in Cruciferae', *Phytochemistry*, 15, pp. 759–762.

Conaway, C.C., Yang, Y.M. and Chung, F.L. (2002). 'Isothiocyanates as Cancer Chemopreventive Agents: Their Biological Activities and Metabolism in Rodents and Humans', *Curr. Drug Metab.*, 3, pp. 233–255.

Cools, K. and Terry, L.A. (2012). 'Comparative study between extraction techniques and column separation for the quantification of sinigrin and total isothiocyanates in mustard seed', *J. Chromatogr. B*, 901, pp. 115–118.

Crank, J., 1975. The mathematics of diffusion, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, UK.

Cruz, R.M.S., Vieira, M.C. and Silva, C.L.M. (2006). 'Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (Nasturtium officinale)', *J. Food Eng.*, 72(1), pp. 8–15.

Daxenbichler, M.E. and Vanetten, C.H. (1974). '5,5-Dimethyloxazolidine-2-thione formation from glucosinolate in Limnanthes alba Benth. seed', *J. Am. Oil Chem.' Soc.*, 51(10), pp. 449–450.

Demirbas, A. (2009). 'Biorefinery', in *Biorefineries: For Biomass Upgrading Facilities*, pp. 75–92.

Demirbas, A. (2009). 'Biorefineries: Current activities and future developments', *Energy Convers. Manage.*, 50(11), pp. 2782–2801.

Demirbas, A. (2010). 'Biorefinery Technologies for Biomass Upgrading', *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 32(16), pp. 1547–1558.

Demirbas, M.F. (2009). 'Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review', *Appl. Energy*, 86, pp. 151–161.

Dixon, G.R. (2007). *Vegetable Brassicas and Related Crucifers*. CABI.

Dougherty, P.A. (1971). 'Treatment of mustard seed'. US3574640 A.

Duke, J.A. (1983). 'Brassica juncea (L.) Czern', in *Handbook of energy crops*.

Dunford, N.T. and Temelli, F. (1996). 'Effect of Supercritical CO2 on Myrosinase Activity and Glucosinolate Degradation in Canola', *J. Agric. Food Chem.*, 44(8), pp. 2372–2376.

Ettlinger, M.G. and Lundeen, A.J. (1956). 'The Structures of Sinigrin and Sinalbin; an Enzymatic Rearrangement', *J. Am. Chem. Soc.*, 78(16), pp. 4172–4173.

Ettlinger, M.G. and Lundeen, A.J. (1957). 'First synthesis of a mustard oil glucoside; The enzymatic Lossen Rearrangement', *J. Am. Chem. Soc.*, 79(7), pp. 1764–1765.

Fahey, J.W., Zalcmann, A.T. and Talalay, P. (2001). 'The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants', *Phytochemistry*, 56, pp. 5–51.

Fenwick, G.R., Heaney, R.K. and Mullin, W.J. (1983). 'Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants', *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 18(2), pp. 123–201.

Fernando, S., Adhikari, S., Chandrapal, C. and Murali, N. (2006). 'Biorefineries: current status challenges and future direction', *Energy Fuels*, 20(4), pp. 1727–1737.

Frandsen, H.B., Markedal, K.E., Martín-Belloso, O., Sánchez-Vega, R., Soliva-Fortuny, R., Sorensen, H., Sorensen, S., Sorensen, J.C. (2014). 'Effects of Novel Processing Techniques on Glucosinolates and Membrane Associated Myrosinases in Broccoli', *Pol. J. Food Nutr. Sci*, 64(1), pp. 17-25.

Friberg, H., Edel-Hermann, V., Faivre, C., Gautheron, N., Fayolle, L., Faloya, V., Montfort, F. and Steinberg, C. (2009) 'Cause and duration of mustard incorporation effects on soil-borne plant pathogenic fungi', *Soil Biol. Biochem.*, 41(10), pp. 2075–2084.

Ghawi, S.K., Methven, L., Rastall, R.A. and Niranjan, K. (2012). 'Thermal and high hydrostatic pressure inactivation of myrosinase from green cabbage : A kinetic study', *Food Chem.*, 131(4), pp. 1240–1247.

Giamoustaris, A. and Mithen, R. (1995). 'The effect of modifying the glucosinolate content of leaves of oilseed rape (Brassica napus ssp. oleifera) on its interaction with specialist and generalist pest', *Annals of Applied Biology*, 126(2), pp. 347–363.

Gil, V. and MacLeod, A. (1980) 'Studies on glucosinolate degradation in Lepidium sativum seed extracts', *Phytochemistry*, 19(7), pp. 1369–1374.

Gil, V. and MacLeod, A. (1980) 'The effects of pH on glucosinolate degradation by a thioglucoside glucohydrolase preparation', *Phytochemistry*, 19(12), pp. 2547–2551.

Glawischnig, E., Mikkelsen, M.D. and Halkier, B.A. (2003). 'Glucosinolates: biosynthesis and metabolism', *Sulphur in Plants*, pp. 145–162.

Graser, G., Schneider, B., Oldham, N.J. and Gershenzon, J. (2000). 'The Methionine Chain Elongation Pathway in the Biosynthesis of Glucosinolates in Eruca sativa (Brassicaceae)', *Arch. Biochem. Biophys.*, 378(2), pp. 411–419.

Grubb, C.D. and Abel, S. (2006). 'Glucosinolate metabolism and its control', *Trends Plant Sci.*, 11(2), pp. 89–100.

Guerrero-Diaz, M. M., Lacasa-Martínez, C. M., Hernández-Piñera A., Martínez-Alarcón, V. and Lacasa-Plasencia, A. (2013). 'Evaluation of repeated biodisinfestation using Brassica carinata pellets to control Meloidogyne incognita in protected pepper crops', *Span. J Agric. Res.*, 11(2), pp. 485–493.

Gupta, S., Sangha, M.K., Kaur, G., Atwal, A.K., Banga, S. and Banga, S.S. (2012). 'Variability for Leaf and Seed Glucosinolate Contents and Profiles in a Germplasm Collection of the Brassica juncea', *Biochem. Anal. Biochem.*, 1(7), pp. 1–5.

Halkier, B.A. and Gershenzon, J. (2006). 'Biology and biochemistry of glucosinolates', *Annu Rev Plant Biol*, 57(1), pp. 303-333.

Hayes, J.D., Kelleher, M.O. and Eggleston, I.M. (2008). 'The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates', *Eur. J. Nutr.*, 47, pp. 73–88.

Hayward, A. (2012). 'Introduction-oilseed Brassicas', in *Genetics, Genomics and Breeding of Oilseed Brassicas*. Science Publishers, pp. 1–13.

Higdon, J.V., Delage, B., Williams, D.E. and Dashwood, R.H. (2007). 'Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and Mechanistic Basis', *Pharmacol. Res.*, 55(3), pp. 224–236.

Holst, B. and Williamson, G. (2004). 'A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds', *Nat. Prod. Rep.*, 21(3), pp. 425–447.

Hong, S.P., Bae, T.H., Tak, T.M., Hong, S. and Randall, A. (2002). 'Fouling control in activated sludge submerged hollow fiber membrane bioreactors', *Desalination*, 143, pp. 219–228.

Iritani, E. and Katagiri, N. (2016). 'Developments of Blocking Filtration Model in Membrane Filtration', *Kona Powder Part J.*, 33, pp. 179-202.

Islam, M.N., Zhang, M. and Adhikari, B. (2014). 'The inactivation of enzymes by ultrasound – a review of potential mechanisms', *Food Rev. Int.*, 30, pp. 1–21.

ISO 9167-1(1992) 'Rapeseed - Determination of glucosinolates content - Part 1: Method using high-performance liquid chromatography'.

Jie, M., Cheung, W.M., Yu, V., Tong, P.H. and Ho, J.W. (2014). 'Anti-proliferative activities of sinigrin on carcinogen-induced hepatotoxicity in rats', *PLOS One*, 9(10).

Jones, H.M. and Kunhardt, E.E. (1995). 'Pre-breakdown currents in water and aqueous solutions and their influence on pulsed dielectric breakdown', *J. Appl. Phys.*, 78, pp. 3308–3314.

Kamm, B. and Kamm, M. (2004). 'Principles of biorefineries', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 64(2), pp. 137–145.

Kamm, B., Kamm, M. and Gruber, P.R. (2006). 'Biorefinery Systems – An Overview', in *Biorefineries - Industrial Processes and Products*, pp. 1–33.

Karcher, A. and El Rassi, Z. (1999). 'Capillary electrophoresis of glucosinolates and their degradation products', *Electrophoresis*, 20(15–16), pp. 3181–3189.

Karcher, A., Melouk, H.A. and El Rassi, Z. (1999). 'High-performance liquid phase separation of glycosides. 5. Determination of individual glucosinolates in cabbage and rapeseed by laser-induced fluorescene capillary electrophoresis via the enzymatically released isothiocyanate aglycon', *J. Agric. Food Chem.*, 47(10), pp. 4267–4274.

Kazmi, A. (2011). *Advanced oil crop biorefineries*. RCS Green. RSC Publishing.

Kirkegaard, J.A., Gardner, P.A., Angus, J.F. and Koetz, E. (1994). 'Effect of Brassica break crops on the growth and yield of wheat', *Aust. J. Agric. Res.*, 45(3), pp. 529–545.

Kobayashi, T., Chai, X. and Fujii, N. (1999). 'Ultrasound enhanced crossflow membrane filtration', *Sep. Purifi. Technol.*, 17, pp. 31–40.

Koutinas, A.A., Wang, R.H. and Webb, C. (2007). 'The biochemurgist—bioconversion of agri-cultural raw materials for chemical production', *Biofuel Bioprod. Bior.*, 1, pp. 24–38.

Kozlowska, H., Rotkiewicz, D. and Bock, H.D. (non daté). 'Inactivation of the enzyme myrosinase in whole rapeseeds'.

Larkin, R.P. and Griffin, T.S. (2007). 'Control of soilborne potato diseases using Brassica green manures', *Crop Prot.*, 26(7), pp. 1067–1077.

Lee, H., Lee, C., Kim, J. and Pyo, S. (2014). 'The inhibitory effect of sinigrin on the production of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 macrophages (1056.5)', *The FASEB Journal*, 28(1).

Lee, H., Lee, C., Rhee, D.K., Um, S.H. and Pyo, S. (2017). 'Sinigrin inhibits production of inflammatory mediators by suppressing NF-κB/MAPK pathways or NLRP3 inflammasome activation in macrophages', *Int Immunopharmacol.*, 45, pp. 163–173.

Liu, D. (2012), *Couplage de technologies électriques et membranaires pour l'extraction / séparation de composés d'intérêt à partir de sous-produits de la vinification*. Thèse de Doctorat de l'Université de Technologie de Compiègne.

Ludikhuyze, L., Ooms, V., Weemaes, C. and Hendrickx, M. (1999). 'Kinetic Study of the Irreversible Thermal and Pressure Inactivation of Myrosinase from Broccoli (Brassica oleracea L. Cv. Italica)', *J. Agric. Food Chem.*, 47(5), pp. 1794–1800.

Luo, L., van der Voet, E. and Huppes, G. (2010). 'Biorefining of lignocellulosic feedstock. Technical, economic and environmental considerations', 101(13), pp. 5023–5032.

Maheshwari, P.N., Stanley, D.W. and Van De Voort, F.R. (1980) 'Microwave Treatment of Dehulled Rapeseed to Inactivate Myrosinase and Its Effect on Oil and Meal Quality', *J. Am. Oil Chem.' Soc.*, 57(7), pp. 194–199.

Mandl, M. G. (2010). 'Status of green biorefining in Europe', *Biofuels, Bioprod. Biorefin.*, 4(3), pp. 268–274.

Manici, L.M., Lazzeri, L. and Palmieri, S. (1997). 'In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi', *J. Agri. Food Chem.*, 45, pp. 2768–2773.

Marsh, R.E. and Waser, J. (1970). 'Refinement of the crystal structure of iron oxychloride', *Acta Cryst. B*, 26(8), pp. 1058-1062.

Mawson, R., Heaney, R.K., Zdunczyk, Z. and Kozlowska, H. (1994a) 'Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 3. Animal growth and performance', *Nahrung*, 38(2), pp. 167–177.

Mawson, R., Heaney, R.K., Zdunczyk, Z. and Kozlowska, H. (1994b) 'Rapeseed meal-glucosinolates and their antinutritional effects. Part 4. Goitrogenicity and internal organs abnormalities in animals', *Nahrung*, 38(2), pp. 178–191.

Mayton, S.H., Olivier, C., Vaughn, S.F. and Loria, R. (1996). 'Correlation of Fungicidal Activity of Brassica Species with Allyl Isothiocyanate Production in Macerated Leaf Tissue', *Phytopathology*, 86(3), pp. 267–271.

Merah, O. (2015). 'Genetic Variability in Glucosinolates in Seed of Brassica juncea : Interest in Mustard Condiment', *J. Chem.*, 2015, pp. 1–6.

Mikkelsen, M.D., Peterson, B.L., Olsen, C.E. and Halkier, B.A. (2002). 'Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates', *Amino Acids*, 22(3), pp. 279–295.

Niu, Y., Rogiewicz, A., Wan, C., Guo, M., Huang, F. and Slominski, B.A. (2015). 'Effect of Microwave Treatment on the Efficacy of Expeller Pressing of Brassica napus Rapeseed and Brassica juncea Mustard Seeds', *J. Agric. Food Chem.*, 63(12), pp. 3078–3084.

Njoroge, S.M.C., Riley, M.B. and Keinath, A.P. (2008). 'Effect of Incorporation of Brassica spp. Residues on Population Densities of Soilborne Microorganisms and on Damping-off and Fusarium Wilt of Watermelon', *Plant Dis.*, 92, pp. 287–294.

Okunade, O.A., Ghawi, S.K., Methven, L. and Niranjan, K. (2015). 'Thermal and pressure stability of myrosinase enzymes from black mustard (*Brassica nigra* L. W.D.J. Koch. var. *nigra*), brown mustard (*Brassica juncea* L. Czern. var. *juncea*) and yellow mustard (*Sinapsis alba* L. subsp. *maire*) seeds', *Food Chem.*, 187, pp. 485–490.

Oliviero, T., Verkerk, R., Van Boekel, M.A.J.S. and Dekker, M. (2014). 'Effect of water content and temperature on inactivation kinetics of myrosinase in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)', *Food Chem.*, 163, pp. 197–201.

Olsen, O. and Sørensen, H. (1981). 'Recent Advances in the Analysis of Glucosinolates', *J. Am. Oil Chem.' Soc.*, 58(9), pp. 857–865.

Osamu, K. (1989). *Biomass Handbook*. Edited by H. W. Carl. Gordon and Breach.

Østergaard, L. and King, G.J. (2008). 'Standardized gene nomenclature for the Brassica genus', *Plant Methods*, 20, pp. 4–10.

Owusu-Ansah, Y.J. and Marianchuk, M. (1991). 'Microwave Inactivation of Myrosinase in Canola Seeds: A Pilot Plant Study', *J. Food Sci*., 56(5), pp. 1372-1374.

Parniakov, O., Barba, F.J., Grimi, N., Lebovka, N. and Vorobiev, E. (2014). 'Impact of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on extraction of high-added value compounds from papaya peels', *Food Res. Int.*, 65(C), pp. 337–343.

Pecastaing, L. (2001). *Conception et réalisation d'un système de génération d'impulsions haute tension ultra brèves Application aux radars larges bandes.* Thèse de Doctorat, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.

Pirkonen, P. (2001). 'Ultrasound in filtration and sludge dewatering', *Advances in Sonochemistry*, 6, pp. 221–246.

Pongmalai, P., Devahastin, S., Chiewchan, N. and Soponronnarit, S. (2013). 'Effect of ultrasonic pretreatment on extractability of glucosinolates from cabbage outer leaves', *The 14th TSAE National Conference and the 6th TSAE International Conference : TSAE 2013*, pp. 119–122.

Rakotovao, M., Gobert, J. and Brullot, S. (2017). 'Bioraffineries rurales: la question de l'ancrage territorial', *36th Lucrările Seminarului Geografic "Dimitrie Cantemir"*, 44, Iasu, Roumanie.

Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, Bo. and Meijer, J. (2000). 'Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae', *Plant Mol. Biol.*, 42(1), pp. 93–113.

Robiquet, P.J. and Boutron, F. (1831). 'Sur la semence de moutarde', *Journal de pharmacie et de chimie*, 17, pp. 279–282.

Rosa, E.A.S. and Rodrigues, P.M.F. (1999). 'Review towards a more sustainable agriculture system: the effect of glucosinolates on the control of soil-borne disease', *J. Hort. Sci. Biotechnol*, 74(6), pp. 667–674.

Sarkar, B., De, S. and DasGupta, S. (2008). 'Pulsed electric field enhanced ultrafiltration of synthetic and fruit juice', *Sep. Purifi. Technol.*, 63, pp. 582–591.

Sarkis, J.R., Boussetta, N., Blouet, C., Tessaro, I.C., Marczak, L.D.F., Vorobiev, E. (2015). 'Effect of pulsed electric fields and high voltage electrical discharges on polyphenol and protein extraction from sesame cake', *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 29(5), pp. 170-177.

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., Wong, P.T.W. and Desmarchelier, J.M. (1998). 'Biofumigation potential of brassicas', *Plant Soil*, 201(1), pp. 103–112.

Simon, A., Gondrexon, N., Taha, S., Cabon, J. and Dorange, G. (2000). 'Low frequency ultrasound to improve dead-end ultrafiltration performance', *Sep. Purifi. Technol.*, 35(16), pp. 2619–2637.

Soon, T.K. (2000) 'An overview of the Asian oleochemical market', in *The Second World Oleochemicals Conference*.

Sotelo, T., Lema, M., Soengas, P., Cartea, M.E. and Velasco, P. (2015) 'In vitro activity of Glucosinolates and their degradation products against Brassica-pathogenic bacteria and fungi', *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, pp. 432–440.

Touya, G. (2005). *Contribution à l'étude expérimentale des décharges électriques dans l'eau et des ondes de pression associées. Réalisation d'un prototype industriel 100kJ pour le traitement de déchets par puissances électriques pulsées*. Thèse de Doctorat de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. Bayonne, France.

Tsao, R., Yu, Q., Potter, J. and Chiba, M. (2002). 'Direct and Simultaneous Analysis of Sinigrin and Allyl Isothiocyanate in Mustard Samples by High-Performance Liquid Chromatography', *J. Agric. Food Chem.*, 50(17), pp. 4749–4753.

U, N. (1935). 'Genome analysis in Brassica with special reference to the experimental formation of B. napus and peculiar mode of fertilization', *Jpn J Bot*, 7, pp. 389–452.

Uda, Y., Kurata, T. and Arakawa, N. (1986) 'Effects of thiol compounds on the formation of nitriles from glucosinolates', *Agric. Biol.Chem.*, 50(11), pp. 2741–2746.

USDA (2002). *USDA nutrient database for standard reference, release 28*. Beltsville Md, United States.

Van der Vossen, H.A.M. and Mkamilo, G.S. (2007). 'Oléagineux', *Ressources Végétales de l'Afrique Tropicale*, pp. 50–55.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M. and Van Loey, A. (2006) 'Temperature and pressure stability of mustard seed (Sinapis alba L.) myrosinase', *Food Chem.*, 97(2), pp. 263–271.

Van Eylen, D., Oey, I., Hendrickx, M. and Van Loey, A. (2008). 'Effects of pressure / temperature treatments on stability and activity of endogenous broccoli (Brassica oleracea L. cv. Italica) myrosinase and on cell permeability', *J. Food Eng.*, 89(2), pp. 178–186.

Verkerk, R., Dekker, M. and Jongen, W.M.F. (1998). 'Glucosinolates', *Natural Toxicants in Food*, pp. 29–53.

Verkerk, R. and Dekker, M. (2004). 'Glucosinolates and myrosinase activity in red cabbage (Brassica oleracea L. var. Capitata f. rubra DC.) after various microwave treatments', *J. Agric. Food Chem.*, 52(24), pp. 7318–7323.

Vorobiev, E. and Lebovka, N. (2010). 'Enhanced extraction from solid foods and biosuspensions by pulsed electrical energy', *Food Eng. Rev.*, 2, pp. 95–108.

Wakeman, R.J. and Williams, C.J. (2002). 'Additional techniques to improve microfiltration', *Sep. Purifi. Technol.*, 26, pp. 3–18.

Wang, L., Boussetta, N., Lebovka, N. and Vorobiev, E. (2018). 'Effects of ultrasound treatment and concentration of ethanol on selectivity of phenolic extraction from apple pomace', *IJFST*, 53(9), pp. 2104-2109.

Wang, T., Liang, H. and Yuan, Q. (2014). 'Separation and Purification of Sinigrin and Gluconapin from Defatted Indian Mustard Seed Meals by Macroporous Anion Exchange Resin and Medium Pressure Liquid Chromatography Separation and Purification of Sinigrin and Gluconapin from Defatted Indian Mustard', *Sep. Purifi. Technol.*, 49, pp. 1838–1847.

Warwick, S.I., Francis, A. and Gugel, R.K. (2009). *Guide to Wild Germplasm of Brassica and Allied Crops (tribe Brassiceae, Brassicaceae)3rd Edition*.

Wathelet, J.-P., Marlier, M., Severin, M., Boenke, A. and Wagstaffe, P.J. (1995). 'Measurement of Glucosinolates in Rapeseeds', *Nat. Toxins*, 3(4), pp. 299–304.

Wathelet, J.-P., Mabon, N. and Marlier, M. (1999). 'Determination of glucosinolates in rapeseed improvement of the official HPLC ISO method (precision and speed)', in *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress*.

Wathelet, J.-P. *et al.* (2004) 'Guidelines for glucosinolate analysis in green tissues used for biofumigation', *Agroindustria*, 3(3), pp. 257–266.

Wimmer, Z. and Zarevúcka, M. (2010). 'A Review on the Effects of Supercritical Carbon Dioxyde on Enzyme Activity', *Int. J. Mol. Sci.*, 11(1), pp. 233–253.

Wijffels, R.H., Barbosa, M.J. and Eppink, M.H.M. (2010). 'Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels', *Biofuel Bioprod. Bior..*, 4(3), pp. 287–295.

Yaldagard, M., Mortazavi, S.A. and Tabatabaie, F. (2008). 'The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's alpha-amylase activity', *Korean J. Chem. Eng.*, 25(3), pp. 517–523.

Zhu, Z., Luo, J., Ding, L., Bals, O., Jaffrin, M.Y. and Vorobiev, E. (2013). 'Chicory juice clarification by membrane filtration using rotating disk module', *J. Food Eng.*, 115, pp. 264–271.