



HAL
open science

Les colorants en sucrerie : détermination de leurs masses molaires et de leurs caractéristiques spectrométriques en vue d'une meilleure évaluation de leur rétention par filtration tangentielle

Amel Mersad

► To cite this version:

Amel Mersad. Les colorants en sucrerie : détermination de leurs masses molaires et de leurs caractéristiques spectrométriques en vue d'une meilleure évaluation de leur rétention par filtration tangentielle. Ingénierie des aliments. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires (ENSIA), 2001. Français. NNT : . tel-03232604

HAL Id: tel-03232604

<https://theses.hal.science/tel-03232604v1>

Submitted on 21 May 2021

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.

THESE

Présentée à

l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires

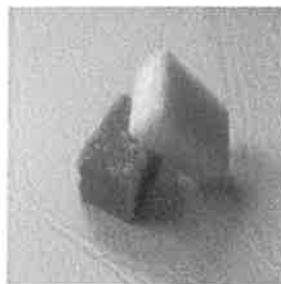
pour l'obtention du titre de
DOCTEUR
Spécialité **Génie des Procédés**

par

Amel MERSAD

Ingénieur de l'Institut National des Industries Alimentaires Boumerdes – Algérie
DEA de l'ENSIA spécialité Génie des Procédés

Les colorants en sucrerie : détermination de leurs masses molaires et de leurs caractéristiques spectrométriques en vue d'une meilleure évaluation de leur rétention par filtration tangentielle



Thèse soutenue le 20 décembre 2001 devant le Jury composé de :

Mme J. COURTOIS, Professeur IUT/GB Amiens
M M. MATHLOUTHI, Professeur Université de Reims
Mme C. BERSET, Professeur ENSIA Massy
M J.M. HOCHART, Docteur Laboratoire R&D Beghin Say
Mme M. DECLoux, Professeur ENSIA Massy

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

REMERCIEMENT

Ce travail de thèse a été financé par l'ENSIA et a été réalisé au sein du département Génie Industriel Alimentaire de l'ENSIA, dans la Halle Nicolas Appert.

J'exprime toute ma gratitude et toute ma reconnaissance à Martine DECLoux, Professeur à l'ENSIA pour m'avoir encadrée et pour avoir permis le financement de cette thèse. Son aide, son soutien moral, sa disponibilité et son amitié m'ont été très précieux. Je ne la remercierai jamais assez.

Je remercie Jérôme TOURON à qui je dois beaucoup pour l'aide et le soutien moral qu'il m'a apporté en particulier dans les moments difficiles.

Je tiens à remercier

Richard LEWANDOWSKI, ingénieur d'études à la Halle N. Appert

Claire FARGUES, maître de conférence à l'IUT d'Orsay

Claudette BERSET, professeur à l'ENSIA

Jean BLETON, ingénieur d'études à l'IUT d'Orsay

Alain TCHAPLA, professeur à l'IUT d'Orsay

Pierre GIAMPAOLI, maître de conférence à l'ENSIA

Agnès MARSSET-BAGLIERI, maître de conférence à l'ENSIA

Marie Noëlle PEYRAT-MAILLARD, maître de conférence à l'ENSIA

Agnès GRIMAL, responsable de la bibliothèque de l'ENSIA

pour leur aide et leur soutien ainsi que pour tous les conseils qu'ils ont pu me conférer.

Mes remerciements s'adressent également à Josiane COURTOIS professeur à l'IUT d'Amiens et à Mohammed MATHLOUTHI, professeur à l'Université de Reims, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, ainsi qu'à Claudette BERSET, professeur à l'ENSIA et Jean-Marie HOCHART, docteur responsable du laboratoire recherche et développement de Beghin Say, pour avoir participé à l'examen de cette thèse.

Je désire également remercier le personnel de l'ENSIA et de la Halle N. Appert pour leur aide, leurs conseils et surtout pour la très bonne ambiance qu'ils ont su créer. Je remercie notamment Michèle COCCOLUTO, Bernard REVUZ, Laetitia HARLAY, Monique BELGOME, Robert SAWKA, Alain SOMMIER, Pablo GRANDA, Colette MAILLARD et Nathalie COQUE.

Enfin je n'oublie pas de remercier toute ma famille pour leur soutien et leurs encouragements.

LISTE DES TRAVAUX PUBLIES AYANT TRAIT A LA THESE

PUBLICATIONS PARUES :

- Decloux M., Tatoud L. et **Mersad A.** (2000). Removal of impurities from raw cane sugar remelts by crossflow filtration. *Zuckerindustrie* 125(2): 106-113.
- Mersad A.**, Lewandowski R., Heyd B. et Decloux M. (2001). Synthèse et caractérisation des colorants en sucrerie : reconstitution au laboratoire et analyses par spectrométrie. *Industries Alimentaires et Agricoles* 118(7/8), 42-51.

CONGRES :

- Decloux M., **Mersad A.**, Martin M. et Soria S. (1998). Etude, avec le système UTP, de l'influence du diamètre des canaux et de la vitesse tangentielle sur le colmatage des membranes céramiques de microfiltration tangentielle de plusieurs diamètre de pores. *PROSETIA (PROcédés de SEparation et de Transformation en Industrie Alimentaire)*, Villeneuve d'ascq, INRA.
- Decloux M., **Mersad A.** et Tatoud L. (1999). Importance du diamètre hydraulique sur l'évaluation de la contrainte à la paroi. *Séminaire GPSM : Hydrodynamique et microfiltration-ultrafiltration*, Grignon, France, INRA.
- Decloux M., Tatoud L. et **Mersad A.** (1999). Impurities removal from raw cane sugar remelts by crossflow filtration. *Sugar Industry technologist annual meeting (SIT99)*., Estoril, Portugal.
- Decloux M., Tatoud L. et **Mersad A.** (1999). Rétention des impuretés de refontes de sucre roux de canne par filtration tangentielle. *Elimination des impuretés et qualité du sucre blanc*, 6ème symposium international AVH, Reims, A.V.H.
- Mersad A.**, Lewandowski R. et Decloux M. (2000). Colorants in cane sugar industry : bibliographic synthesis on their formation, spectrophotometris analyses of synthetised caramels. *Sugar Industry technologist annual meeting (SIT2000)*., New Orleans, USA, 13-15 May.

RAPPORTS :

- Mersad A.** (1998). Etude de l'influence du diamètre des canaux et des pores, ainsi que de la contrainte pariétale, sur le colmatage des membranes céramiques en filtration tangentielle de levures (système UTP), ENSIA (resp M.DECLOUX).
- Mersad A.** (1998). Etude des pertes de charge par frottement des membranes TAMI, ENSIA (resp M.DECLOUX).

SOMMAIRE GENERAL

| | |
|--|------------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I : LES COLORANTS EN SUCRERIE ET LEUR RETENTION PAR FILTRATION TANGENTIELLE | 3 |
| 1. Nature, origine et réactions de formation des colorants | 3 |
| 2. Lien entre la formation des colorants et les étapes industrielles d'extraction et de purification du saccharose..... | 11 |
| 3. Incidence des colorants sur la cristallisation et leur rétention par filtration tangentielle | 21 |
| 4. Conclusion | 27 |
| CHAPITRE II : RECONSTITUTION DES COLORANTS DE FABRICATION AU LABORATOIRE SUIVI DE LEUR FORMATION ET ANALYSES SPECTROMETRIQUES..... | 29 |
| 1. Reconstitution des colorants de fabrication au laboratoire..... | 29 |
| 2. Suivi de la formation des colorants de fabrication..... | 34 |
| 3. Caractérisation des colorants de fabrication par spectrométrie..... | 37 |
| 4. Conclusion | 48 |
| CHAPITRE III :MISE AU POINT DE LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE ET ANALYSE DES MASSES MOLAIRES DES COLORANTS DE FABRICATION | 50 |
| 1. La chromatographie d'exclusion stérique et son utilisation pour l'analyse des colorants de sucrerie | 51 |
| 2. Mise en place de la C.E.S. à l'ENSIA | 55 |
| 3. Mise en évidence de phénomènes d'interactions et recherche de solutions..... | 68 |
| 4. Analyse des colorants et du sucre roux par C.E.S..... | 92 |
| 5. Conclusion | 101 |
| CHAPITRE IV : UTILISATION DE LA C.E.S. POUR CARACTERISER L'EFFICACITE DE LA RETENTION DES COLORANTS DE SUCRERIE PAR FILTRATION TANGENTIELLE | 104 |
| 1. La filtration tangentielle..... | 104 |
| 2. Filtration des colorants et d'une refonte de sucre roux à l'échelle du laboratoire | 108 |
| 3. Filtration à l'échelle du pilote | 115 |
| 4. Conclusion | 123 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 125 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 131 |

INTRODUCTION

L'extraction et la purification du saccharose à partir de la canne et de la betterave à sucre nécessitent une multitude d'opérations unitaires en amont de la cristallisation. Ces opérations sont destinées à éliminer le maximum d'impuretés afin que l'étape de cristallisation soit la plus efficace possible. D'après la bibliographie, il s'avère que les impuretés les plus gênantes sont les colorants et les polysaccharides. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude des colorants, mais il faut rester conscient qu'il peut y avoir des liens entre ces deux impuretés et que les polysaccharides ont un rôle aussi important.

Selon les résultats de plusieurs chercheurs (Shore *et al.*, 1984 ; Godshall *et al.*, 1987 ; Bento et Sa 1998), plus la masse molaire des colorants est importante, plus ces derniers entravent la cristallisation par occlusion dans le cristal. L'idée d'éliminer ces colorants par filtration tangentielle paraît donc intéressante. Or, actuellement, la rétention des composés en filtration tangentielle des solutions sucrées n'est pas assez caractérisée. Sachant que ces composés sont des colorants, la méthode de caractérisation la plus adaptée est la spectrométrie dans l'UV et le visible. La chromatographie d'exclusion stérique paraît également intéressante pour déterminer leurs masses molaires.

La première partie de ce travail est consacrée à l'étude bibliographique dans laquelle la nature, l'origine et les réactions de formation des colorants sont présentées. Nous décrivons également les étapes de sucrerie propices à la formation de chaque colorant. Enfin, les travaux antérieurs concernant l'incidence de ces impuretés sur la cristallisation ainsi que leur rétention par filtration tangentielle sont décrits. A l'issue de cette synthèse bibliographique, nous avons choisi de reconstituer les colorants de fabrication les plus gênants (mélanoïdines, caramels et PDAH) et d'analyser leurs caractéristiques spectrométriques, leurs masses molaires ainsi que leur rétention par filtration tangentielle d'une part et de comparer ces résultats avec ceux obtenus avec une refonte de sucre roux de canne d'autre part.

Le choix et la mise en œuvre du réacteur sont présentés au chapitre II. Les caractéristiques spectrométriques des colorants modèles formés sont ensuite analysées et traitées de manière statistique, afin de proposer un mode de distinction entre les différents types.

Pour évaluer les masses molaires des colorants de fabrication modèles formés, nous avons choisi de mettre au point la technique de chromatographie d'exclusion stérique à l'Ecole Nationale des Industries Alimentaires (ENSI) de Massy. Les étapes de mise au point sont présentées dans le chapitre III ainsi que les différentes difficultés rencontrées et les solutions proposées. Les mesures de masses molaires des colorants de fabrication préparés et de la refonte de sucre roux sont étudiées à la fin de celui-ci.

Enfin, dans la dernière partie de ce travail, la chromatographie d'exclusion stérique est utilisée afin de caractériser la rétention des colorants et des impuretés du sucre roux par différentes membranes d'ultrafiltration à l'échelle du laboratoire et à l'échelle du pilote.

La conclusion générale reprend l'ensemble des résultats obtenus et propose des voies de poursuite du travail.

Chapitre I

LES COLORANTS EN SUCRERIE ET LEUR RETENTION PAR FILTRATION TANGENTIELLE

| | |
|---|-----------|
| 1. NATURE, ORIGINE ET RÉACTIONS DE FORMATION DES COLORANTS | 3 |
| 1.1 Colorants naturels | 3 |
| 1.2 Colorants de fabrication..... | 4 |
| 1.2.1 Les mélanines | 4 |
| 1.2.1.1 Définition et réactions de formation des mélanines | 4 |
| 1.2.1.2 Les précurseurs de mélanines dans les plantes sucrières | 5 |
| 1.2.2 Les mélanoïdines (produits de la réaction de Maillard) | 5 |
| 1.2.2.1 Définition et réactions de formation des mélanoïdines | 5 |
| 1.2.2.2 Les précurseurs de mélanoïdines dans les plantes sucrières | 7 |
| 1.2.3 Les caramels..... | 8 |
| 1.2.3.1 Définition et réactions de formation des caramels..... | 8 |
| 1.2.3.2 Les précurseurs de caramels dans les plantes sucrières | 9 |
| 1.2.4 Les produits de dégradation alcaline des hexoses (PDAH) | 9 |
| 1.2.4.1 Définition et réactions de formation des PDAH..... | 9 |
| 1.2.4.2 Les précurseurs de PDAH dans les plantes sucrières | 10 |
| 1.3 Conclusion..... | 10 |
| 2. LIEN ENTRE LA FORMATION DES COLORANTS ET LES ÉTAPES INDUSTRIELLES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DU SACCHAROSE | 11 |
| 2.1 Etapes industrielles d'extraction et de purification du saccharose..... | 11 |
| 2.1.1 La betterave..... | 11 |
| 2.1.2 La canne | 15 |
| 2.1.2.1 Sucrierie de canne | 15 |
| 2.1.2.2 Raffinerie de canne | 17 |
| 2.2 Formation des colorants durant les étapes d'extraction et de purification du saccharose | 18 |
| 2.3 Conclusion..... | 21 |
| 3. INCIDENCE DES COLORANTS SUR LA CRISTALLISATION ET LEUR RÉTENTION PAR FILTRATION TANGENTIELLE..... | 21 |
| 3.1 Les colorants et la cristallisation du sucre | 22 |
| 3.2 Rétention des colorants de sucrierie par filtration tangentielle | 24 |
| 4. CONCLUSION | 27 |

Tableau I.1 : Colorants naturels issus essentiellement de la canne à sucre

| Colorants | | Nature |
|---------------|---|--|
| Chlorophylles | Type a : $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg^{(3)}$ Type b : $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg^{(3)}$ | - colorants de couleur verte des végétaux photosynthétiques ⁽³⁾ . |
| Carotènes | $C_{40}H_{56}^{(3)}$ | - colorants caroténoïdes de couleur jaune : ce sont de longues chaînes non ramifiées constituées d'une série de doubles liaisons ⁽²⁾ . |
| Xanthophylles | $C_{40}H_{56}O_2^{(3)}$ | - colorants caroténoïdes jaunes ⁽³⁾ . |
| Flavonoïdes | Structure générale $C_6-C_3-C_6^{(1)}$ | - renferment dans leur structure une ou plusieurs fonctions phénol - leurs deux structures C_6 représentent les noyaux aromatiques A et B, communs aux différents flavonoïdes tandis que la structure intermédiaire en C_3 diffère selon le type de flavonoïde ⁽¹⁾ . |
| |  | - généralement sous forme d'hétérosides (liés à 1 ou plusieurs molécules de sucres) ⁽¹⁾ . |
| | Types répandus en canne : | |
| | * Flavones | - colorants acides faibles jamais sous forme cationique, ils absorbent plus sous forme anionique que sous forme neutre ⁽¹⁾ . |
| | * Flavonols | - colorants très répandus dans la nature, dérivant des flavones ⁽¹⁾ . |
| | * Chalcones | - colorants assez peu répandus, de couleur jaune qui vire au rouge-orangé en présence d'ammoniaque ⁽¹⁾ . |
| * Catéchines | - colorants existant sous forme de polymères constituant les tanins condensés ⁽¹⁾ . - ils donnent des réactions colorées avec les sels de fer ⁽¹⁾ . - chauffés en milieu acide ils subissent une polymérisation qui les transforme en colorants bruns-jaunes insolubles ⁽¹⁾ . | |
| * Anthocyanes | - ils sont sous forme cationique, se décomposent à $pH \geq 8$, sont rouges à pH acide, virent au bleu et perdent de la couleur avec l'augmentation du pH vers 4 à 6. Ils reprennent cependant leur couleur dès que le milieu s'acidifie ⁽⁴⁾ . - ils forment des complexes colorés avec certains métaux pour devenir stables à pH élevé ⁽²⁾ . | |

(1):(Ribereau-Gayon 1968); (2):(Chichester 1972); (3):(Duval et Duval 1978);

(4):(Smith et Paton 1985).

Les colorants, en sucrerie de canne comme en sucrerie de betterave, posent un réel problème en cristallisation, en particulier lorsque leurs masses molaires sont élevées, car ils se retrouvent dans les cristaux et diminuent ainsi leur pureté. Notre objectif est, dans un premier temps, d'établir un lien entre la formation de ces colorants et les étapes de sucrerie. Nous présentons donc tout d'abord, une synthèse bibliographique sur ces impuretés en précisant leurs origines, leurs natures et leurs réactions de formation. Nous décrivons brièvement par la suite, les étapes industrielles d'extraction et de purification du saccharose à partir de la canne et de la betterave. Nous soulignons particulièrement les conditions physico-chimiques de chaque étape de la sucrerie, en les comparant avec les conditions optimales de formation des colorants, afin de déterminer les étapes de sucrerie propices à la formation de ces impuretés. Enfin, nous nous intéressons aux travaux antérieurs concernant l'incidence de ces impuretés sur la cristallisation ainsi que leur rétention par filtration tangentielle.

1. NATURE, ORIGINE ET REACTIONS DE FORMATION DES COLORANTS

Les colorants de sucrerie sont classés selon leur origine en deux grandes familles : les colorants naturels provenant directement des plantes sucrières et les colorants de fabrication, formés lors de l'extraction et de la purification du saccharose.

1.1 COLORANTS NATURELS

La canne contient beaucoup plus de colorants naturels que la betterave. Ces colorants se retrouvent dans les jus après découpage et broyage. Nous avons regroupé dans le **tableau I.1** les plus répandus d'entre eux, c'est-à-dire les chlorophylles, les carotènes, les xanthophylles et les flavonoïdes. Nous avons également mentionné certaines de leurs propriétés. D'après Smith et Paton (1985), parmi ces colorants naturels, ce sont les flavonoïdes qui contribuent le plus à la coloration du sucre roux. Ces derniers ont la particularité d'être sensibles au pH (Smith et Paton 1985). En effet, en milieu acide (pH 4), ils présentent une faible intensité de

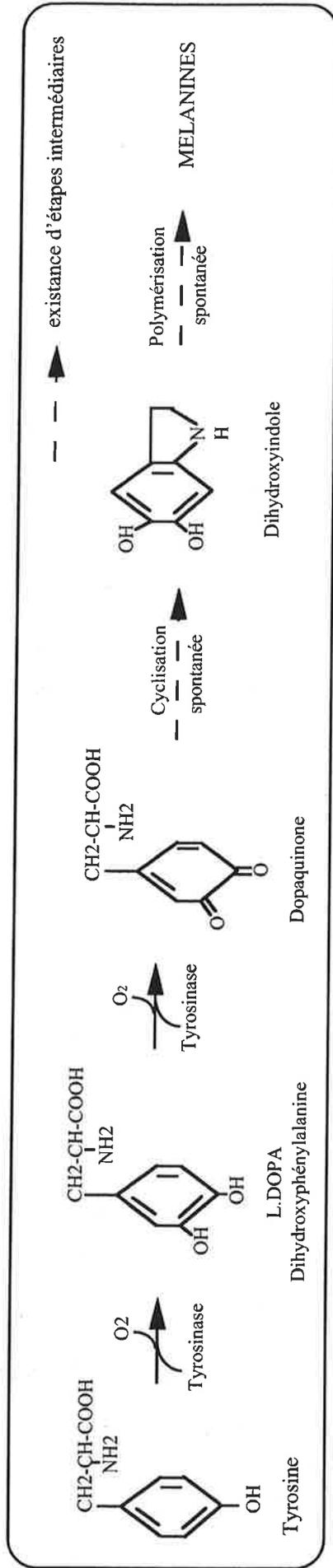


Figure I.1 : Formation des mélanines (Chichester 1972)

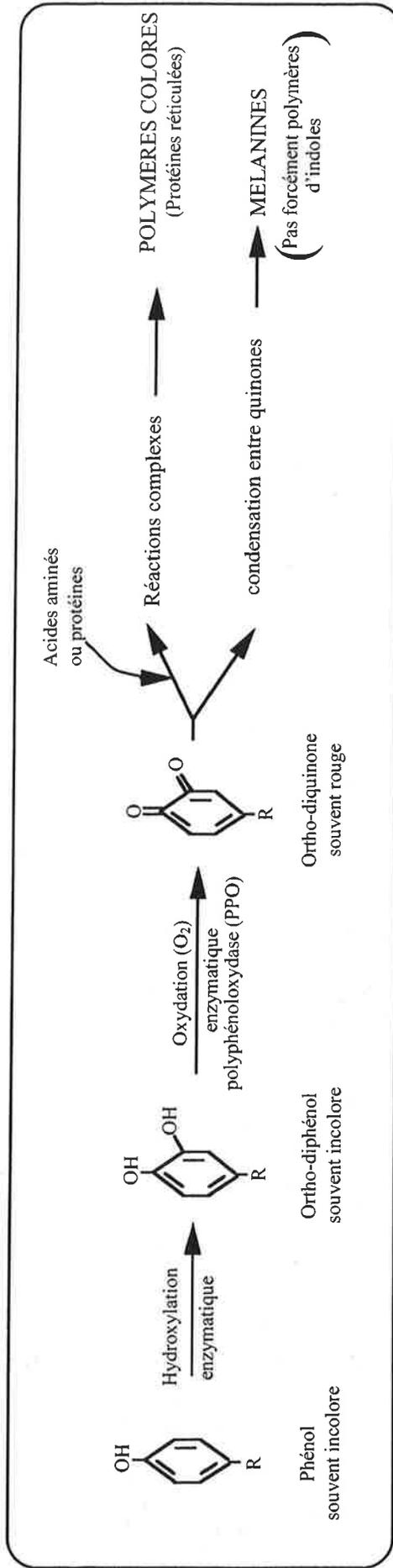


Figure I.2 : Formation de polymères colorés par oxydation enzymatique des phénols

(d'après Cheftel 1980, Chichester 1972 et Catherine 1999)

coloration tandis qu'en milieu basique (pH 9) cette intensité est importante. Paton (1992) et Paton et Duong (1992) ont bien mis en évidence la présence des flavonoïdes dans la canne. Ils ont pour cela réalisé une analyse par chromatographie liquide de haute performance d'extraits de canne puis ont mesuré la coloration globale de ces extraits à différents pH (notamment à pH 4 et 9).

1.2 COLORANTS DE FABRICATION

On appelle colorants de fabrication, les colorants qui se forment au cours des procédés d'extraction et de purification du saccharose. Leur formation peut se poursuivre même lorsque le saccharose est sous forme cristalline, stocké dans des silos (Shore *et al.*, 1984). Ces colorants sont les produits de nombreuses réactions entre des molécules précurseurs présentes initialement dans les plantes sucrières. Les réactions entre ces précurseurs dépendent des conditions physico-chimiques du milieu. Les colorants de fabrication se forment en sucrerie de canne comme en sucrerie de betterave. Ils sont classés selon leurs mécanismes de formation en quatre groupes : les mélanines, les mélanoïdines, les caramels et les produits de dégradation alcaline des hexoses (PDAH).

1.2.1 LES MELANINES

1.2.1.1 Définition et réactions de formation des mélanines

Les mélanines sont par définition des polymères d'indoles, colorants brun noir constituant la peau des animaux. Ils sont formés en plusieurs étapes par oxydation enzymatique de la tyrosine (acide aminé phénolique) comme présenté en **figure I.1** (Chichester 1972). Il se trouve que chez les végétaux, les mêmes polymères sont rencontrés. Ces derniers sont formés à partir d'autres composés phénoliques en plus de la tyrosine. Le nom de mélanine a donc été élargi à tout colorant, polymère d'indole, formé par oxydation enzymatique (ou brunissement enzymatique) des composés phénoliques (**figure I.2**) (Chichester 1972). Ce brunissement enzymatique est catalysé par des polyphénoloxydase (PPO), terme générique regroupant

plusieurs activités enzymatiques. L'oxydation enzymatique des phénols peut engendrer d'autres composés en plus des mélanines (**figure I.2**). Les quinones (souvent rouges) peuvent, en effet, se lier à des acides aminés ou à des protéines réticulées, pour former des polymères colorés (Cheftel et Cheftel 1980 ; Catherine 1999). Elles se condensent également entre elles pour former des colorants qui ne sont pas forcément des polymères d'indoles mais qui sont également considérés comme mélanines.

1.2.1.2 Les précurseurs de mélanines dans les plantes sucrières

La canne est beaucoup plus riche en composés phénoliques que la betterave. On y trouve des flavonoïdes, des phénols neutres (esters d'un acide phénolique et d'un sucre) et des acides phénoliques (acide chlorogénique en majorité). La betterave n'est concernée que par les acides phénoliques (généralement des acides aminés cycliques tels que la tyrosine, la phénylalanine et la dihydroxyphényl L alanine) (Mc Ginnis 1982 ; Paton 1992). Ce sont les composés phénoliques possédant un groupement ortho-diphénol (exemple : l'acide chlorogénique) qui sont les meilleurs précurseurs des mélanines (Paton 1992).

1.2.2 LES MELANOÏDINES (PRODUITS DE LA REACTION DE MAILLARD)

1.2.2.1 Définition et réactions de formation des mélanoïdines

Les mélanoïdines sont des colorants issus de la condensation entre un composé à fonction carbonyle et une amine. Cette condensation est suivie de différentes réactions pour finalement aboutir à des polymères colorés et à des composés volatils odorants (Cheftel et Cheftel 1980). Les réactions de formation des mélanoïdines ont été mises en évidence pour la première fois par Louis-Camille Maillard d'où leur nom de réactions de Maillard. En prenant comme exemple les réactions de Maillard entre un aldose ou cétose et un composé aminé, on

distingue deux phases principales (Hodge 1953 ; Cheftel et Cheftel 1980 ; Moll 1993) (**figure I.3**) :

Phase I : Induction

C'est la condensation de Maillard proprement dite entre l'aldose et l'acide aminé. Elle est suivie du réarrangement d'Amadori, qui aboutit aux cétosamines incolores. Si la condensation se fait entre un cétose et un acide aminé, on a un réarrangement de Heyns puis une aldosamine.

Phase II : Formation de polymères bruns

Les cétosamines produites en phase d'induction subissent différentes transformations pour donner des composés volatils et odorants de faible masse molaire et des polymères colorés de haute masse molaire. Les cétosamines peuvent réagir de trois manières différentes :

Voie A

C'est la voie principale de décomposition des cétosamines. Elle conduit à la formation du 5-hydroxyméthyl-furfural (HMF) incolore. Ce dernier donne par polymérisation des mélanoïdines. Il peut également se lier à des composés aminés pour former des aldimines qui donnent des mélanoïdines par polymérisation (**figure I.3**).

Voie B

C'est une voie complexe qui nécessite différentes réactions de scissions, d'énolisations, d'isomérisations et autres. Elle conduit non seulement à la formation de mélanoïdines mais également à la formation de composés odorants et volatils (**figure I.3**).

Voie C

Cette voie est connue sous le nom de dégradation de Strecker. Ce sont en réalité des réactions de dégradation d'acides aminés par des composés carbonylés (provenant en majorité d'une dégradation des cétosamines). Ces réactions génèrent des composés

odorants (pyrazine), ainsi que des aldéhydes qui se recondensent avec des acides aminés pour de nouvelles réactions de Maillard (**figure I.3**).

1.2.2.2 Les précurseurs de mélanoidines dans les plantes sucrières

D'après Cheftel et Cheftel (1980), pour que les réactions de Maillard aient lieu, il faut que soient présents simultanément :

- un composé à fonction carbonyle tel que, les sucres réducteurs, les vitamines, les quinones et autres.
- un composé aminé tel que, les acides aminés, les protéines, les peptides, les amides et même les mélanoidines car ils contiennent en moyenne 5% d'azote.

Les composés carbonylés majoritaires de la canne et de la betterave sont les sucres réducteurs et plus particulièrement le glucose et le fructose. Ils y sont présents naturellement et proviennent de l'hydrolyse du saccharose, ainsi que de l'hydrolyse de la cellulose et de l'amidon. D'autres composés carbonylés tels que, les vitamines et les quinones sont également présents dans la canne et la betterave et participent aux réactions de Maillard.

Parmi les composés aminés les plus importants, du point de vue quantité, on trouve :

* Dans la betterave (Mc Ginnis 1982) :

Les acides aminés : acide glutamique, acide aspartique, isoleucine, alanine, leucine, valine, dihydroxyphényl L alanine (L-DOPA), etc...

Les amides : glutamine et asparagine.

Les bases aminées : bétaïne et choline.

Les purines : adénine, guanine, xanthine et hypoxanthine.

Les pyrimidines : uracile, cytosine, cytidine et thymidine.

* Dans la canne (Chen 1985) :

Les acides aminés : glycine, acide aspartique, acide glutamique, alanine, valine, acide amino-butérique, thréonine, isoleucine....etc.

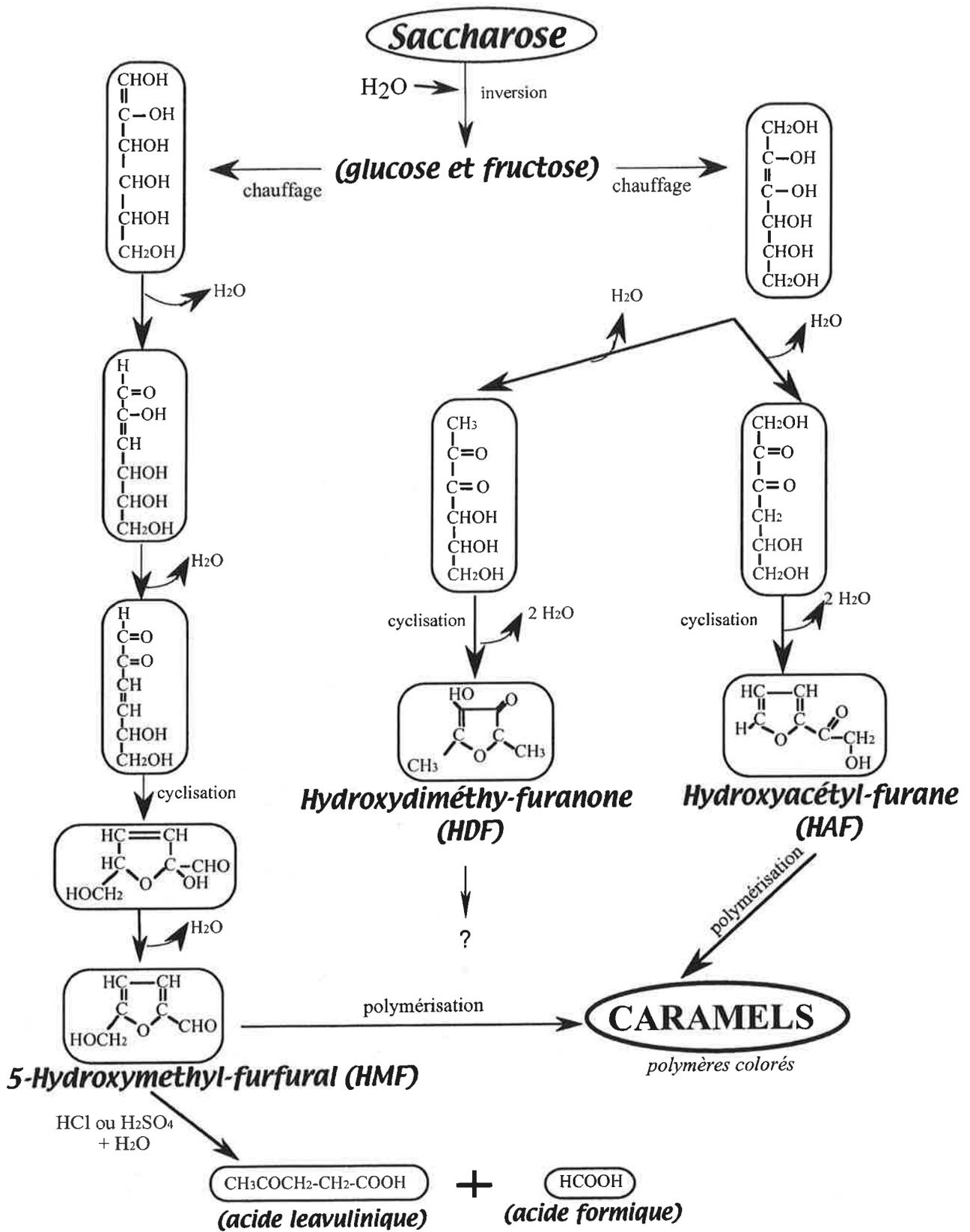


Figure I.4 : Réactions de caramélisation
(d'après Kelly et Brown 1978, Kroh 1994)

Les amides : glutamine et asparagine.

Les sucres réducteurs (aldéhydes et cétones), ainsi que les quinones, font partie des composés carbonylés les plus réactifs. Le saccharose ne réagit pas avec les amines car il ne possède pas de fonction carbonyle (Chichester 1972 ; Cheftel et Cheftel 1980). Les quinones dégradent également les acides aminés (dégradation de Strecker) avec dégagement de CO₂ et d'ammoniaque. Ils forment des aldéhydes odorants et des orthodiphénols précurseurs de mélanines. D'après Ahari et Genotelle (1961), les réactions des différents acides aminés avec le même composé carbonylé engendrent des mélanoïdines de nature et d'intensité de coloration différentes.

1.2.3 LES CARAMELS

1.2.3.1 Définition et réactions de formation des caramels

Les caramels ont été longuement étudiés en industrie alimentaire. Ils sont utilisés comme additifs et leur composition varie beaucoup en fonction des conditions de préparation et des catalyseurs utilisés (Greenshields et Mac Gillivray 1972 ; Dufresnoy 1978 ; Cottier *et al.*, 1989). On retrouve même, sous le nom de caramel, des produits de la réaction de Maillard « Caramel ammoniacal classe III » (Thornton 1990). En sucrerie, on s'intéresse surtout au caramel produit uniquement par dégradation thermique du saccharose sans catalyse. Celui-ci est constitué en majorité de polymères du 5 hydroxyméthyl-furfural (HMF) (Greenshields et Mac Gillivray 1972 ; Dufresnoy 1978 ; Kelly et Brown 1978). En effet, Cottier *et al.*, (1989) ont trouvé 70 à 90 % d'HMF dans des vapeurs de caramels, produites par chauffage du saccharose ou du glucose à 180°C. D'après Kroh (1994) et Kelly et Brown (1978), **(figure I.4)**, le saccharose s'hydrolyse en invertis (glucose et fructose). Ces invertis subissent sous l'action de la chaleur, une série de réactions de déshydratation et une cyclisation, pour former le 5 hydroxyméthyl-furfural (HMF), l'hydroxyacétyl-furane (HAF) et l'hydroxydiméthyl-furanone (HDF). Il se forme aussi d'autres composés aromatiques en

moindres quantités comme les carbocycliques et les pyrones. Selon Kroh (1994), les présumés précurseurs des polymères colorés en caramélisation sont l'HMF et l'HAF. Ceci rejoint Kelly et Brown (1978) qui décrivent l'HMF comme précurseur de coloration. Ce dernier est incolore et a un maximum d'absorbance dans l'UV à 285 nm (Ahari et Genotelle 1961 ; Kelly et Brown 1978). En solution aqueuse acide, l'HMF est instable et se décompose en acides organiques par ouverture du cycle furanique et scission de la molécule. Ses principaux produits de décomposition sont alors l'acide formique et l'acide levulinique, qui confèrent à la solution de caramel un caractère acide (Kelly et Brown 1978). En dehors des colorants et des acides organiques cités ci-dessus, différents autres composés ont été identifiés dans les produits de caramélisation. En effet, divers dérivés du furfurool sont mentionnés par Ahari et Genotelle (1961) et Nigay (1993), des substances volatiles comme les aldéhydes par Ahari et Genotelle (1961) et Pieck (1963) et également du CO₂ (Ahari et Genotelle 1961).

1.2.3.2 Les précurseurs de caramels dans les plantes sucrières

Les précurseurs des caramels sont par définition les sucres invertis. Ils sont présents naturellement dans la canne et la betterave (Mc Ginnis 1982 ; Chen et Chou 1993), ou produits par inversion du saccharose (Kelly et Brown 1978). Les jus de canne contiennent en moyenne une quantité égale de glucose et de fructose (2 à 4 g/100 g de matière sèche chacun) (Chen et Chou 1993), alors que les jus de betteraves contiennent 0,5 à 1,5 g d'invertis par 100 g de saccharose (De Bruijn *et al.*, 1986). Il est important de signaler que ces invertis ne se caramélisent pas de la même manière. En effet, le fructose se dégrade beaucoup plus vite que le glucose pour former l'HMF (Kelly et Brown 1978).

1.2.4 LES PRODUITS DE DEGRADATION ALCALINE DES HEXOSES (PDAH)

1.2.4.1 Définition et réactions de formation des PDAH

Les PDAH sont des colorants connus surtout en sucrerie et produits par dégradation des holosides (hexoses, pentoses, tétroses ou trioses) en milieu alcalin. Ils ne sont pas formés

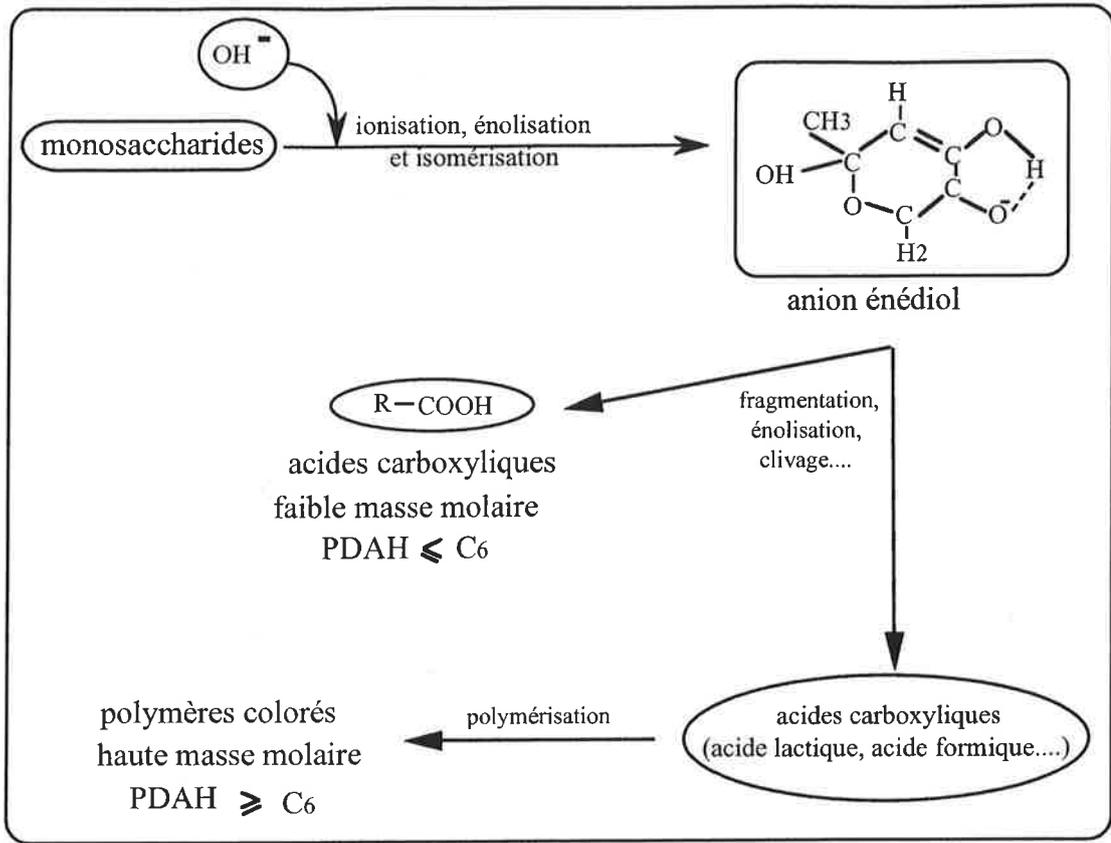


Figure I.5 : Dégradation alcaline des monosaccharides
(d'après de Bruijn et al. 1986)

uniquement par dégradation des hexoses comme leur nom l'indique. Cette appellation vient du fait qu'en sucrerie, les holosides majoritaires sont des hexoses (glucose et fructose). Les holosides subissent une série de réactions d'ionisation, d'énolisation et d'isomérisation qui aboutissent à la formation de l'anion énédiol intermédiaire (**figure I.5**) (de Bruijn *et al.*, 1986). Cet anion subit à son tour une suite de réactions complexes pour former différents types d'acides carboxyliques (acide lactique majoritaire, acides saccharinique, formique, acétique, oxalique et autres) (Pieck 1963 ; Kelly et Brown 1978). Une partie de ces acides carboxyliques formés est incolore et de faible masse molaire (chaînes carbonées n'excédant pas les six carbones). On les désigne par PDAH \leq C6. Les autres se polymérisent et forment des chaînes poly-carboxyliques de haute masse molaire. On les désigne par PDAH $>$ C6. Ces derniers étant insaturés, ils sont à l'origine de la coloration jaune brunâtre (De Bruijn *et al.*, 1986).

1.2.4.2 Les précurseurs de PDAH dans les plantes sucrières

Les holosides (précurseurs des PDAH) sont présents naturellement dans la canne et la betterave ou formés par hydrolyse des polysaccharides (amidon, cellulose), des triholosides (raffinose) et des diholosides (saccharose en majorité) (Mc Ginnis 1982 ; Chen et Chou 1993). On trouve donc les invertis (glucose et fructose) en majorité, mais aussi du galactose (hexose) et de l'arabinose (pentose).

1.3 CONCLUSION

Il se dégage de ces définitions, que les colorants de fabrication ont souvent les mêmes précurseurs, ce qui implique qu'ils peuvent se former simultanément avec des possibilités de concurrences. Les produits formés sont nombreux, pas assez connus et dépendent beaucoup des précurseurs également nombreux. De plus, les produits intermédiaires formés sont dans certains cas communs (HMF pour les caramels et les mélanoidines par exemple). Nous allons

maintenant étudier les liens entre la formation de ces différents colorants et les étapes industrielles d'extraction et de purification du saccharose.

2. LIEN ENTRE LA FORMATION DES COLORANTS ET LES ETAPES INDUSTRIELLES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DU SACCHAROSE

Notre objectif ici est mettre en évidence, à quel moment en sucrerie de canne ou de betterave, les précurseurs ont le plus de chance de réagir pour former les colorants. Pour cela, nous décrivons dans un premier temps les procédés industriels classiques d'extraction du saccharose à partir de la canne et de la betterave, en soulignant particulièrement les conditions physico-chimiques de chaque étape. Ensuite, nous réunissons les conditions physico-chimiques favorables à la formation de chaque colorant tout en repérant l'étape de sucrerie où il a le plus de chance de se former.

2.1 ETAPES INDUSTRIELLES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DU SACCHAROSE

Que ce soit pour la canne ou pour la betterave, l'extraction et la purification du saccharose passent par plusieurs étapes industrielles visant toutes à éliminer les impuretés. Les conditions physico-chimiques ne sont pas les mêmes en canne et en betterave, d'où notre choix de les présenter de manière séparée.

2.1.1 LA BETTERAVE

L'extraction du sucre de betterave nécessite un nettoyage des betteraves puis un découpage en cossettes, une extraction par diffusion, une épuration calco-carbonique, une concentration par évaporation multiple effet et une cristallisation (**figure I.6**). Une description brève de chacune de ces étapes est développée ci-dessous (Mc Ginnis 1982 ; Cedus 1998).

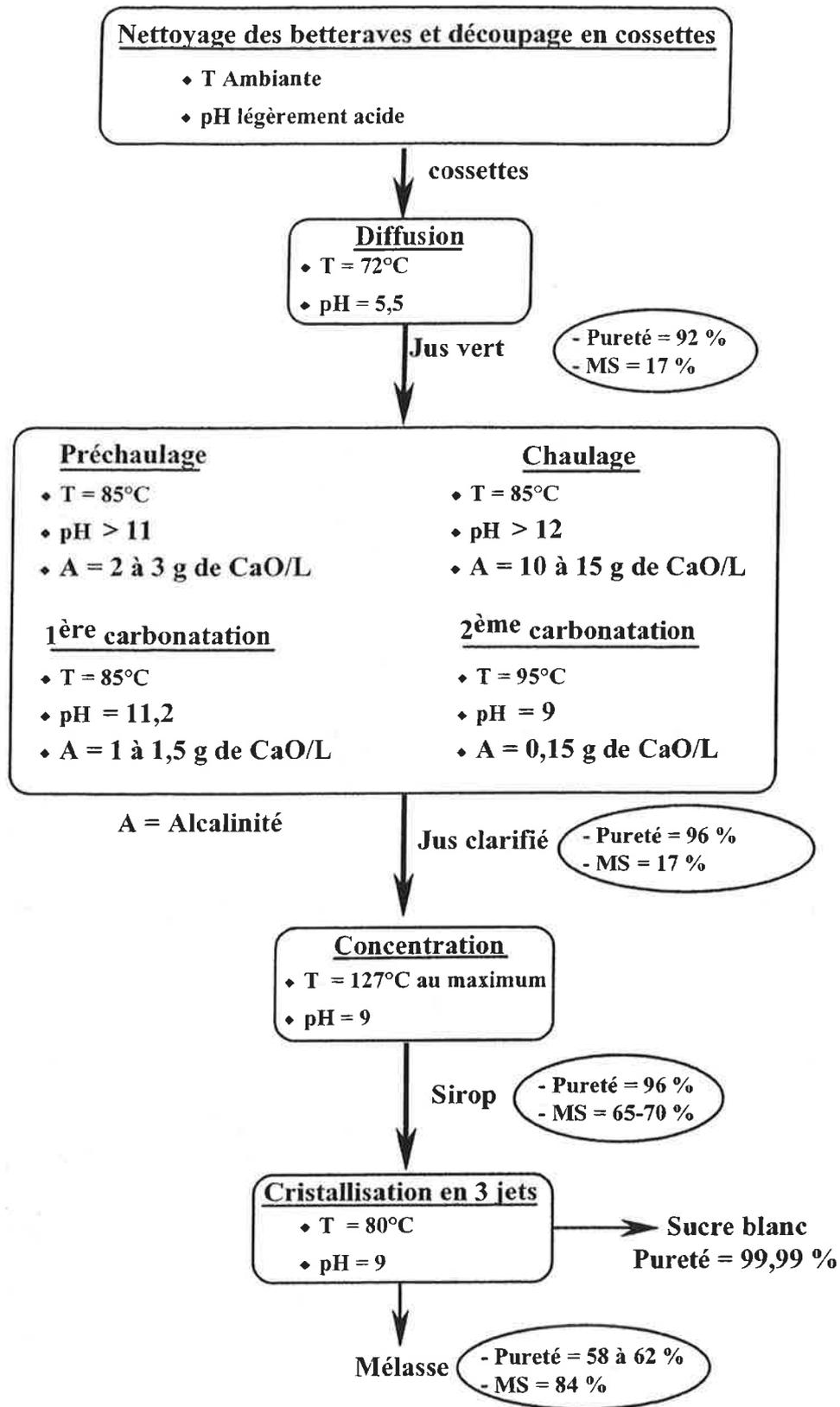


Figure I.6 : Extraction et purification industrielles du sucre de betteraves
(d'après Mc Ginnis 1982, Cedus 1998)

Nettoyage des betteraves et découpage en cossettes

L'élimination de la terre, des pierres et des herbes, des betteraves se fait en les frottant les unes contre les autres tout en pulvérisant de fins jets d'eau sous pression. Un arbre portant des bras métalliques brasse les betteraves et les fait progresser dans des bassins demi cylindriques ou rectangulaires, en sens inverse du courant d'eau propre. Les betteraves sont acheminées vers un coupe-racine où elles sont découpées en fines lanières assez rigides appelées cossettes. Ce découpage a pour but d'augmenter la surface de contact entre cellules de betteraves et jus de diffusion ce qui favorise les échanges de chaleur et de matière. De plus, il permet d'obtenir une faible épaisseur pour réduire le temps de diffusion du sucre vers le jus.

Diffusion

Au niveau des betteraves, le saccharose est contenu dans les vacuoles constituant les réserves énergétiques de la plante. Ces vacuoles sont incluses dans les cellules de betterave, elles-mêmes délimitées par une membrane plasmique qui est accolée à une paroi plus rigide. Or la membrane plasmique est imperméable au saccharose. L'opération d'échaudage, par un chauffage à cœur à plus de 72°C, détruit cette barrière et permet ainsi la diffusion du saccharose et le développement microbien. L'opération est réalisée à contre courant afin de maintenir une importante différence de concentration en sucre entre le jus et les cossettes, et améliorer ainsi le rendement. Pour éviter l'hydrolyse des pectines de la paroi, l'eau de diffusion est tamponnée (par apport de CaCO_3) et acidifiée à pH 5,5. On obtient alors, en sortie de diffusion, un jus de betterave légèrement acide (alcalinité de -1,35 g de CaO/L, pH 5,5), appelé jus vert. Celui-ci est à environ 17 g de matière sèche pour 100 g de solution avec une pureté (pourcentage de saccharose par rapport à la matière sèche) de 88 à 90 %.

Épuration calco-carbonique

L'épuration du jus de diffusion comprend plusieurs phases :

Préchauffage et chaulage : La chaux précipite une partie des impuretés en formant avec celles-ci des sels de chaux insolubles dans l'eau. L'ajout de chaux se fait en deux temps. Dans un premier temps, le jus est chauffé à 85°C puis préchauffé. Cette opération consiste à ajouter de la chaux pour précipiter les impuretés. Le jus traverse le préchauffeur en 20 min avec augmentation graduelle de l'alcalinité jusqu'à 2 à 3 g de CaO/L, ce qui correspond à des pH supérieurs à 11. Le jus est ensuite chaulé massivement. L'alcalinité passe alors à 10-15 g de CaO/L, augmentant le pH au-delà de 12. Le but du chaulage massif est de dégrader les invertis et de précipiter les protéines, les saponines et certains acides organiques du jus. Après un temps de séjour de 30 min dans ces conditions, le jus est envoyé en carbonatation.

Première carbonatation et première filtration : En première carbonatation, on fait barboter dans le jus chaulé du dioxyde de carbone (CO₂). Celui-ci provoque la formation de carbonate de chaux insoluble (précipité granuleux) qui, en se déposant, entraîne une partie des impuretés. Elle permet aussi d'abaisser le pH du jus. Pour éviter la redissolution des impuretés, on laisse au jus une légère alcalinité (1 à 1,5 g de CaO/L et pH 11,2 environ). Le jus carbonaté est ensuite envoyé dans des décanteurs ou filtres afin de séparer le jus clair des précipités.

Deuxième carbonatation et deuxième filtration : Après réchauffage du jus clair à 95°C, le jus subit une deuxième carbonatation qui précipite une bonne partie de la chaux. Elle est suivie d'une deuxième filtration qui aboutit au jus clarifié de 16 g de matière sèche pour 100 g de solution environ. Ce jus a une alcalinité de 0,15 g CaO/L et un pH 9. Suite à l'épuration, sa pureté est d'environ 92 – 94 %.

Concentration

La concentration s'effectue en continu dans un évaporateur à multiples effet. Cet évaporateur fonctionne en série à des températures et pressions décroissantes. En effet, la vapeur produite par l'ébullition du jus de la première caisse d'évaporation est récupérée et envoyée dans la deuxième caisse où elle se condense car l'ébullition dans la calandre s'effectue à une température et une pression moindres. Ainsi, l'évaporation commence à 127°C et se termine dans le dernier effet, sous vide, à des températures de l'ordre de 80°C. Le sirop jaune brun qui sort de la dernière caisse contient de 65 à 70 g de matières sèche par 100 g de solution. Sa pureté ne change pas (92 – 94 %).

Cristallisation

L'étape de cristallisation est l'étape la plus importante et la plus efficace en sucrerie puisque c'est à ce moment là que se fait la purification du saccharose présent dans un sirop brun. Le sirop est envoyé vers d'énormes chaudières, appelée cuites, où la concentration et la cristallisation se font sous un vide partiel, à la température de 80°C et à un pH légèrement alcalin. Pour réaliser la cristallisation du sucre, on amène celui-ci au-delà de sa limite de solubilité (condition de sursaturation), puis onensemence avec de fins cristaux qui grossissent uniformément. Pour contrôler la granulométrie des cristaux, il est important en cristallisation de rester dans la zone métastable qui est délimitée par les zones de sous saturation (dissolution des cristaux) et intermédiaire (nucléation secondaire : formation spontanée en faible quantité de cristaux). On vérifie que la zone métastable est maintenue en contrôlant la variation du taux de matière sèche.

Il est impossible de cristalliser en une seule étape plus de 55 % de saccharose, c'est pourquoi, l'opération se déroule en plusieurs jets (généralement 3 jets). La masse cuite (les cristaux formés + « l'eau mère » qui les entoure) du premier jet est introduite dans uneessoreuse centrifuge tournant à grande vitesse. Le sucre blanc est retenu sur les bords du panier de l'essoreuse, tandis que l'eau mère est chassée hors du panier. Les cristaux de sucre qui restent

à l'intérieur de la turbine forment le sucre de premier jet. Ce sucre est claircé (lavé pour éliminer les impuretés situées à la surface du cristal). Il est très pur (99,99 %) et blanc, destiné directement après séchage et refroidissement à la consommation et aux industries utilisatrices. L'eau mère chassée de la turbine par la force centrifuge contient encore une très forte proportion de sucre. Cette eau mère appelée « égout de premier jet » subit une nouvelle cristallisation, un nouvel essorage et donne le sucre de deuxième jet, plus coloré et moins pur que le sucre de premier jet. Les égouts de deuxième jet, toujours riches en sucre, subissent de nouveau une cristallisation et un essorage, pour donner un sucre de troisième jet, brun et chargé d'impuretés. L'égout qu'il engendre est appelé mélasse. Les sucres de deuxième et troisième jets sont généralement refondus et recyclés dans la fabrication pour être recristallisés. La mélasse stockée à 80 g de matières sèches pour 100 g de solution et de pureté 60 % est destinée majoritairement aux industries de fermentation.

2.1.2 LA CANNE

Contrairement à la sucrerie de betterave qui produit directement du sucre blanc, la fabrication du sucre blanc de canne passe par deux longues chaînes de transformation, en sucrerie, puis en raffinerie. Complémentaire de la sucrerie, la raffinerie achève la purification du sucre roux en sucre blanc. Ces deux chaînes, présentées en **figures I.7.a** et **I.7.b**, sont brièvement décrites ci-dessous (Chen et Chou 1993 ; Cedus 1998 ; Van Der Poel *et al.*, 1998).

2.1.2.1 Sucrerie de canne

La canne subit en sucrerie une extraction du jus, suivie d'une clarification et une concentration de celui-ci, puis, enfin, une cristallisation qui aboutit au sucre roux (**figure I.7 a**).

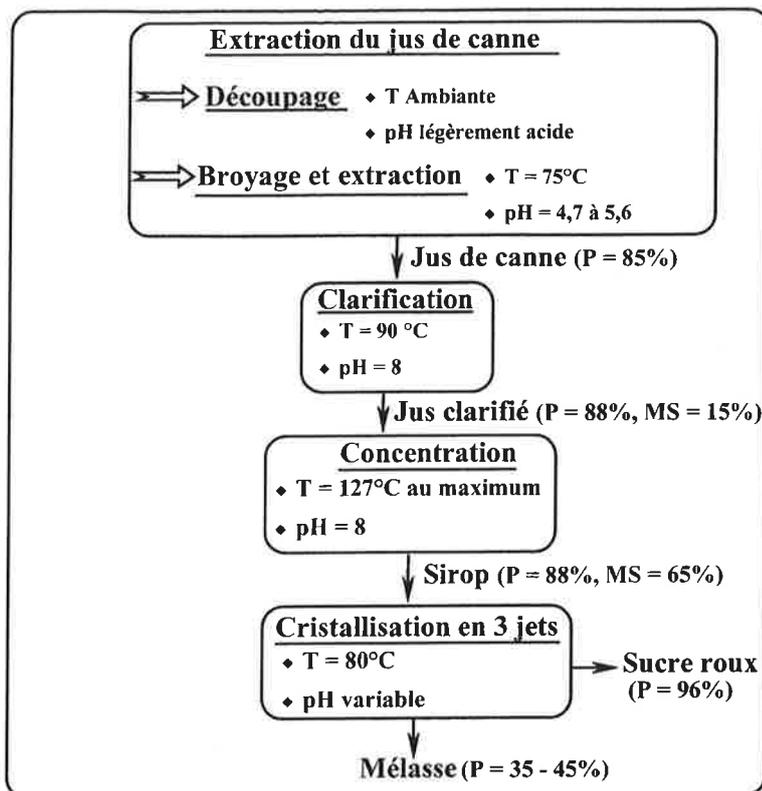


Figure I.7.a : Extraction industrielle du sucre roux de canne
(d'après Chen et Chou 1993, Cedus 1998)

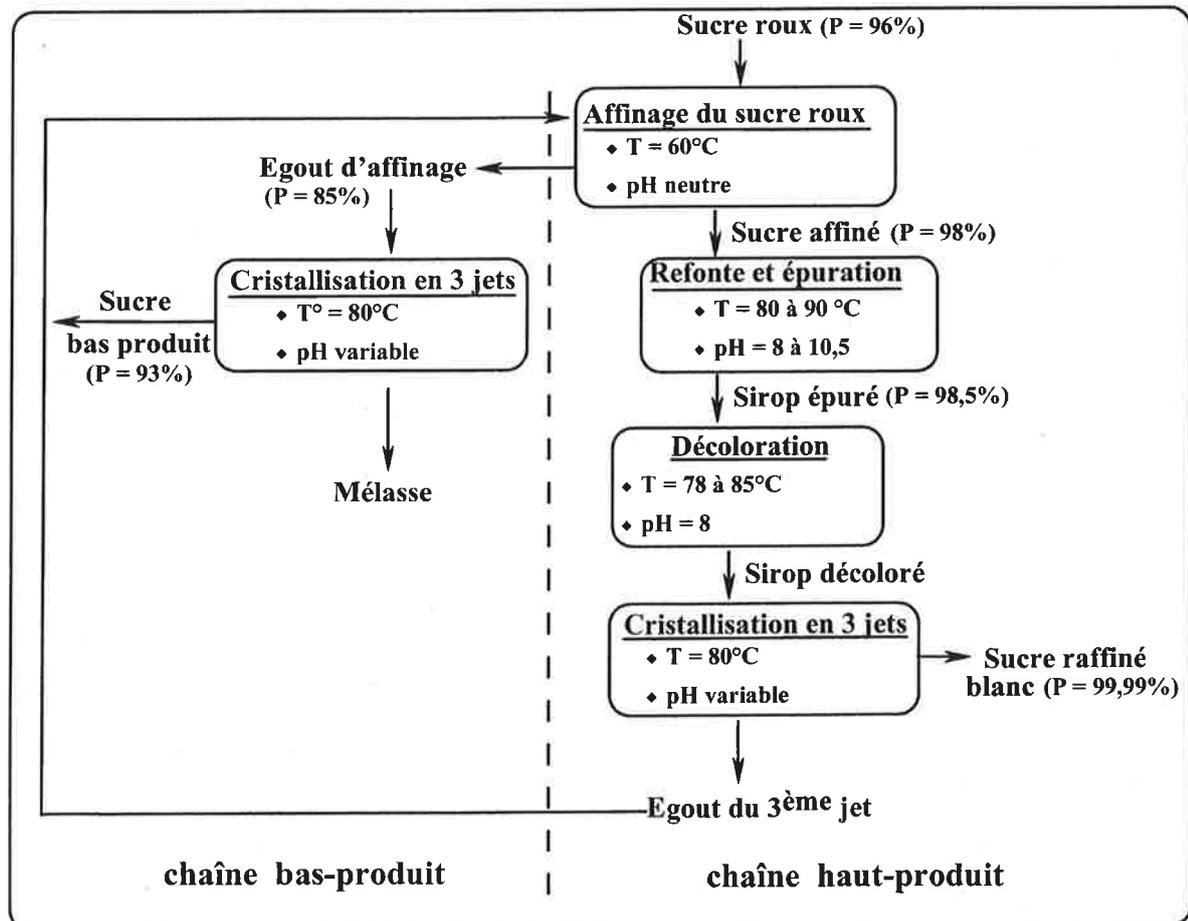


Figure I.7.b : Raffinerie traditionnelle du sucre roux de canne
(d'après Chen et Chou 1993, Cedus 1998)

Extraction du jus de canne

L'extraction du jus de canne constitue la première étape de purification du saccharose. Pour améliorer l'extraction, la canne est coupée en petits morceaux très courts par un « coupe canne », hâchée par un « schredder » (hacheur), et pressée dans une batterie de moulins dans laquelle circule de l'eau chaude (75°C) à contre courant afin de faciliter l'extraction. Le jus extrait des moulins a une couleur allant du jaune verdâtre au brun foncé. Il est naturellement acide (pH entre 4,7 et 5,6), trouble et a une pureté de 85 %. La canne épuisée, appelée bagasse, sert de combustible en chaudière.

Clarification et concentration du jus de canne

Le procédé de clarification en sucrerie de canne a le même but de précipitation des impuretés que dans le cas de la betterave. Cependant, le traitement est moins poussé et les procédés sont variables selon les pays. Les sucreries de cannes sont généralement implantées dans les îles où se trouvent les champs de canne. Or les fours à chaux sont volumineux et le transport de pierre à chaux onéreux. C'est pourquoi, contrairement au cas de la betterave, la quantité de chaux ajoutée au jus de canne est moins importante et se fait en une seule étape. Le pH ne dépasse généralement pas 8. Le chaulage en sucrerie de canne peut être suivi selon les usines par un simple flash, une carbonatation ou une phosphatation. Le jus chaulé est chauffé à 90°C, avant le chaulage ou après celui-ci. L'ensemble du jus est filtré.

Le jus clarifié contenant en moyenne 15 g de matière sèche pour 100 g de solution, avec une pureté de 88 % est dirigé vers un évaporateur qui fonctionne selon le même principe qu'en sucrerie de betterave. Le sirop quitte généralement le dernier effet à 65 g de matière sèche pour 100 g de solution et est envoyé vers l'atelier de cristallisation (Chen et Chou 1993).

Cristallisation

La cristallisation, prolongement de l'évaporation, se fait en trois jets selon le même principe qu'en sucrerie de betterave. Après séchage, les sucres roux (du premier et du second jet de pureté de 96 %) sont envoyés en raffinerie alors que celui du 3^{ème} jet est recyclé après refonte

dans les deux premières cristallisations. La mélasse de faible pureté (35 à 45 %) est destinée le plus souvent à la fermentation et à la distillation pour produire soit du rhum industriel, soit de l'éthanol.

2.1.2.2 Raffinerie de canne

La raffinerie de canne sert à purifier le sucre roux obtenu en sucrerie pour le transformer en sucre blanc. Elle débute par un affinage et une refonte du sucre roux, suivis par une épuration et décoloration de la refonte, puis enfin, une concentration éventuelle et une cristallisation (**figure I.7.b**).

Affinage du sucre roux

L'affinage consiste à laver les cristaux pour éliminer le film d'impuretés adhérent à leur surface. L'opération est effectuée en mélangeant le sucre roux à un sirop légèrement sous-saturé à 75 g de matières sèches pour 100 g de solution et à 60°C. Ce sirop résulte généralement de la dernière cristallisation de la chaîne haut-produit (**figure I.7.b**). L'affinage génère une dissolution partielle du cristal qui est nettement plus importante que lors du clairçage. Le magma formé à 50-60°C est alors essoré et claircé dans uneessoreuse continue pour donner un sucre affiné de pureté de 98 % et un égout d'affinage de pureté moindre (environ 85 %), envoyé à la chaîne bas-produit. L'affinage représente une étape importante puisqu'il élimine environ 60 % de la couleur (Chen et Chou 1993).

Refonte et épuration

Le sucre affiné est refondu à 68 g de matières sèches pour 100 g de solution. Cette refonte est réchauffée jusqu'à 80-90°C. Le sirop contient encore des impuretés non éliminées par la clarification de la sucrerie. Il doit donc subir une nouvelle épuration chimique à base de chaux et de dioxyde de carbone (carbonatation), ou d'acide phosphorique (phosphatation). Cette épuration s'apparente à la clarification pratiquée en sucrerie de canne, mais elle est

légèrement plus poussée, puisqu'on atteint des pH de 8 à 10,5 avant la carbonatation. Après celle-ci, le sirop dont le pH est abaissé à 8 est filtré.

Décoloration de la refonte

La décoloration, étape essentielle du raffinage, est effectuée par adsorption des matières colorantes sur du noir animal, du charbon actif ou des résines adsorbantes, à des températures entre 70 et 85°C. Conduisant à une décoloration de la refonte supérieure à 80 %, le traitement sur résine est le plus performant mais aussi le plus économique. La décoloration est suivie d'une concentration si le sirop subit une dilution importante.

Cristallisation du sirop décoloré

Comptant deux chaînes de cristallisation, le schéma de cristallisation de la raffinerie est onéreux et plus compliqué que celui de la sucrerie. La cristallisation des haut-produits, en 3 étapes, produit généralement deux jets de sucre blanc pur et un jet de sucre moins pur, recyclé en cristallisation. Les 3 cristallisations successives de la ligne bas-produit assurent l'épuisement de la mélasse afin de réduire les pertes en saccharose. L'égout du dernier jet de la chaîne haut-produit et le sucre de la chaîne bas-produit constituent le sirop d'affinage.

2.2 FORMATION DES COLORANTS DURANT LES ETAPES D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION DU SACCHAROSE

Nous avons schématisé en **figure I.8**, la formation simultanée des colorants de fabrication, en présence des colorants naturels, à travers les étapes de fabrication du sucre de canne et de betterave.

Les colorants naturels proviennent essentiellement de la canne lors de son découpage et broyage. Ils sont présents dans les jus dès l'extraction, mais sont en majorité éliminés en

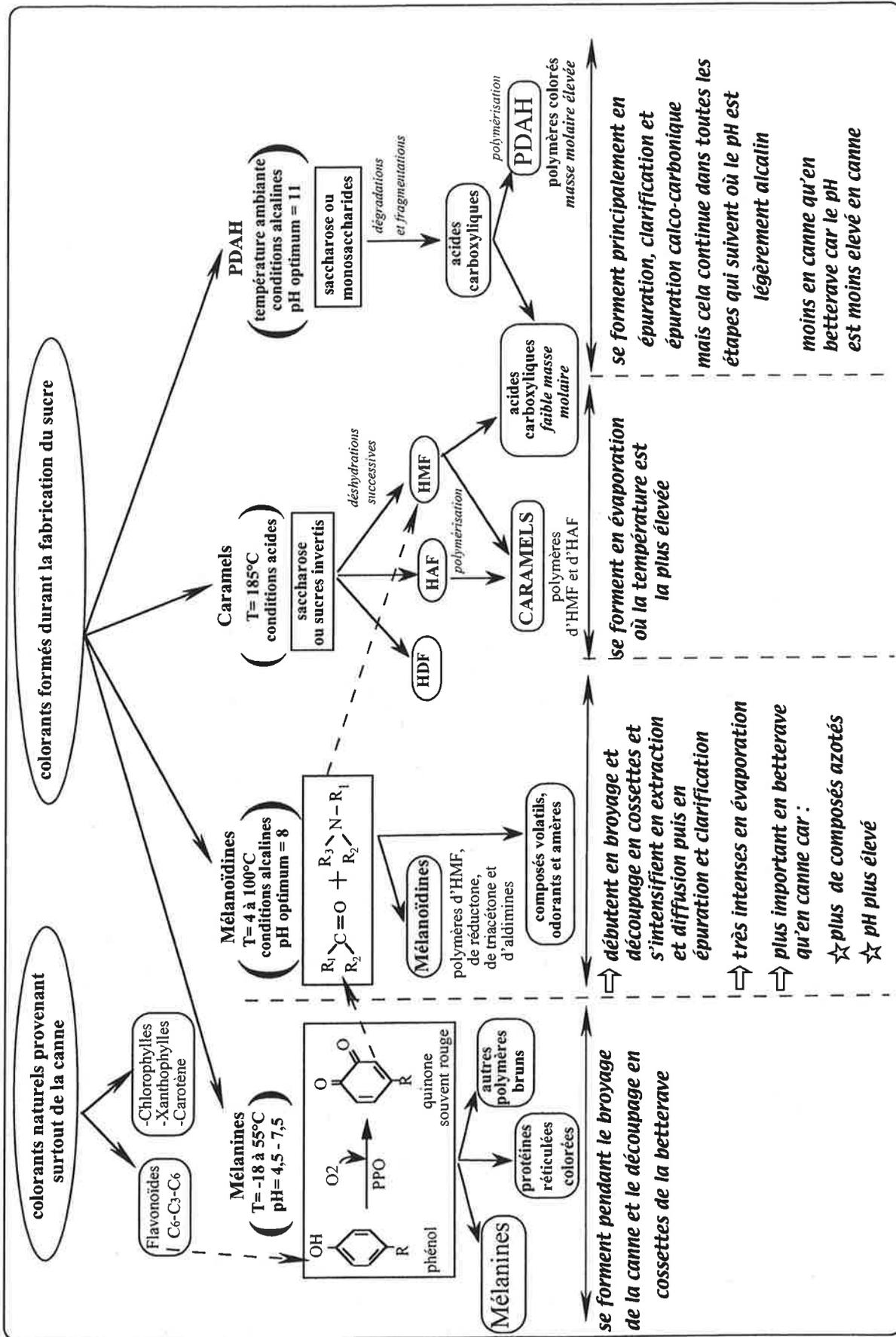


Figure I.8 : Formation simultanée des colorants en sucreries de canne et de betterave

épuration (Chen et Chou 1993). Cependant, les flavonoïdes étant des composés phénoliques, ils sont également impliqués dans la formation de mélanines.

Les mélanines se forment à des températures de -18°C à 55°C et à des pH de 4,5 à 8 (Catherine 1999). Les réactions de brunissement enzymatique sont donc très actives pendant le broyage (canne) et pendant le découpage en cossettes (betterave). Ces étapes entraînent la mise en contact des enzymes (polyphénoloxydases) et de leurs substrats (flavonoïdes et polyphénols en canne et acides organiques, acides aminés phénoliques ainsi que certaines bases aminées en betterave). Au-delà de l'étape de broyage ou de découpage, la température devient trop forte et les enzymes sont détruites. Les quinones formées peuvent cependant réagir avec les amines pour donner des mélanoïdines.

Les réactions de Maillard ont lieu à température ambiante, mais sont favorisées par l'augmentation de celle-ci. Elles se développent lentement en milieu acide et de façon plus intense en milieu basique (Adrian 1993). Par conséquent, les mélanoïdines peuvent déjà commencer à se former dès le découpage en cossettes (betterave) ou découpage et broyage (canne) où le pH est légèrement acide et la température faible. Les réactions s'intensifient en diffusion (betterave) et en extraction (canne), où les températures augmentent ($72-75^{\circ}\text{C}$). En sucrerie de betterave, les réactions de Maillard s'intensifient encore en épuration calco-carbonique où les conditions ($\text{pH} > 12$ et $T = 85-90^{\circ}\text{C}$) leur sont favorables. Leur formation est moindre en sucrerie de canne où la clarification se fait en milieu nettement moins alcalin. Cependant, en raffinerie, on atteint dans certains cas des pH de 10,5 favorisant un peu plus la formation des mélanoïdines. Dans les deux cas (canne ou betterave), les mélanoïdines se forment surtout en évaporation où la température est la plus élevée (127°C) et se poursuivent en cristallisation où la température reste élevée (80°C). La betterave étant naturellement plus riche en acides aminés et composés azotés que la canne, les mélanoïdines s'y forment plus facilement et en plus grande quantité.

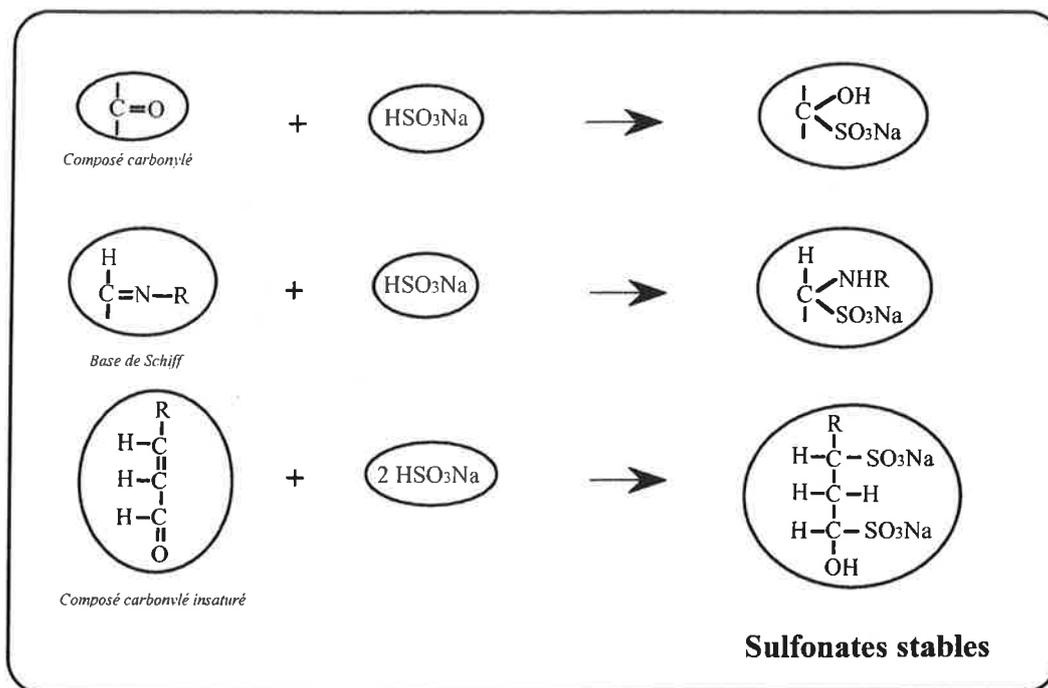


Figure I.9 : Action de l'acide sulfureux sur les réactifs intermédiaires des colorants de fabrication
(d'après Cheftel 1980)

En ce qui concerne les caramels, Ahari et Genotelle (1961) mentionnent la nécessité de chauffer au-delà de la température de fusion du saccharose (185°C) pour les former. Un chauffage intense fournirait effectivement l'énergie nécessaire aux déshydratations successives observées en caramélisation. D'après Pieck (1963) et Kelly et Brown (1978), les caramels se forment plutôt en milieu acide. Par conséquent, que ce soit en canne ou en betterave, la seule étape où la température est assez élevée (127 °C) pour former des caramels est l'évaporation, sachant toutefois que le milieu n'est pas acide mais plutôt légèrement alcalin. Durant la majorité des étapes de sucrerie, le milieu est plutôt alcalin et favoriserait plus la formation des PDAH.

Les PDAH se forment obligatoirement en milieu alcalin avec un optimum vers pH 11. La dégradation alcaline des hexoses a lieu à température ambiante, mais s'intensifie avec l'augmentation de celle-ci. Sachant que le saccharose s'hydrolyse également en milieu alcalin, et particulièrement aux pH élevés (Mauch 1971), l'étape principale de la formation des PDAH en sucrerie de betterave est l'épuration calco-carbonique (pH>12 et T=85-90°C). En sucrerie de canne (clarification) et raffinerie de canne (épuration), la formation des PDAH est moins importante qu'en betterave.

La seule possibilité d'inhiber efficacement la formation de tous les colorants de fabrication est l'ajout de soufre. Les sulfites en milieux aqueux donnent l'acide sulfureux. Ce dernier se lie avec les ions salins de la solution comme le sodium. Il inhibe les PPO d'une part et réagit avec les quinones pour les réduire en phénols incolores d'autre part (Shore *et al.*, 1984). Il réagit également (**figure I.9**) avec les composés carbonylés, les bases de Schiff et les composés carbonylés insaturés pour donner des sulfonates qui sont particulièrement stables, inhibant ainsi la formation des mélanoidines (Cheftel et Cheftel 1980 ; Shore *et al.*, 1984). La présence d'acide sulfureux inhibe aussi la formation des caramels car celui-ci attaque les doubles liaisons et les groupements carbonyles des invertis et de leurs dérivés les empêchant de réagir et de se polymériser (Shore *et al.*, 1984 ; Adrian 1997). Enfin, les sulfites inhibent la

formation des PDAH car ils stabilisent le composé intermédiaire énolique à partir duquel tous les produits de dégradation se forment (Kelly et Brown 1978). L'inconvénient de cet inhibiteur est que les précurseurs des colorants ne sont pas détruits. En effet, dès que les sulfites sont épuisés ou réagissent avec d'autres composés, libérant les sites actifs, les réactions de formation de colorants reprennent leurs allures initiales. De plus, les sulfites sont toxiques et leur teneur dans le sucre est contrôlée ce qui limite leur utilisation au niveau industriel. D'ailleurs certains pays (Inde) utilisant fortement ce composé cherchent à réduire son utilisation.

2.3 CONCLUSION

Par rapport aux colorants naturels, les colorants de fabrication sont plus gênants puisqu'ils se forment durant toutes les étapes de sucrerie. Ceci veut dire que pendant les étapes d'épuration précédant la cristallisation, on élimine des impuretés tout en en fabriquant d'autres. Ces dernières se retrouvent dans les sirops destinés à la cristallisation et handicapent cette étape importante dont dépend fortement la qualité du sucre blanc. L'incidence de ces impuretés sur la cristallisation a donc retenu notre intérêt, ainsi que la possibilité de s'en débarrasser par une méthode prometteuse qui est la filtration tangentielle.

3. INCIDENCE DES COLORANTS SUR LA CRISTALLISATION ET LEUR RETENTION PAR FILTRATION TANGENTIELLE

D'après les résultats de plusieurs études, les colorants de fabrication ainsi que les polysaccharides entravent particulièrement la cristallisation. Les plus gênants d'entre eux ont des masses molaires élevées d'où l'idée de les éliminer par filtration tangentielle. Nous présentons dans un premier temps les différentes études qui montrent comment ces macromolécules gênent la cristallisation. Dans un deuxième temps, nous étudierons à travers la bibliographie, la possibilité de leur rétention par filtration tangentielle.

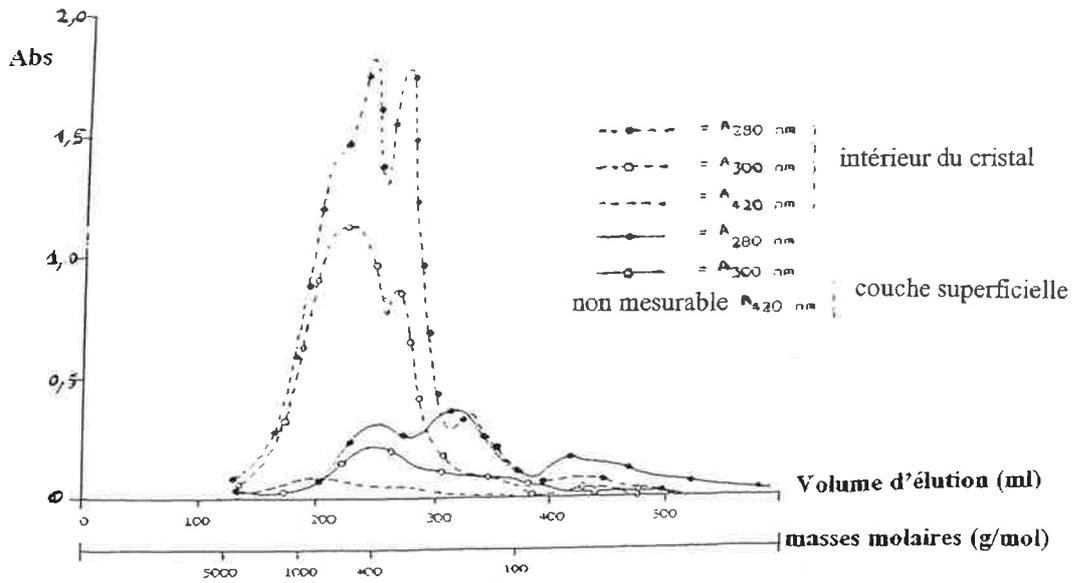


Figure I.10 : fractionnement sur gel d'exclusion des colorants contenus dans un sucre blanc de betteraves

(d'après Shore et al. 1984)

3.1 LES COLORANTS ET LA CRISTALLISATION DU SUCRE

Les impuretés présentes dans le jus de canne et de betterave peuvent gêner la cristallisation, soit en s'associant au saccharose (par des liaisons hydrophiles, hydrophobes) diminuant ainsi le rendement de cristallisation, soit en étant inclus dans le cristal, diminuant sa pureté.

La répartition des impuretés dans les cristaux et les eaux mères dépend de nombreux facteurs et en particulier de la taille de ces impuretés. Le rapport des composés de hautes masses molaires est effectivement plus important, à l'intérieur du cristal que dans l'eau mère. En effet, Shore *et al.*, (1984) ont dans un premier temps confirmé l'occlusion des colorants dans le cristal. Ils ont montré que la coloration d'un cristal de sucre blanc de betterave diminue de plus de 14 % si la couche superficielle du cristal est dissoute de 0,1 %. Cette coloration est réduite de 20 % pour 2 % de couche superficielle dissoute et de 25 % pour 20 % de couche superficielle dissoute. Ils ont ensuite étudié la répartition de ces colorants dans les cristaux de ce sucre blanc (intérieur du cristal et couche superficielle). Ils ont montré, par une technique de chromatographie sur gel associée à un détecteur UV, que les colorants ayant les plus hautes masses molaires se trouvent à l'intérieur du cristal, alors que ceux de masses molaires plus faibles se trouvent plutôt dans la couche superficielle qui l'entoure (**figure I.10**).

Ces résultats corroborent bien ceux obtenus par Godshall *et al.*, (1987) qui ont montré que 30 % des colorants restent après l'affinage et que 66 % des colorants retenus dans le cristal ont une masse molaire supérieure à 20 kg/mol. De plus, 70 % des polysaccharides présents dans le sucre roux restent après affinage ce qui montre bien que, plus la masse molaire est élevée, plus la tendance à être emprisonné dans cristal est forte.

Godshall *et al.*, (1987) ont poursuivi leurs travaux en filtrant du sucre roux et ses produits d'affinage et de raffinage avec une membrane de 12 kg/mol, puis ils ont analysé les rétentats par filtration sur gel avec un détecteur UV et un réfractomètre. Ils ont ainsi montré que les

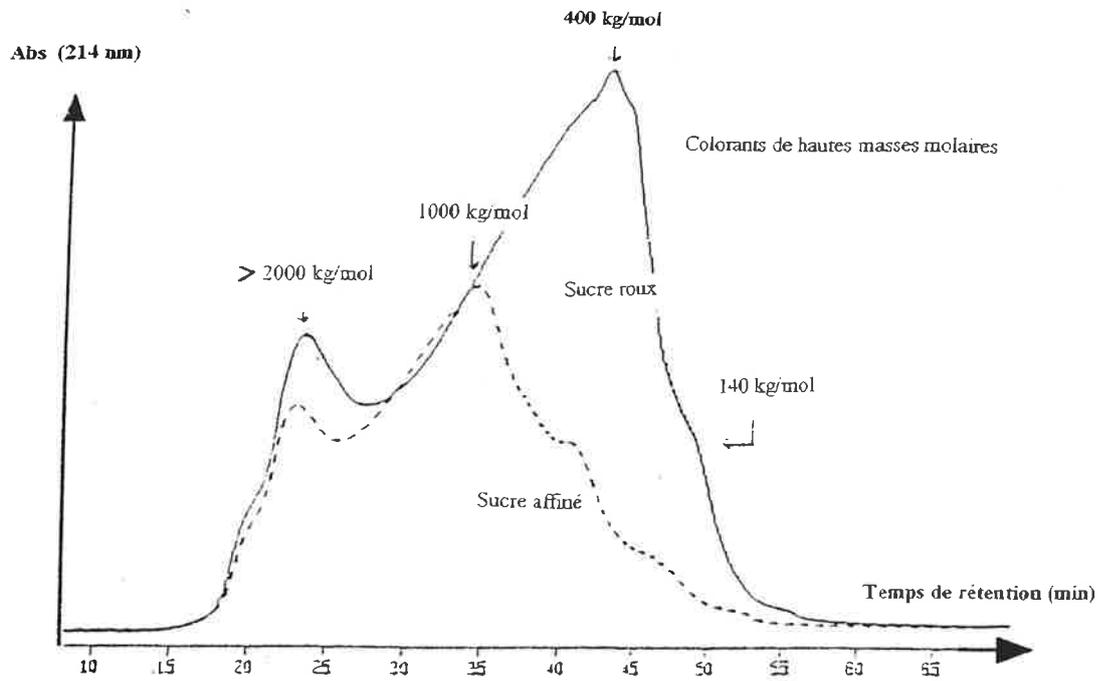


Figure I.11.a : Profils d'une chromatographie sur gel de colorants de hautes masses molaires d'un sucre roux et de son sucre affiné (Godshall et al. 1987)

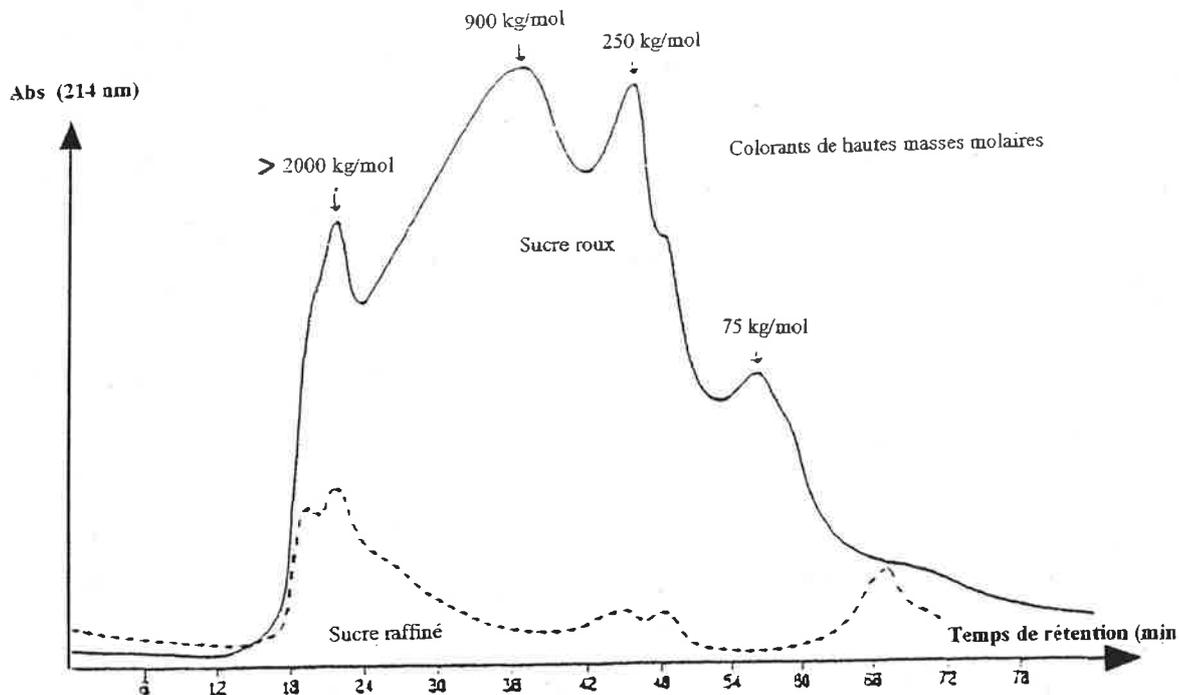


Figure I.11.b : Profils d'une chromatographie sur gel de colorants de hautes masses molaires d'un sucre roux et de son sucre raffiné (Godshall et al. 1987)

colorants de masses molaires supérieures à 1000 kg/mol persistent dans le cristal après l'affinage (**figure I.11.a**) et ceux de masses molaires supérieures à 1500 kg/mol persistent même après raffinage (**figure I.11.b**). En comparant les profils des colorants (détection UV) et des polysaccharides (détection au réfractomètre), ils montrent que le pic de polysaccharides coïncide parfaitement avec celui des colorants de hautes masses molaires qui sont demeurés même après raffinage (**figure I.12**). La formation de complexes polysaccharides-colorants serait une explication possible. En effet, il est connu que les polysaccharides des parois cellulaires de plusieurs plantes, sont liés à des composés phénoliques (précurseurs de colorants), en tant que groupement ester (Godshall *et al.*, 1987). Enfin, Godshall *et al.*, (1987) ont filtré deux sucres roux avec une membrane de 0,45 μm et ont trouvé qu'une partie de la coloration de ces sucres reste dans les rétentats. Ils ont également constaté que le sucre dont le rétentat est le plus coloré, est le plus difficile à raffiner. Ceci confirme bien que les colorants de hautes masses molaires posent un réel problème en cristallisation.

Ces dernières années, Bento et Sa (1998) ont également étudié les colorants de haute masse molaire (entre 1 kg/mol et 2000 kg/mol) dans les produits de sucrerie. Pour cela, ils se sont également basés sur une méthode d'analyse associant une chromatographie sur gel et une détection par mesure spectrophotométrique à 330 nm, mais cette fois avec une quantification par ELS (Evaporative Light Scattering). L'ELS est un détecteur dans lequel le solvant d'élution s'évapore et le nuage de molécules non évaporées disperse la lumière provenant d'une source lumineuse. Cette dispersion est détectée par un appareil optique qui transmet le signal en microvolts. En analysant du sucre roux, ces auteurs ont classé les colorants selon leurs temps de rétention par la colonne de chromatographie en trois groupes principaux A, B et C. Le groupe A représente les colorants de très hautes masses molaires (>250 kg/mol), le groupe B ceux de hautes masses molaires (12-250 kg/mol) et le groupe C les colorants de masses molaires moins importantes (2,5 -12 kg/mol). Ils ont ensuite analysé la répartition des colorants dans divers produits (sucre roux et les produits d'affinage issus de celui-ci, sucre blanc brut et lavé, puis mélasse). Ils ont montré que, les colorants de très hautes masses

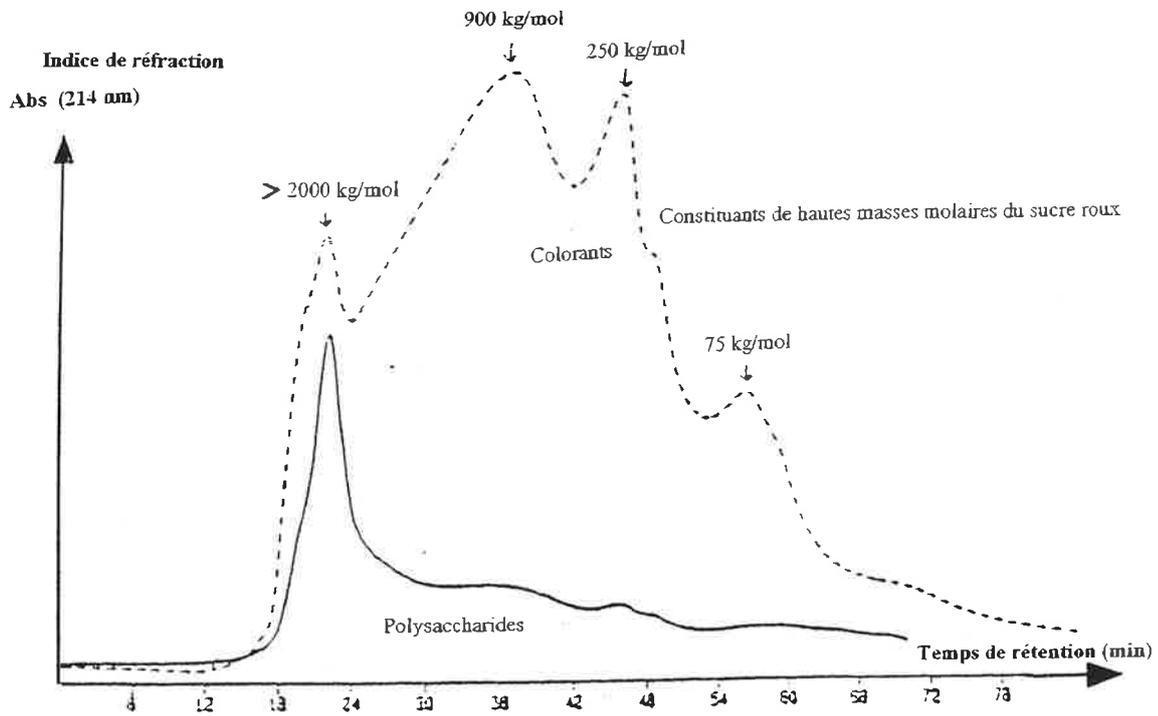


Figure I.12 : Superposition de profils d'une chromatographie sur gel d'un sucre roux.
Colorants (détection UV) et polysaccharides (détection au réfractomètre)
(Godshall et al. 1987)

molaires, mais peu colorés (groupe A), ont tendance à adhérer aux cristaux. Ceux du groupe B (masses molaires moins élevées que A) se répartissent entre les cristaux et l'eau mère, avec une préférence pour les cristaux. Les colorants du groupe C se répartissent également entre les cristaux et l'eau mère. Dans les cristaux, on les retrouve soit incrustés à l'intérieur de ceux-ci, soit y adhérant en une fine pellicule, et dans ce cas, ils seraient éliminés par lavage. Ils sont cependant majoritaires dans la mélasse (60 % des colorants totaux)

Enfin, d'après une étude de Vercellotti *et al.*, (1998), une mélasse récupérée en troisième jet de cristallisation d'un sirop de canne est pauvre en colorant de hautes masses molaires comparés à ceux de faibles masses molaires ce qui sous entendrait que les colorants de hautes masses molaires sont restés emprisonnés dans les cristaux.

A l'issue de ces différentes études, il ressort que des colorants entravent la cristallisation et diminuent la pureté des cristaux. Ces composés sont des colorants de hautes masses molaires ou issus de liaison entre des « petits » colorants avec des macromolécules, comme les polysaccharides. L'idée d'éliminer ces composés par filtration tangentielle pouvant être une alternative, nous nous sommes penchés sur ce sujet dans ce qui suit.

3.2 RETENTION DES COLORANTS DE SUCRERIE PAR FILTRATION TANGENTIELLE

Depuis quelques années, les chercheurs pensent que les membranes représentent une alternative intéressante aux procédés traditionnels de l'industrie du sucre de canne et de betterave. De nombreuses études ont été menées à l'échelle du laboratoire et plusieurs applications industrielles fonctionnent également. Parmi ces études, l'objectif est ici de mettre en évidence les résultats concernant la rétention des colorants par les membranes.

Différents auteurs (Decloux *et al.*, 1989 ; Fontana 1989 ; Trichard *et al.*, 1998) s'accordent pour dire que la microfiltration entre 0,1 et 1,4 μm , permet de clarifier les solutions mais la

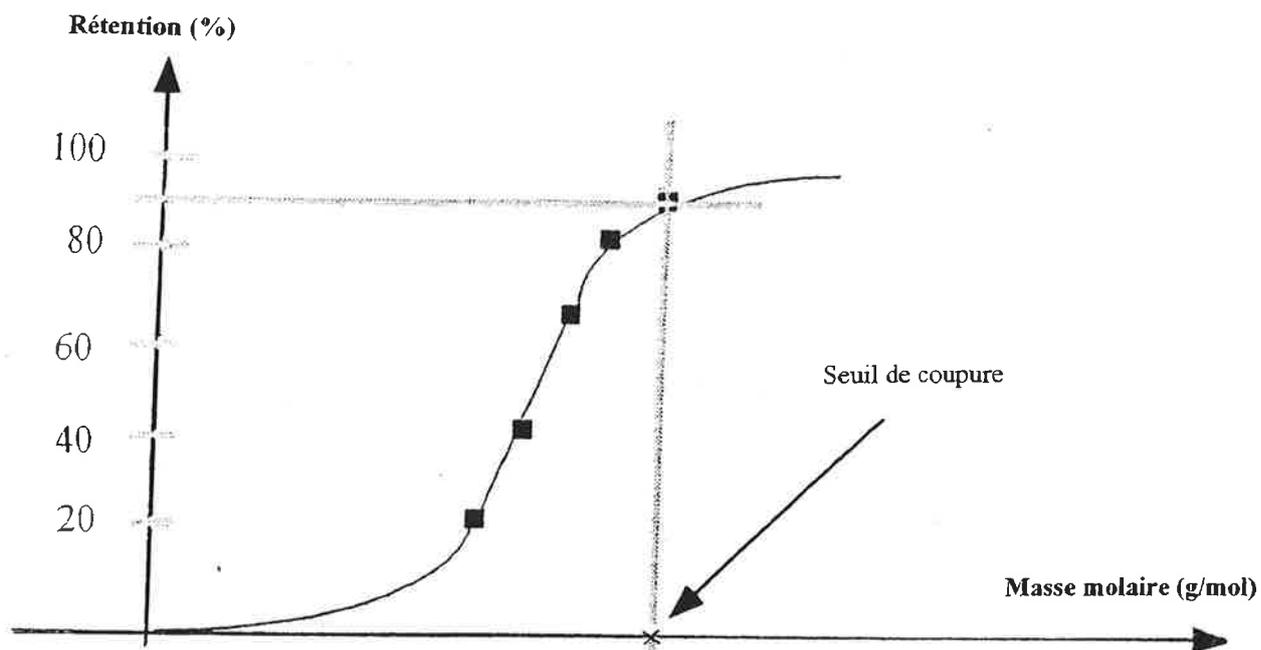


Figure I.13 : Courbe de rétention et définition du seuil de coupure des membranes
(Daufin et al 1998)

décoloration obtenue est pratiquement nulle. En ultrafiltration, Vane (1977) montre que la coloration est réduite de 80 %. D'après Kishihara *et al.*, (1981) l'ultrafiltration du jus de canne avec des membranes organiques donne des résultats supérieurs au procédé traditionnel du chaulage. Les seuils de coupure les plus intéressants se situeraient entre 10 et 30 kg/mol. Enfin Patel (1991) en filtrant des sirops de sucre roux dilués et de la mélasse diluée avec des membranes de 20 kg/mol, élimine dans tous les cas, jusqu'à 40 % de la coloration. L'ennui avec les membranes est que les jus sont tellement chargés en impuretés que le colmatage de celles-ci pose un réel problème.

Afin d'identifier la nature des molécules responsables du colmatage des membranes par des solutions sucrées, Vercellotti *et al.*, (1998) ont diafiltré une mélasse diluée avec une membrane de 2000 kg/mol puis se sont intéressés à ce qui était retenu par la membrane, donc au rétentat. Ils ont réalisé sur ce dernier une dialyse avec une membrane de 1,5 kg/mol afin d'évacuer les sels. Ils ont ensuite réalisé une analyse de ce rétentat avec une colonne de filtration sur gel ayant une gamme de fractionnement entre 5 et 800 kg/mol, inférieure au seuil de coupure de la membrane (2000 kg/mol). Ils ont observé que des composés du rétentat se répartissaient dans toute la gamme de fractionnement du gel, ce qui indique que des composés de masses molaires nettement inférieures au seuil de coupure de la membrane ont été bloqués par celle-ci. De plus, une analyse par chromatographie liquide haute performance a mis en évidence la présence de saccharose (0,342 kg/mol) dans le rétentat en question. Il est très important de rappeler à ce stade la définition du seuil de coupure nominal d'une membrane. Celui-ci est défini comme étant la masse molaire d'une molécule de la gamme étalon (ex : bleu dextran), qui serait retenue à 90 ou 95 %. Or si on observe la courbe de seuil de coupure proposée par Daufin *et al.*, (1998) (**figure I.13**), on remarque que les molécules ayant des masses molaires inférieures au seuil de coupure nominal sont quand même retenues à différents pourcentages. Il est donc tout à fait logique de croire que ces molécules sont responsables du colmatage des membranes. En effet, elles ne sont ni assez grosses (supérieures au seuil de coupure) pour rester en dehors de la membrane, ni assez petites pour

passer au travers des pores de celle-ci. Elles peuvent donc obturer les pores, sans compter que la forme des molécules peut jouer un rôle important dans le colmatage des membranes. Cependant, la rétention du saccharose par une membrane de 2000 kg/mol ne peut s'expliquer uniquement par la courbe de rétention de la membrane ou par la forme ou encore par la géométrie des molécules. Il n'y aurait pas une aussi grande différence entre les masses molaires et le seuil de coupure de la membrane. Ils ont donc soupçonné l'existence d'agrégats qui se seraient formés à partir des composés du jus de canne. Ces agrégats auraient emprisonné des molécules du jus, comme les dextrans, les polysaccharides ou les colorants par des liaisons électrostatiques, hydrophobes ou hydrophiles. Ces agrégats de molécules pourraient être à l'origine de la formation d'un gel à la surface de la membrane, obturant ainsi ses pores. De plus, ces agrégats qui retiennent du saccharose sont d'inévitables inhibiteurs de cristallisation.

Ce résultat rejoint celui obtenu par Bento (1996) qui avait montré qu'avec une membrane de seuil de coupure de 4 kg/mol, 90% des colorants étaient retenus mais également une partie du calcium présent dans la solution. Il expliquait lui aussi cette rétention de petites molécules par la formation d'un complexe, ici calcium-colorant. Des molécules de hautes masses molaires (ici des colorants) ont donc retenu le calcium l'empêchant de passer à travers une membrane qu'il aurait traversée autrement. De même, il montrait que les chlorures et le saccharose se répartissaient entre le rétentat et le filtrat avec une petite préférence vers le filtrat. Cosmeur (1999) a également mis en évidence la rétention du saccharose par une membrane de 10 kg/mol, confirmant le phénomène.

Ainsi, ces travaux nous alertent sur le fait qu'on ne doit pas croire que la rétention des molécules par les membranes est régie par un simple tamisage des molécules selon leur masse molaire. Il y a effectivement des phénomènes beaucoup plus compliqués, non identifiés, et qui interviennent surtout avec des solutions de composition inconnue et complexe. Il paraît donc

primordial de bien caractériser l'efficacité de la filtration tangentielle par rapport aux composés qu'on désire éliminer.

4. CONCLUSION

Cette synthèse bibliographique nous conduit à constater plusieurs points. Tout d'abord les colorants de fabrication sont plus gênants que les colorants naturels. En effet, ces derniers provenant des plantes sucrières, sont présents dans les jus dès le départ et ne se créent pas pendant l'extraction et la purification du saccharose. En revanche, les colorants de fabrication proviennent essentiellement de la dégradation du saccharose. Ce dernier étant présents dans tout le procédé de sucrerie, il suffit que les conditions soient favorables pour qu'il se dégrade et que des colorants de fabrication se forment et se multiplient. Ils se retrouvent ensuite dans les sirops et gênent la cristallisation.

De plus, ces colorants de fabrication ont souvent entre eux les mêmes précurseurs, ce qui implique qu'ils peuvent se former simultanément avec des possibilités que certains se forment plus facilement que d'autres. Les produits formés sont nombreux, pas assez connus et dépendent beaucoup des précurseurs également nombreux. Nous avons toutefois souligné des liens entre les conditions physico-chimiques propres à la formation des colorants et celles des étapes de sucrerie. Nous avons ainsi constaté que la formation des mélanines s'arrête aux étapes d'extraction et de diffusion. Celle des caramels n'est probable qu'en évaporation, alors que la formation des mélanoïdines et des PDAH a lieu durant pratiquement toutes les étapes de la sucrerie avec une plus grande intensité en épuration calco-carbonique.

Par ailleurs, plus les masses molaires de ces composés colorés sont élevées, plus ils ont tendance à adhérer aux cristaux ou à former des agrégats inhibiteurs de cristallisation. L'idée de les éliminer par filtration tangentielle paraît donc intéressante. Le problème est que la rétention par filtration tangentielle n'est pas un simple tamisage des molécules selon leurs

masses molaires. Il paraît donc primordial de bien caractériser l'efficacité de cette technique, par des moyens analytiques.

Pour cela, nous avons choisi tout d'abord suivre la formation des colorants et de les caractériser individuellement par spectrométrie afin de pouvoir les repérer. Ensuite, nous avons décidé de mettre au point une méthode qui permette de déterminer leurs masses molaires. En associant ces deux méthodes analytiques, notre objectif était de déterminer leur rétention effective par filtration tangentielle.

Chapitre II

RECONSTITUTION DES COLORANTS DE FABRICATION AU LABORATOIRE SUIVI DE LEUR FORMATION ET ANALYSES SPECTROMETRIQUES

| | |
|--|-----------|
| 1. RECONSTITUTION DES COLORANTS DE FABRICATION AU LABORATOIRE ... | 29 |
| 1.1 Méthodes existantes de reconstitution des colorants de fabrication au laboratoire .. | 29 |
| 1.2 Mise en œuvre du réacteur..... | 31 |
| 1.3 Choix des conditions expérimentales..... | 32 |
| 2. SUIVI DE LA FORMATION DES COLORANTS DE FABRICATION | 34 |
| 2.1 Mélanoidines..... | 34 |
| 2.2 Caramels..... | 34 |
| 2.3 PDAH..... | 36 |
| 2.4 Conclusion | 37 |
| 3. CARACTERISATION DES COLORANTS DE FABRICATION PAR SPECTROMETRIE..... | 37 |
| 3.1 Principe de la spectrométrie UV-Visible et mesure des spectres..... | 38 |
| 3.2 Méthodes spectrométriques existantes de caractérisation des colorants de fabrication | 39 |
| 3.2.1 Mesure de la coloration globale selon la méthode ICUMSA | 39 |
| 3.2.2 Comparaison des maximums d'absorbance des colorants..... | 40 |
| 3.2.3 Indice de valeur (IV)..... | 40 |
| 3.2.4 Méthode du diagramme $H\lambda f$ en fonction de $L\lambda f$ | 41 |
| 3.3 Caractéristiques spectrométriques des colorants modèles formés | 42 |
| 3.3.1 Analyses des spectres | 42 |
| 3.3.2 Résultats obtenus | 42 |
| 3.3.2.1 Spectres du visible | 43 |
| 3.3.2.2 Spectres de l'UV | 44 |
| 3.3.3 Exploitations mathématiques des spectres des colorants obtenus..... | 44 |
| 3.3.3.1 Application de la méthode du diagramme $H\lambda f$ en fonction de $L\lambda f$ | 44 |
| 3.3.3.2 Méthode d'analyse en composantes principales (ACP) | 46 |
| 3.3.3.3 Méthodes de classification hiérarchique (méthode de Ward)..... | 47 |
| 4. CONCLUSION | 48 |

Comme il a été montré au chapitre I, les colorants de fabrication se forment pendant les différentes étapes d'extraction du saccharose et posent un réel problème en cristallisation surtout lorsque leurs masses molaires sont élevées. Leur élimination par filtration tangentielle est une possibilité mais plusieurs phénomènes peuvent intervenir dans le procédé. Dans la première partie de ce chapitre, nous présentons le mode de reconstitution au laboratoire des colorants de fabrication les plus gênants (mélanoïdines, caramels et PDAH). Nous présentons ensuite la cinétique de formation de la coloration au cours du temps pour chaque colorant. Enfin, nous présentons les résultats des analyses spectrométriques de ces colorants modèles formés et l'exploitation mathématique statistique des spectres, permettant de faire une distinction entre eux.

1. RECONSTITUTION DES COLORANTS DE FABRICATION AU LABORATOIRE

Afin de reconstituer les colorants de fabrication au laboratoire, nous avons tout d'abord recherché les méthodes citées dans la littérature. Nous avons ensuite mis au point une méthode expérimentale de préparation de ces colorants. Cette méthode tient compte, en même temps des conditions optimales de formation de chaque colorant et des conditions appliquées en sucrerie. Enfin nous avons suivi et comparé la formation des mélanoïdines, des caramels et des PDAH. Nous n'avons pas étudié ici le cas des mélanines car ces colorants ne se forment plus dès la diffusion en sucrerie. Nous les avons donc jugés moins gênants que les mélanoïdines, caramels et PDAH.

1.1 METHODES EXISTANTES DE RECONSTITUTION DES COLORANTS DE FABRICATION AU LABORATOIRE

Les colorants de fabrication ont fait l'objet de diverses études et plusieurs chercheurs les ont préparés au laboratoire. On ne rencontre pas toujours la même méthode de préparation qui,

pour chaque colorant, varie d'un auteur à un autre. Nous avons tenu à rappeler celles-ci, afin de mieux justifier les choix que nous avons faits pour préparer ces colorants.

Mélanoïdines

Pour les mélanoidines, Ahari et Genotelle (1961) mélangent trois acides aminés différents (acide glutamique 2,12 g, acide aspartique 1,3 g et glycine 0,72 g) avec 4,16 g de glucose dans 80 mL d'eau. Le tout est alcalinisé à pH 9 puis ajusté à 100 mL. La solution est portée à ébullition dans un ballon avec réfrigérant à reflux pendant 2 heures. Smith (1966) prépare un mélange d'acides aminés (arginine, lysine, acide glutamique, asparagine et alanine à masse égale) auquel il ajoute 5 g de glucose et 10 g de saccharose. Après ajustement du pH à 9, la solution est chauffée à reflux pendant 20 heures. Shore *et al.*, (1984) et Bento (1995) ainsi que Bento et Sa (1998) préparent 72 g de glucose et 30 g de glycine dans 60 mL d'eau. Après avoir ajusté le pH à 11, ils incubent la solution à 50°C pendant 72 h puis la diluent à 500 mL avec de l'eau distillée. Keramat et Nursten (1994) synthétisent les mélanoidines séparément à partir du glucose puis à partir du fructose. Ils préparent deux solutions de 1 L, à 1 mol/L de glucose puis à 1 mol/L de fructose respectivement, contenant chacune 1 mol/L d'alanine. Les deux solutions sont chauffées à 80-85°C pendant une heure après avoir ajusté le pH à 10,2. Les solutions sont ensuite refroidies puis leur pH ajusté à 7 pour la conservation. Hirano *et al.*, (1996) préparent une solution de glucose 1 mol/L, de glycine 1 mol/L et de carbonate de sodium 0,1 mol/L, qu'ils incubent à 90°C pendant 72 heures.

Caramels

Pour les caramels, Ahari et Genotelle (1961) préparent 20 g de saccharose humidifié par 5 mL d'eau dans des tubes à essai. Ils chauffent le mélange en étuve à 180°C pendant 2h30, puis introduisent dans chaque tube 10 mL d'eau pour dissoudre la masse. Ils placent ensuite les tubes dans un bain marie à 100°C et ajoutent 10 mL d'eau jusqu'à dissolution totale de la masse. Après refroidissement, le pH est ajusté à 8 et la solution est conservée au froid dans des flacons. Smith (1966) humidifie du saccharose et le chauffe en agitant, jusqu'à apparition de coloration. Il dissout ensuite la masse obtenue jusqu'à aboutir à une solution claire. Shore

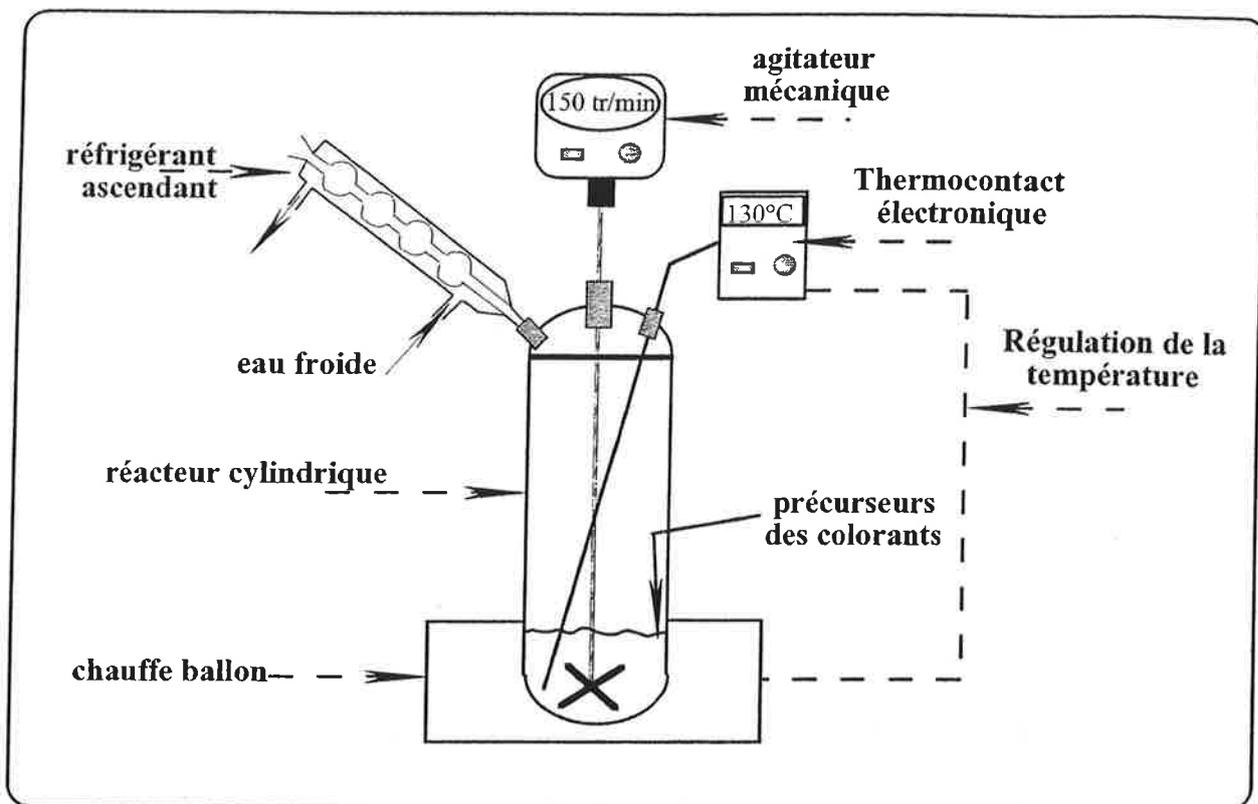


Figure II.1 : Réacteur de reconstitution des colorants de fabrication

et al., (1984) et Bento (1995) ainsi que Bento et Sa (1998) font incuber 180 g de saccharose additionné de 20 mL d'eau durant 66 h dans une étuve à 105°C. Keramat et Nursten (1994) préparent une solution de saccharose à 65 g pour 100 g de solution et la chauffent à 80-85°C pendant 1 heure après avoir ajusté le pH à 10,8. La solution est ensuite refroidie puis ajustée à pH 7 pour la conservation.

PDAH

Pour les PDAH, Ahari et Genotelle (1961) préparent 500 mL d'une solution à 20 g/L de glucose. Après avoir ajusté le pH à 11, ils portent la solution à ébullition dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant pendant 1h30. Ils ajustent le pH en cours de réaction au fur et à mesure que celui-ci diminue. La solution colorée obtenue est concentrée sous vide et son pH est ajusté à 8. Smith (1966) prépare une solution diluée de fructose, qu'il ajuste à pH 10 et qu'il chauffe doucement. Le mélange brunit rapidement pour donner une solution colorée claire. Shore *et al.*, (1984) et Bento (1995) ainsi que Bento et Sa (1998) portent à ébullition pendant 5 heures, dans un ballon muni d'un réfrigérant ascendant, 200 mL d'une solution à 20 g/L de glucose, après avoir ajusté son pH à 9,5. Le pH est maintenu tout au long de la réaction par ajout de soude. Keramat et Nursten (1994) chauffent 1 L d'une solution 1 mol/L de glucose à 80-85°C pendant 1 heure après avoir ajusté le pH à 10,9. Ils affirment que dans ces conditions le pH ne baisse pas en dessous de 8,3. La solution colorée obtenue est ensuite refroidie et son pH ajusté à 7.

1.2 MISE EN ŒUVRE DU REACTEUR

Au lieu d'incuber directement les précurseurs des colorants à l'étuve, nous avons choisi de mettre en place un réacteur étanche d'un litre en verre pyrex (**figure II.1**). Les réactions sont conduites à pression atmosphérique, avec recyclage des vapeurs par réfrigérant ascendant. L'intérêt de ce dispositif est de maîtriser au mieux l'évaporation et d'obtenir des colorants de manière reproductible. Le réacteur est muni d'un couvercle à orifices permettant d'introduire des sondes de mesure afin de suivre les étapes de la réaction. Afin de maintenir l'étanchéité, le

réacteur est fermé hermétiquement par un joint et une couronne à vis. Le chauffage est assuré par un chauffe ballon à régulateur incorporé Prolabo. La régulation de la température de la solution est faite à $\pm 1^\circ\text{C}$ par l'intermédiaire d'un thermocontact électronique qui est relié au chauffe ballon par une fiche dyne. La sonde du thermocontact électronique est directement plongée dans le réacteur. Le réacteur est également muni d'un agitateur mécanique à hélice de type Heidolph RZR 2021, pour homogénéiser la solution et éviter la prise en masse au fond de celui-ci, surtout dans le cas des caramels.

1.3 CHOIX DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Nous avons choisi un temps de réaction de trois heures pour la préparation des trois colorants de fabrication. Pour ce qui est de la température et du pH ainsi que des précurseurs utilisés, le choix a été fait individuellement, pour chaque colorant. Dans pratiquement toutes les méthodes de préparation rencontrées dans la littérature, les auteurs ajustent les pH des colorants à 7 car ils sont apparemment plus stables en milieu neutre. Nous avons donc ajusté les pH des colorants à 7 avant conservation au réfrigérateur en ajoutant de la soude ou de l'acide selon le cas.

Mélanoïdines

Pour les mélanoïdines, nous avons préparé 500 mL d'une solution à 1 mol/L, équimolaire, de glucose (24 379 294 Prolabo) et de glycine (G-7126 Sigma) dans de l'eau ultra pure, puis nous l'avons versée dans le réacteur. Le pH de la solution a été ajusté à 8 car c'est le pH optimum favorisant les réactions de Maillard (Cheftel et Cheftel 1980). Nous n'avons pas jugé nécessaire d'utiliser plusieurs acides aminés afin de ne pas induire trop de variabilité dans les produits formés. D'après Adrian (1993), les mélanoïdines se forment faiblement à température ambiante, mais à 100°C tous les acides aminés présents dans la solution réagissent. Cette température a donc été choisie car elle a en plus l'avantage d'être proche des conditions de sucrerie. La solution de glucose et de glycine a été chauffée à reflux, pendant

3 heures, à 100°C et 175 tr/min de vitesse d'agitation. En fin de réaction, 200 g de la solution ont été prélevés puis refroidis.

Caramels

Concernant les caramels, ne sachant pas s'il était vraiment obligatoire de chauffer à de très hautes températures pour les obtenir, nous en avons testé plusieurs (100, 120, 130 et 140°C). Même en sachant que les réactions de caramélisation sont favorisées par les milieux acides, nous n'avons pas acidifié le milieu car pour des raisons d'hydrolyse du saccharose, les milieux acides sont évités en sucrerie. Il s'agissait donc de vérifier si les caramels se forment effectivement en dehors des milieux acides. Nous avons pesé dans le réacteur 320 g de saccharose pur de laboratoire (50-04 Fischer chemicals) que nous avons humidifié avec 30 mL d'eau ultra pure ce qui donne une concentration de 91,4 g pour 100 g de solution. Le mélange a été chauffé, à reflux, pendant 3 heures, aux consignes de 100, 120, 130 puis 140°C avec, à chaque fois, 175 t/min de vitesse d'agitation. En fin de réaction, 200 g du caramel obtenu ont été pesés, dilués avec 200 g d'eau ultra pure, puis refroidis.

PDAH

Pour les PDAH, nous avons préparé 500 mL d'une solution à 10 g/L de glucose (24 379 294 Prolabo) dans de l'eau ultra pure, puis nous l'avons versée dans le réacteur. Le pH a été ajusté à 11 car c'est à ce pH que la dégradation alcaline des hexoses atteint son maximum (Kelly et Brown 1978). Puisque les PDAH se forment en milieux alcalins et produisent des acides, il est impératif de maintenir un pH alcalin tout au long de la réaction. Pour cela, Nous avons ajouté au réacteur une sonde de pH (Type InPro 3100 325 avec sonde de température Pt100 incorporée Metler-Toledo) résistante à 130°C et un robinet à boule contenant de la soude pour ajuster le pH. A la suite de plusieurs essais préliminaires, nous avons ajusté la méthode pour le maintien du pH. Il fallait pour cela ajouter 2 mL de soude 10 M, toutes les 5 minutes, pendant les 30 premières minutes de la réaction. La solution de glucose ajustée à pH 11 a été chauffée, à reflux, pendant 3 heures à 100°C et 175 t/min.

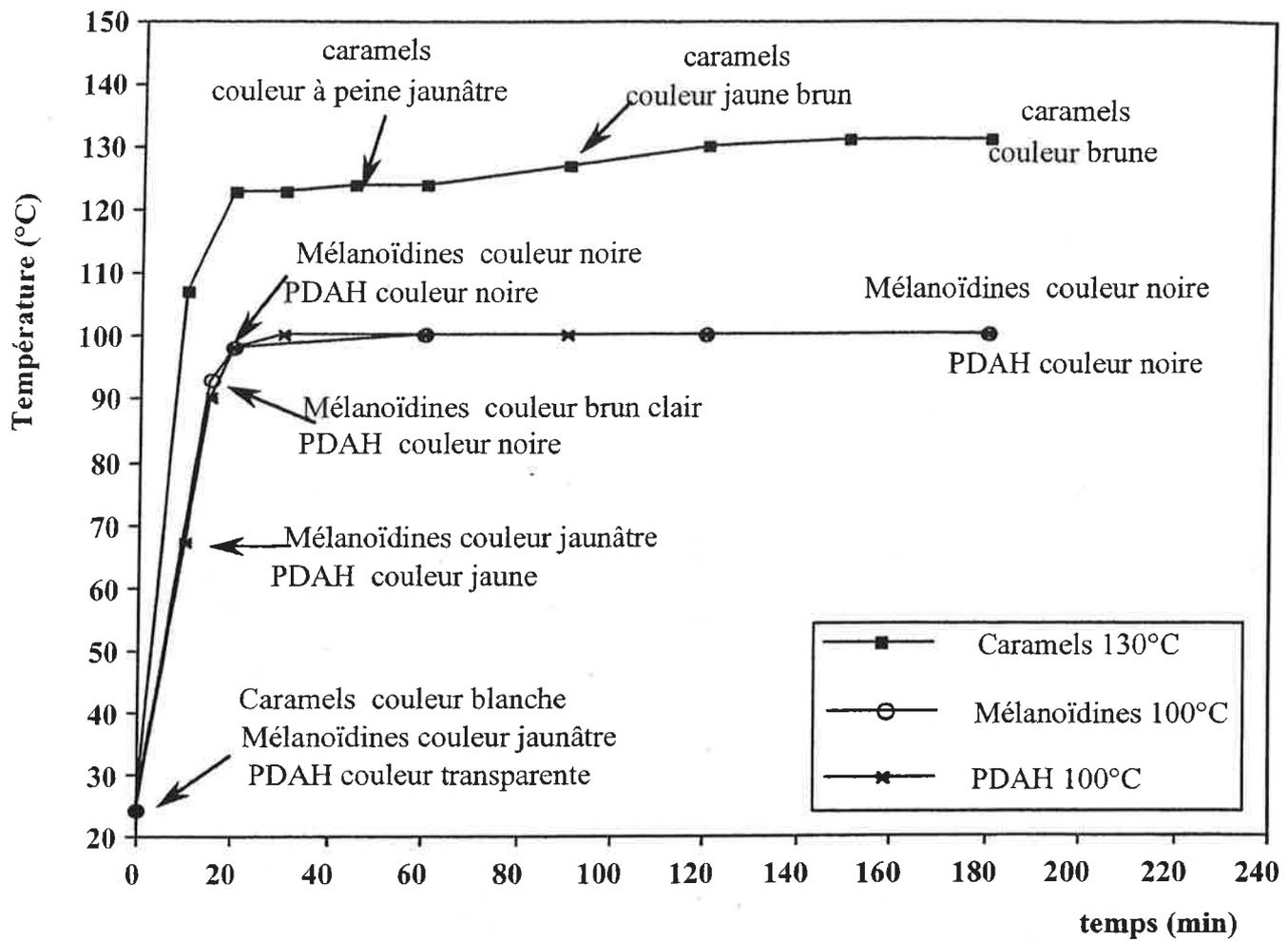


Figure II.2 : Suivi de la température et de la coloration, au cours de la formation des mélanoïdines, des caramels et des PDAH

Une température de 100°C est comme pour les mélanoidines, suffisante pour former des PDAH, tout en étant proche des conditions de sucrerie. En effet, d'après de Bruijn *et al.*, (1986), les PDAH se forment même à température ambiante. En fin de réaction, 200 g de la solution colorée obtenue ont été prélevés puis refroidis.

2. SUIVI DE LA FORMATION DES COLORANTS DE FABRICATION

2.1 MELANOIDINES

Le suivi de la température et de la coloration au cours de la formation des mélanoidines est présenté en **figure II.2**. La solution équimolaire de glucose et glycine ajustée à pH 8 avait initialement une couleur jaune très pâle. La consigne de 100°C a été atteinte en 20 min et s'est maintenue jusqu'à la fin de la réaction sans aucune ébullition compte tenu de l'élévation ébullioscopique. La solution a commencé à prendre de la couleur dès 15 min puis s'est assombrie très rapidement pour devenir noire en 5 min. La solution colorée obtenue était noire opaque, liquide et avait un pH de 4,77 avant qu'il ne soit ajusté à 7 pour la conservation. La cinétique a été parfaitement reproductible pour les trois mélanoidines 1, 2 et 3 préparées.

2.2 CARAMELS

A 100°C, il n'y a pas eu de formation de coloration. A 120°C, nous avons abouti à des caramels jaunâtres à peine colorés. A 130°C nous avons préparé des caramels bruns de manière reproductible. A 140°C nous avons obtenu des caramels bruns mais trop différents. Nous avons, en effet, préparé six caramels à cette température sans arriver à obtenir la même intensité de coloration. Nous avons donc retenu, pour les analyses, les trois caramels 1, 2 et 3, préparés à 130°C. Ces caramels étaient très visqueux et translucides. Il a fallu, immédiatement les dissoudre dans de l'eau à 50 % afin d'éviter qu'ils ne se solidifient. Avant d'être ajusté à 7

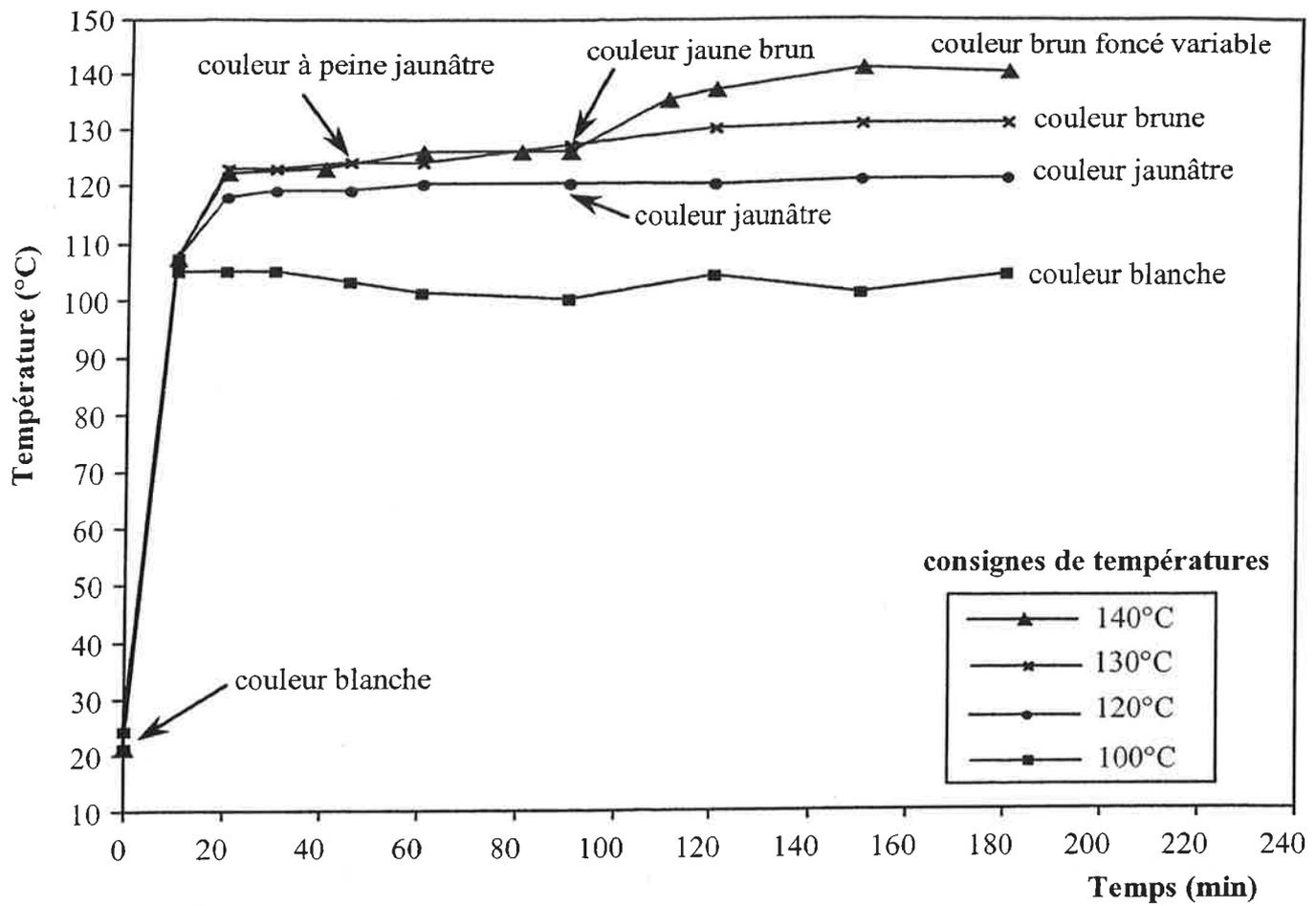


Figure II.3 : Suivi de la température et de la coloration au cours des réactions de caramélisation, à différentes consignes de températures

leur pH était de 3,72, ce qui confirme que la formation de caramels s'accompagne de formation d'acides.

La **figure II.3** représente l'évolution de la température et de la coloration au cours de la formation des caramels aux différentes consignes de température testées. Nous avons constaté une même cinétique pour les consignes de 130°C et 140°C. En effet, une température de 124°C a été atteinte en 20 minutes, durant lesquelles le saccharose s'est solubilisé. Cette température s'est maintenue pendant 70 min, avec ébullition de la solution. Pourtant, l'élévation ébullioscopique d'une solution de saccharose à 91,4 g pour 100 g de solution est de 30°C d'après l'équation d'Adamson (Mc Ginnis 1982). De plus, l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose double la concentration molaire et est donc sensée augmenter l'élévation ébullioscopique. L'explication plausible de cette faible élévation ébullioscopique constatée (24°C) est que les réactions de caramélisation sont en effet des réactions de déshydratations successives. La quantité d'eau libérée au sein de la solution serait nettement plus importante que celle, impliquée dans l'hydrolyse du saccharose, 3 molécules libérées pour 1 molécule impliquée dans l'hydrolyse d'après Kelly et Brown (1978). Pour appuyer cette explication, nous avons constaté dès 10 min de réaction que le saccharose s'est solubilisé. Or, d'après l'équation de Charles (Chen et Chou 1993), il faudrait atteindre une température d'environ 155°C pour solubiliser une solution aqueuse de saccharose à 91,4 g pour 100 g de solution. Il est donc évident que la concentration de la solution diminue suite à cette libération de molécules d'eau. Après cette phase de stabilisation de la température, cette dernière a augmenté progressivement jusqu'à atteindre la valeur de consigne (130 ou 140°C) et l'ébullition s'est arrêtée. C'est à partir de ce moment là, que nous avons noté l'apparition de la coloration brune indiquant que l'HMF, l'HAF et probablement d'autres monomères se polymérisent, formant des colorants. La consigne de température a été maintenue ensuite jusqu'à la fin de la réaction et la coloration s'est intensifiée de plus en plus. Nous n'avons pas trouvé d'explication logique à l'augmentation de l'élévation ébullioscopique après la phase de stabilisation. Il faudrait pour cela que la solution se concentre or, la réaction se fait en

recyclage total des vapeurs. De plus, la polymérisation, d'après Cloizeaux et Jannink (1987), n'entraîne pas de piégeage d'eau. En effet, elle se fait par réactions en chaîne de monomères ayant des doubles liaisons. Cette double liaison s'ouvre lors de la fixation des monomères. La polymérisation entraîne même dans certains cas une libération d'eau. Une des possibilités est que la formation d'acides et autres monomères soit très importante et que la concentration molaire de la solution augmente significativement. A 100°C et 120°C, nous n'avons pas constaté de palier de stabilisation de température puisque les consignes sont trop faibles, comparées à la température d'ébullition de la solution. Ces consignes ont été atteintes dès 20 min de réaction et se sont maintenues jusqu'à la fin de la réaction.

2.3 PDAH

Le suivi de la température et de la coloration au cours de la formation des PDAH est présenté en **figure II.2**. La solution à 10 g/L de glucose, ajustée à pH 11 était initialement de couleur transparente. Dès le début du chauffage, le pH a diminué, signe d'un début de formation d'acides. Au bout de 10 min de réaction, la solution a acquis une coloration jaune qui s'est intensifiée pour devenir marron foncé puis noire en 5 min. Ceci indique la polymérisation des acides formés donnant naissance à des chaînes d'hydrocarbures poly-insaturées, génératrices de coloration. Au bout de 30 min de réaction, la température de consigne (100°C) a été atteinte et le pH était de 10,30. A partir de ce moment, la solution ne s'acidifiait plus et ne nécessitait donc plus d'ajout de soude pour maintenir le pH, ce qui indique l'épuisement des précurseurs d'acides. Contrairement à ce qui est mentionné dans la littérature (De Bruijn *et al.*, 1986), la solution colorée obtenue n'était pas jaune brunâtre. Elle était noire, opaque et liquide semblable à la solution de mélanoïdines. Une fois refroidie, elle avait un pH de 12,60. La cinétique a été parfaitement reproductible pour les trois PDAH 1, 2 et 3 préparés.

2.4 CONCLUSION

En chauffant pendant 3 heures du saccharose humide à 91,4 g pour 100 g de solution, on peut former des caramels à une consigne de 130°C sans acidifier obligatoirement le milieu. La présence des caramels n'est donc pas impossible en sucrerie. Cependant, il se forme également en sucrerie, des mélanoidines et des PDAH. Comme ces trois colorants ont les mêmes précurseurs, il y a forcément une concurrence. Or, contrairement aux caramels, les PDAH et les mélanoidines se forment beaucoup plus facilement et beaucoup plus rapidement, sans nécessiter un chauffage important. En effet si on compare les cinétiques de coloration de ces trois colorants, présentées en **figure II.2**, on constate qu'à 100°C, les PDAH et les mélanoidines présentent une coloration noire en très peu de temps de réaction (15 et 20 min respectivement). En revanche ce n'est qu'au bout de 45 min de réaction que les colorants caramels commencent à se former (coloration à peine jaunâtre). Ils sont pourtant préparés à plus haute température (130°C). Ainsi, la présence de caramels en sucrerie est probable, mais en quantité bien moindre que les PDAH et les mélanoidines, surtout que la température dépasse rarement les 120°C. Sachant qu'en sucrerie, le pH est très souvent basique, on a plus de chance de former des PDAH qui nécessitent légèrement moins de temps que les mélanoidines. De plus, ces derniers nécessitent une condition supplémentaire qui est la présence d'acides aminés.

3. CARACTERISATION DES COLORANTS DE FABRICATION PAR SPECTROMETRIE

La méthode classique de caractérisation des colorants de sucrerie est la mesure globale de l'absorbance à 420 nm (méthode ICUMSA). Certains auteurs (Bento 1995 ; Godshall 1997 ; Cosmeur 1999) ont cependant mis en évidence des différences entre les colorants de fabrication. Ils ont utilisé pour cela des méthodes basées sur des analyses spectrométriques. Nous avons dans un premier temps jugé utile de présenter brièvement le principe de la spectrométrie UV-Visible et la mesure des spectres, afin de distinguer et délimiter les deux

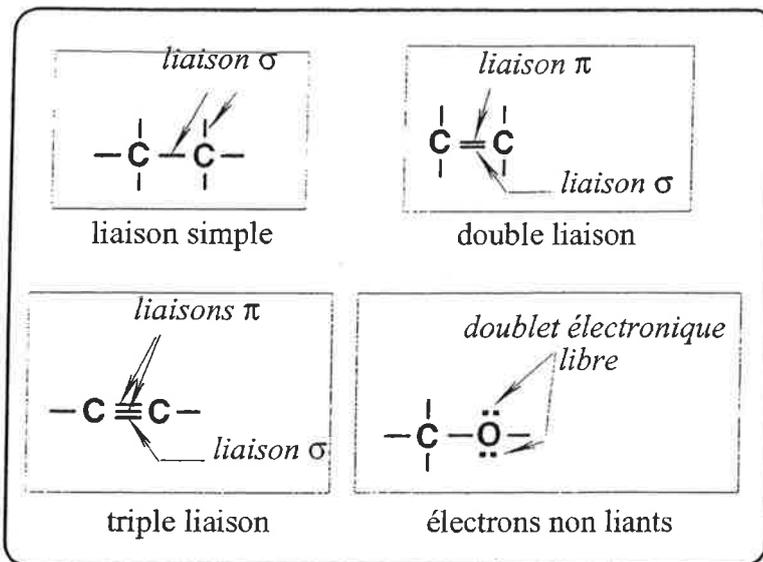


Figure II.4 : Les liaisons chimiques

domaines (UV et Visible), et de savoir jusqu'où l'exploitation du domaine UV est possible. Nous décrivons ensuite les différentes méthodes existantes de caractérisation des colorants. Enfin nous présentons les analyses spectrométriques réalisées ainsi que l'exploitation mathématique des spectres obtenus avec les colorants modèles formés.

3.1 PRINCIPE DE LA SPECTROMETRIE UV-VISIBLE ET MESURE DES SPECTRES

Les molécules sont liées entre elles dans la nature par des liaisons électroniques simples (liaison " σ "), doubles (une liaison " σ " et une liaison " π ") ou triples (une liaison " σ " et deux liaisons " π "). Elles peuvent également posséder un ou plusieurs doublets électroniques libres " n ". Ces derniers n'interviennent pas dans les liaisons entre atomes d'où leur nom d'électrons non liants (**figure II.4**). Dans le cas de l'existence de plusieurs doubles liaisons dans une molécule, ces dernières sont parfois conjuguées (les liaisons doubles s'alternent avec les liaisons simples). C'est le cas de certains composés aromatiques comme le benzène (Arnaud 1979 ; Hamon *et al.*, 1990 ; Rouessac et Rouessac 1998).

Lorsqu'une molécule reçoit un rayonnement ultraviolet ou visible et qu'elle peut l'absorber, son énergie interne augmente en tant qu'énergie électronique. L'absorption du rayonnement a alors pour effet de faire passer les électrons de l'état fondamental " σ ", " π " ou " n ", à un état excité, σ^* ou π^* (Hamon *et al.*, 1990). La limite exacte entre l'UV et le Visible n'est pas clairement définie. Elle varie selon les auteurs entre 340 nm et 400 nm. Nous avons fixé cette limite à 390 nm car c'est la valeur que l'on a le plus souvent rencontrée dans la littérature. Dans le domaine de l'Ultraviolet lointain (130 nm à 220 nm), l'absorbance des molécules ne permet pas de les distinguer. En effet, toutes les molécules (hydrocarbures saturés et insaturés, oxygène, CO₂, verre, quartz ... etc....) absorbent en même temps. Dans le domaine du proche UV (220 nm à 390 nm), la conjugaison induit un effet bathochrome (déplacement du maximum d'absorbance vers des longueurs d'ondes de plus en plus grandes). L'importance de cet effet permet, dans certains cas, de distinguer les molécules selon leur degré d'insaturation.

Si le nombre de doubles liaisons est suffisant, l'absorption se fait aussi dans le visible et la solution devient visiblement colorée.

Ainsi, même si la spectrométrie UV-Visible ne permet pas l'identification des molécules dans un mélange, elle donne des renseignements concernant le degré d'insaturation des molécules et permet une distinction des colorants selon leurs maximums d'absorbance à condition qu'ils soient analysés séparément. Si on veut distinguer les colorants dans les mélanges, cette méthode peut être utile si elle est couplée à d'autres paramètres de distinction. Comme nous le verrons plus bas, la variation du pH pour la mesure des spectres ou l'exploitation de ces derniers par des méthodes mathématiques peuvent en effet être des méthodes utiles pour différencier les colorants.

3.2 METHODES SPECTROMETRIQUES EXISTANTES DE CARACTERISATION DES COLORANTS DE FABRICATION

3.2.1 MESURE DE LA COLORATION GLOBALE SELON LA METHODE ICUMSA

La coloration (COL) selon la méthode ICUMSA (Icumsa 1994), se déduit de la mesure de l'absorbance à 420 nm d'une solution ajustée à pH 7 et préfiltrée avec une membrane de 0,45 μm :

$$\text{COL} = \frac{1000 \cdot \text{Abs}_{420\text{nm}} \cdot 100}{\text{Brix}_{\text{vol}} \cdot l} \quad (\text{II.1})$$

- $\text{Abs}_{420\text{nm}}$: absorbance à 420 nm
- l : longueur de la cuve (cm)
- Brix_{vol} : brix volumique (gMS / 100 mL)

Les résultats sont exprimés en Unité ICUMSA (UI)

Cette méthode est largement utilisée dans toutes les sucreries pour évaluer les colorations des jus, des sirops et même du sucre blanc. Elle ne permet cependant qu'une mesure globale de

Tableau II.1 : Quelques indices de valeurs de colorants selon deux auteurs

| Colorant | Indice de valeur | |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------------|
| | (Godshall <i>et al.</i>, 1987) | (Eggleston 1998) |
| Mélanoïdines | 1,0-1,2 | 1,08 |
| Caramels | 1,0-1,5 | 1,23 |
| PDAH | 1,5-3,0 | 2,26-2,42 |

l'intensité de coloration sans quantification. De plus cette méthode n'est pas très précise puisqu'elle ne tient pas compte de toute la coloration d'une solution. En effet elle nécessite une préfiltration des solutions avec une membrane de 0,45 μm , alors que Godshall *et al.*, (1987) ont montré que des colorants sont retenus avec ce seuil de coupure.

3.2.2 COMPARAISON DES MAXIMUMS D'ABSORBANCE DES COLORANTS

Cosmeur (1999) a synthétisé les colorants de fabrication individuellement et a mesuré leurs spectres dans l'UV. Il a trouvé que ces colorants ont des pics d'absorbance différents. Pour les caramels, il a constaté trois pics à 285 nm (maximum), 220 et 200 nm, pour les mélanoidines, deux pics à 300 et 200 nm et pour les PDAH un pic à 260 nm. Kelly et Brown (1978) mentionnent également 285 nm comme maximum d'absorbance pour les caramels. Cheftel et Cheftel (1980) donnent aussi un maximum d'absorbance à 300 nm pour les mélanoidines, alors que de Bruijn *et al.*, (1986) le situent à 265 nm pour les PDAH.

3.2.3 INDICE DE VALEUR (IV)

Pour différencier les colorants, Godshall *et al.*, (1987) et Eggleston (1998) utilisent l'indice de valeur (Indicator Value). Il s'agit du rapport de l'absorbance à 420 nm de la solution à un pH de 9 sur l'absorbance de la même solution à un pH de 4. La spectrométrie est ici couplée au paramètre pH, qui, d'après ces auteurs, a une influence notable sur l'absorbance de ces colorants. L'indice de valeur est toujours supérieur à 1. D'après ces auteurs, les colorants issus de la dégradation des sucres ont un faible indice de valeur, avec toutefois une valeur plus élevée pour les PDAH que pour les mélanoidines (**tableau II.1**), alors que celui des pigments de la plante, de nature phénolique, est élevé (5 à 14 pour les flavonoïdes).

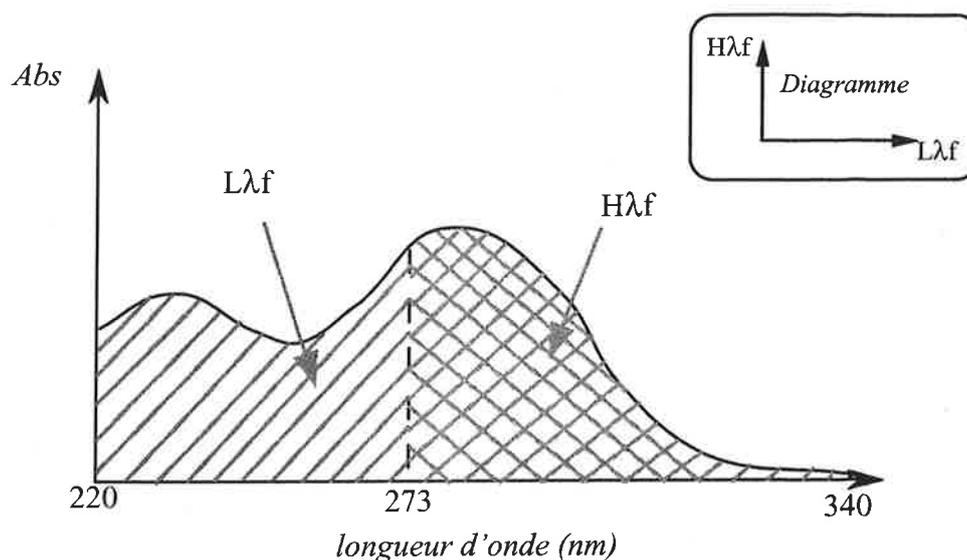


Figure II.5 Représentation schématique de la méthode du diagramme Hλf en fonction de Lλf

Tableau II.2 : Caractéristiques spectrométriques des différents colorants de fabrication

| Colorants | Composition chimique | Pics d'absorbance | Indice de valeur (IV) | Hλf ⁽⁶⁾ | Lλf ⁽⁶⁾ |
|--------------|--|--|------------------------|--------------------|--------------------|
| Mélanoïdines | polymères d'HMF, de réductones et autres | 300 nm ^{(2) (5)} 200 nm ⁽⁵⁾ | 1 à 1,2 ⁽⁴⁾ | 0,93 | 1,20 |
| Caramels | polymères d'HMF | 285 nm ^{(1) (5)} 220 nm et 200 nm ⁽⁵⁾ | 1 à 1,5 ⁽⁴⁾ | 0,48 | 0,34 |
| PDAH | polymères d'acides carboxyliques | 265 nm à pH 7 ⁽³⁾ 260 nm ⁽⁵⁾ | 1,5 à 3 ⁽⁴⁾ | 0,57 | 1,06 |

(1):(Kelly et Brown 1978); (2):(Cheftel et Cheftel 1980); (3):(de Bruijn *et al.*, 1986);
 (4):(Godshall 1997); (5):(Cosmeur 1999); (6): (Bento 1995)

3.2.4 METHODE DU DIAGRAMME H λ f EN FONCTION DE L λ f

En 1995, Bento (1995) a proposé une méthode de calcul mathématique pour distinguer les colorants de fabrication. Cette méthode est basée sur l'exploitation des spectres UV de ces colorants. Elle consiste à définir une fraction aux hautes longueurs d'onde (H λ f) et une fraction aux basses longueurs d'onde (L λ f) comme suit (**figure II.5**) :

$$L\lambda f \text{ ou } H\lambda f = \frac{C}{Abs_0} \quad (\text{II.2})$$

$$\text{où } C = \frac{\int_{\lambda_1}^{\lambda_2} Abs \cdot d\lambda}{(\lambda_2 - \lambda_1)} \quad (\text{II.3})$$

- λ_1 et λ_2 respectivement égales à 220 nm et 273 nm pour L λ f
- λ_1 et λ_2 respectivement égales à 273 nm et 340 nm pour H λ f
- Abs représente l'absorbance obtenue aux différentes longueurs d'onde
- Abs₀ représente l'absorbance obtenue à $\lambda = 273$ nm

Le rapport C représente la moyenne des différentes absorbances entre les deux longueurs d'onde correspondantes. Les fractions L λ f et H λ f illustrent en quelque sorte une comparaison entre cette moyenne et l'absorbance à 273 nm. Cette longueur d'onde de 273 nm a été choisie parmi toute la gamme car elle donne la plus grande différence entre les colorants étudiés. La méthode consiste ensuite à construire un diagramme H λ f en fonction de L λ f et de placer les colorants, selon leurs coordonnées (H λ f et L λ f) respectives. Il est ainsi possible de différencier les caramels, les mélanoidines et les PDAH par leurs positions distinctes sur le diagramme.

Les caractéristiques des colorants sont rassemblées dans le **tableau II.2**. Nous avons, dans ce qui suit, procédé à ces différentes analyses sur les colorants que nous avons préparés, puis nous avons exploité les résultats obtenus par des méthodes statistiques.

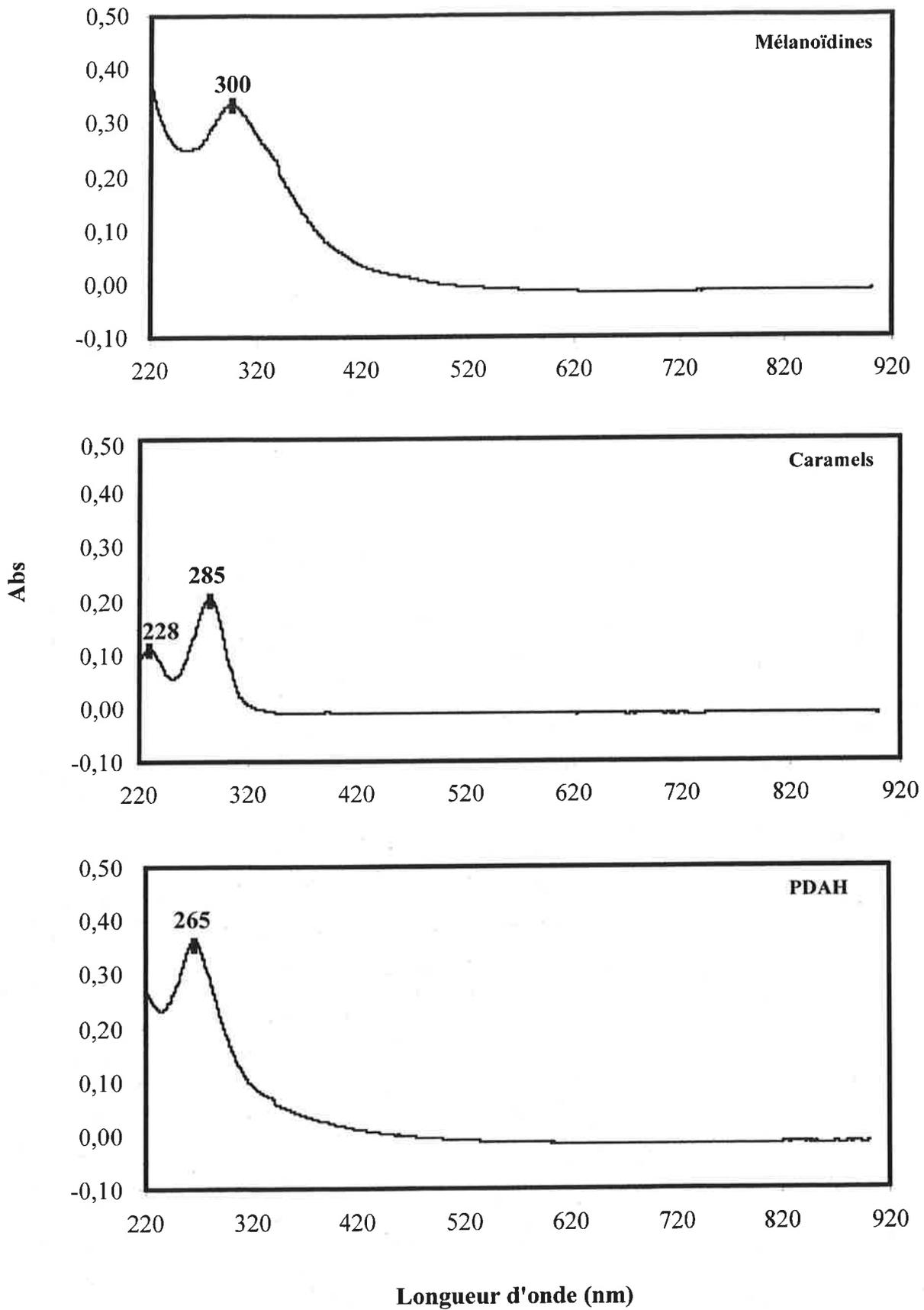


Figure II.6 : Spectres UV-Visible, à pH 7, des colorants de fabrication préparés

3.3 CARACTERISTIQUES SPECTROMETRIQUES DES COLORANTS MODELES FORMES

3.3.1 ANALYSES DES SPECTRES

Toutes les mesures de spectres dans l'UV et dans le Visible ont été faites avec un spectromètre UV-VIS de type Jasco V550 SSE-343 (précision 0,02 unité d'absorbance). Nous avons mesuré les spectres des colorants dilués de manière à avoir des absorbances comprises entre 0 et 1 dans chacun des domaines UV (220 – 390 nm) et Visible (390 – 900 nm) séparément. Pour les spectres dans l'UV, les solutions de caramels et de PDAH ont été diluées 500 fois alors que celle des mélanoidines a été diluée 1000 fois. Pour les spectres dans le visible, la solution de caramels a été diluée 5 fois, celle des PDAH 50 fois et celle des mélanoidines 100 fois. Pour évaluer l'influence du pH sur l'absorbance de ces colorants, les pH ont été ajustés à 7, 4 et 9 pour chaque type, par ajout d'acide ou de base, puis les mesures de spectres ont été effectuées dans l'UV et dans le Visible. Le pH-mètre utilisé est un pH-mètre de type WTW pH330/SET, avec électrode combinée pH température (précisions 0,05 unité pH). Les précautions nécessaires ont été prises pour diluer les échantillons, exactement de la même manière, lors de l'ajustement du pH. Chaque analyse a été répétée au moins à trois reprises afin de bien s'assurer de la reproductibilité des résultats.

3.3.2 RESULTATS OBTENUS

Les spectres dans l'UV (220 à 390 nm) à pH 7 des colorants préparés ont été prolongés dans le visible jusqu'à 900 nm et présentés en **figure II.6**. Pour les trois types de colorants, l'absorbance dans le visible, notamment à 420 nm, est négligeable, à même dilution, par rapport à l'absorbance dans l'UV. Les spectres des trois caramels (1 2 et 3) préparés à 130°C sont superposés, ainsi que ceux des trois mélanoidines (1 2 et 3) et ceux des trois PDAH (1 2 et 3), ce qui confirme que la méthode de préparation mise au point, est reproductible pour

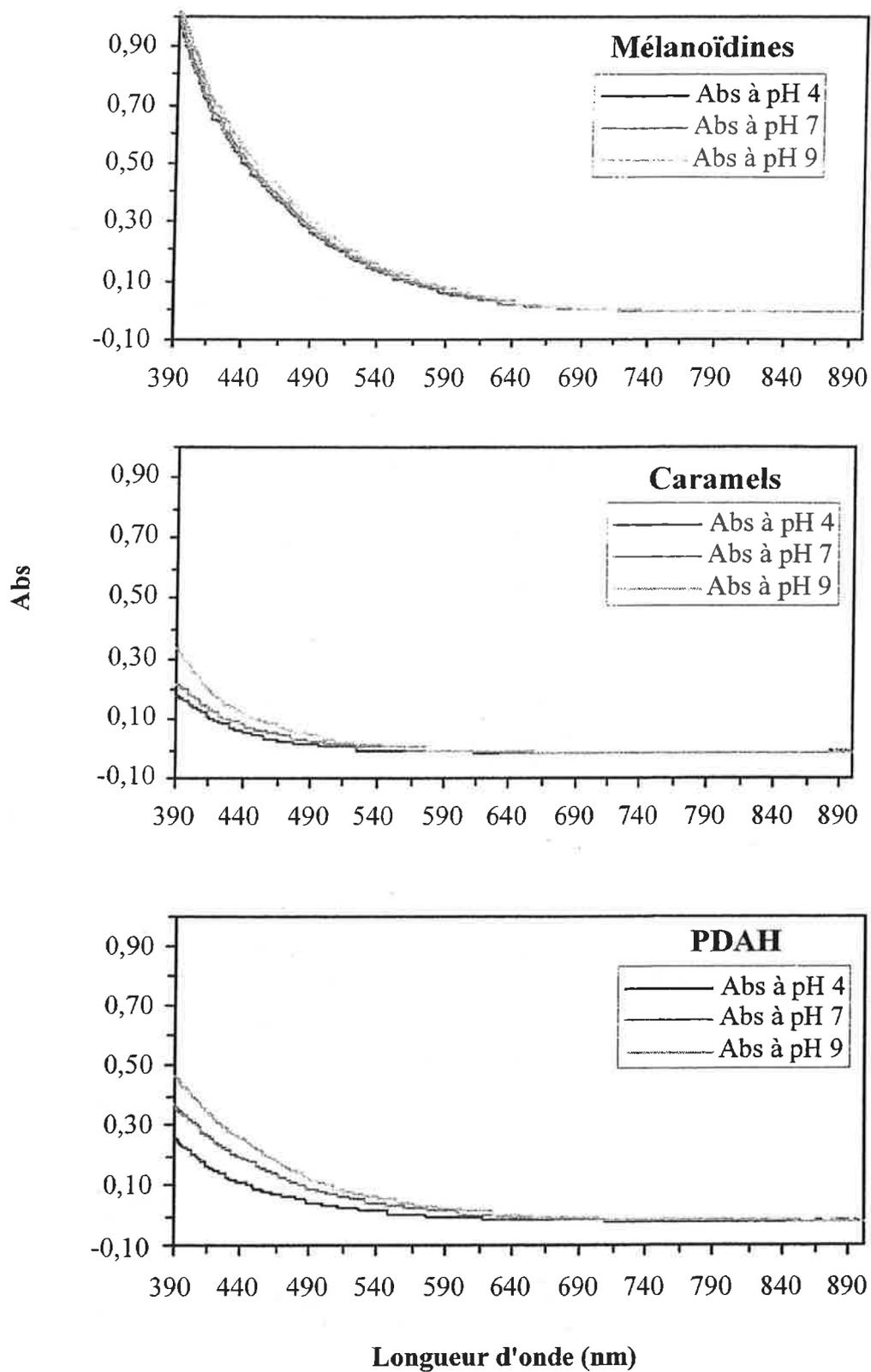


Figure II.7 : Influence du pH sur les spectres du visible des colorants de fabrication préparés

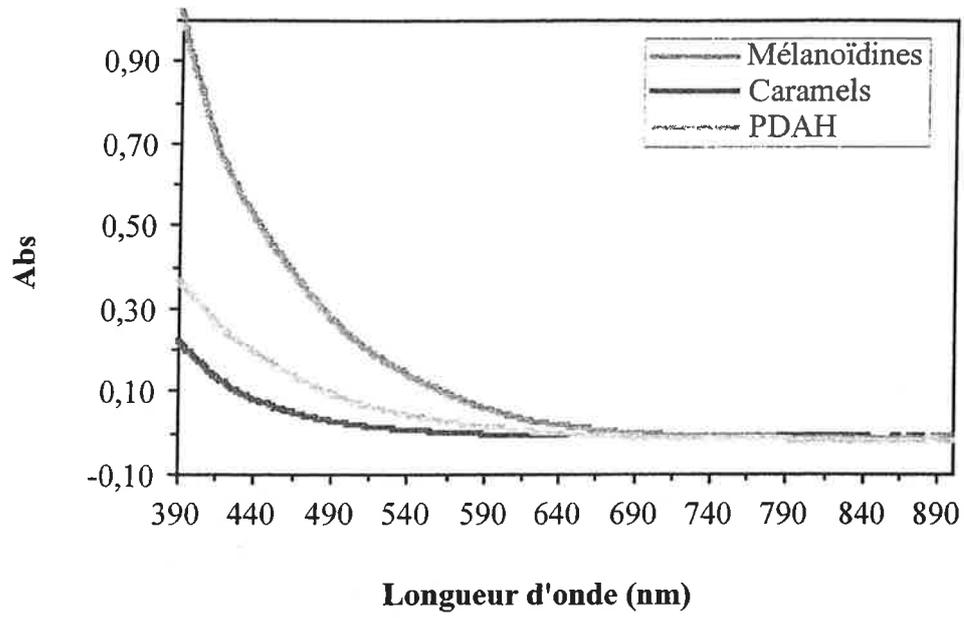


Figure II.8 : Comparaison de l'allure des spectres dans le visible et à pH 7, des trois colorants préparés

ces trois colorants. Les résultats obtenus dans chacun des domaines sont présentés ci-dessous, ainsi que ceux, obtenus avec la méthode du diagramme H λ f en fonction de L λ f.

3.3.2.1 Spectres du visible

Dans le visible (**figure II.7**), une augmentation du pH induit une augmentation significative de l'intensité d'absorbance des caramels et des PDAH entre 390 et 500 nm. Cette influence est nettement moins importante en ce qui concerne les mélanoidines. D'ailleurs, les indices de valeur des PDAH (1 2 et 3) sont les plus élevés (entre 2,13 et 2,26), suivis de près par ceux des caramels (1 2 et 3) (entre 1,78 et 2,00), puis nettement plus faibles, ceux des mélanoidines (1 2 et 3) (entre 1,08 et 1,09). Ces valeurs sont bien en accord avec celles, mentionnées par Godshall (1997) et Eggleston (1998) (**tableau II.2**), avec toutefois pour le cas des caramels, des valeurs légèrement supérieures aux leurs (1 à 1,5).

En observant la superposition des spectres, dans le visible, des trois colorants à pH 7 (**figure II.8**), on constate que les allures sont quasiment identiques. Ainsi, à part l'influence indiscutable du pH sur l'intensité d'absorbance, il est très difficile de distinguer un colorant d'un autre par simple comparaison de ces spectres. De plus, même si cette influence du pH existe, les indices de valeur ne diffèrent pas beaucoup d'un colorant à l'autre. La mesure de l'indice de valeur est surtout intéressante pour distinguer les colorants de fabrication, des colorants naturels. Ces derniers sont en effet très sensibles au pH par rapport aux colorants de fabrication (un IV de 5 à 14 pour les flavonoïdes contre un IV de 1 à 3 pour les colorants de fabrication). D'ailleurs, Godshall (1997) a pu ainsi montrer que les colorants naturels issus de la plante sont généralement plus facilement éliminés au raffinage que ceux de fabrication. En effet, l'indice de valeur des sucres roux baisse considérablement après raffinage Godshall (1997).

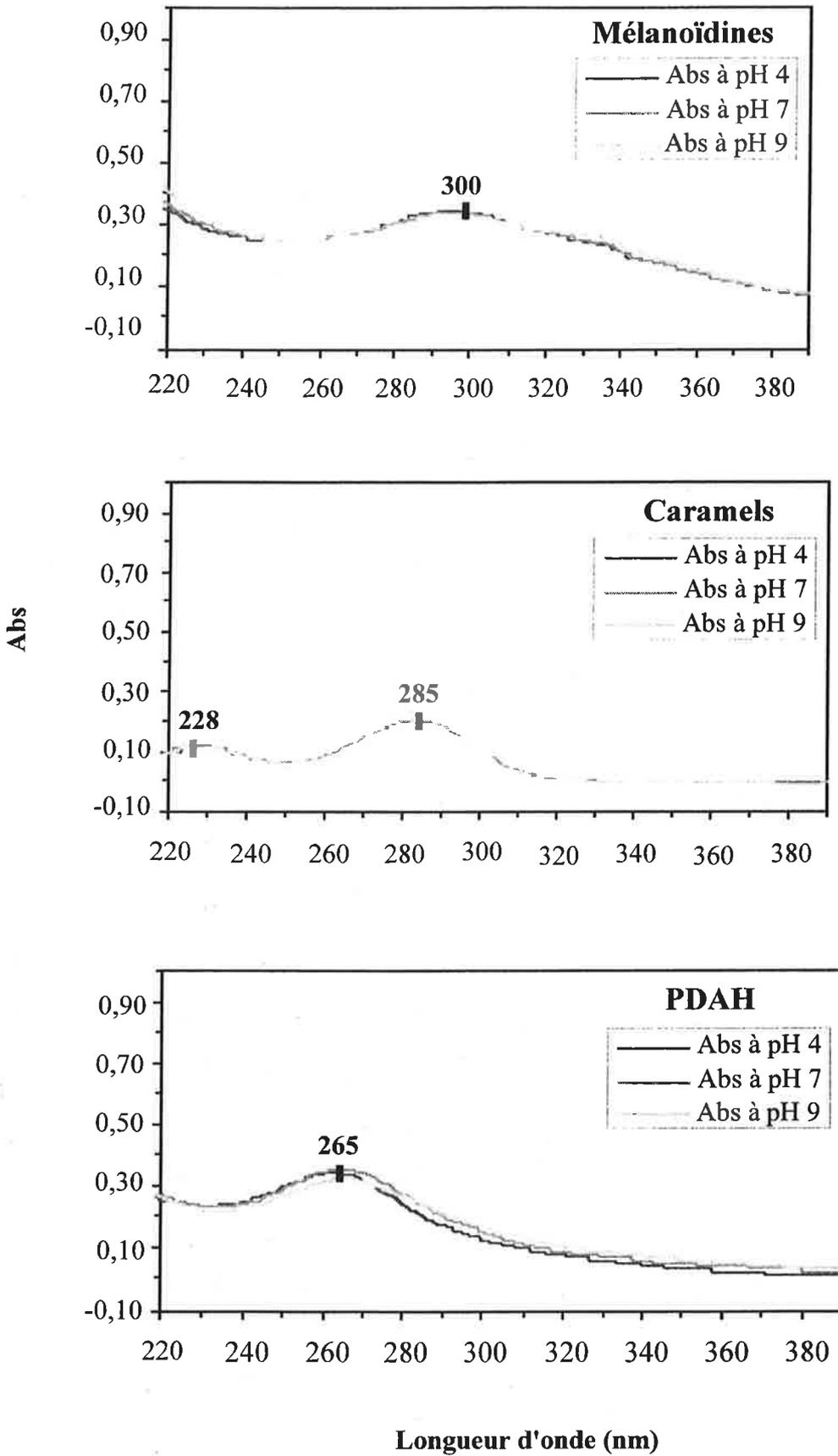


Figure II.9: Influence du pH sur les spectres UV des colorants de fabrication préparés

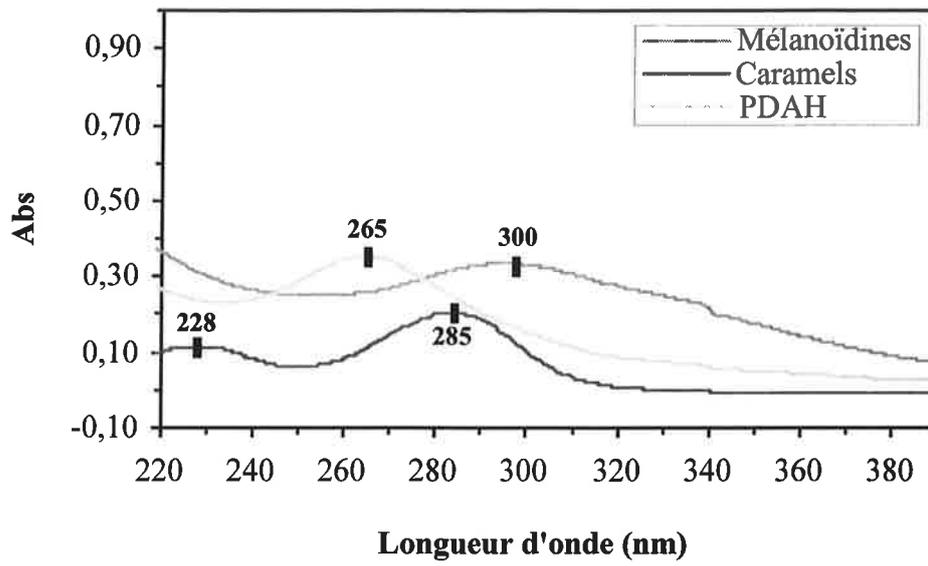


Figure II.10 : Comparaison de l'allure des spectres dans l'UV et à pH 7, des trois colorants préparés

3.3.2.2 Spectres de l'UV

Dans l'UV, nous n'observons aucune influence du pH sur les spectres des trois colorants (**figure II.9**). Ils présentent pratiquement les mêmes maximums d'absorbance que dans la littérature. Pour les mélanoidines, il se situe vers les 300 nm où l'on note la présence d'un plateau qui s'étend entre 295 et 300 nm. Pour le caramel, il se situe vers 285 nm avec un deuxième pic vers 228 nm, alors que pour les PDAH, il se situe vers 265 nm. On note également pour les mélanoidines et les PDAH, la présence d'un petit épaulement vers les 340 nm, absent dans le cas des caramels. Sans connaître précisément la composition des colorants formés, on peut penser, d'après le principe de l'absorbance dans le proche UV (Hamon *et al.*, 1990), que les PDAH contiennent moins de doubles liaisons conjuguées que les caramels qui, à leur tour, en contiennent moins que les mélanoidines.

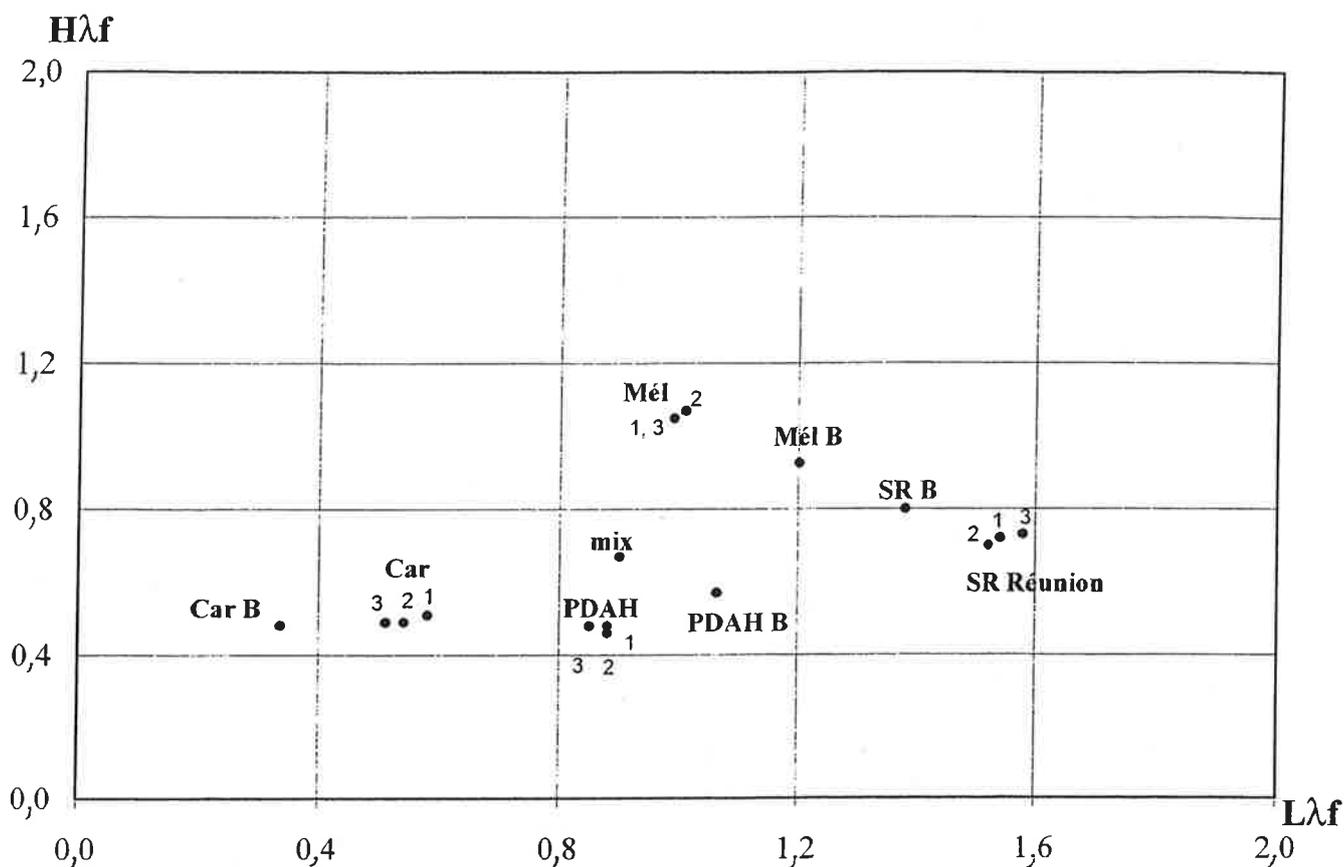
En observant les spectres des trois colorants superposés dans le domaine de l'UV **figure II.10**, on note que ces spectres s'entrecroisent et que les allures diffèrent d'un colorant à un autre. Les maximums d'absorbance sont également bien décalés d'un colorant à l'autre. Ces différences de spectres nous ont amenés à examiner plus précisément la méthode du diagramme $H\lambda f$ en fonction de $L\lambda f$, proposée par Bento (1995) et citée plus haut.

3.3.3 EXPLOITATIONS MATHÉMATIQUES DES SPECTRES DES COLORANTS OBTENUS

3.3.3.1 Application de la méthode du diagramme $H\lambda f$ en fonction de $L\lambda f$

La **figure II.11** représente le diagramme $H\lambda f$ en fonction de $L\lambda f$, avec présentation des composés suivants :

- les trois mélanoidines (1 2 et 3) que nous avons préparées et analysées, ainsi que celles, analysées par Bento (1995)
- les trois caramels (1 2 et 3) que nous avons préparés et analysés, ainsi que ceux, analysés par Bento (1995)



Car B : Caramels préparés par (Bento, 1995)
 Car 1, 2 et 3 : Caramels que nous avons préparés
 Mél B : Mélanoïdines préparées par (Bento, 1995)
 Mél 1, 2 et 3 : Mélanoïdines que nous avons préparées
 PDAH B : PDAH préparés par (Bento, 1995)
 PDAH 1, 2 et 3 : PDAH que nous avons préparés
 mix : Mélange des trois colorants Car 1, Mél 1 et PDAH 1
 SR B : Sucre roux analysé par (Bento, 1995)
 SR Réunion 1, 2 et 3 : Sucre roux lot 15 provenant de la Réunion analysé trois fois

Figure II.11 : Disposition des colorants de fabrication et d'un sucre roux sur le diagramme Hλf en fonction de Lλf mis au point par (Bento, 1995)

- les trois PDAH (1 2 et 3) que nous avons préparés et analysés, ainsi que ceux, analysés par Bento (1995)
- un mélange (mix) que nous avons préparé en mélangeant une quantité identique en volume des trois colorants préparés (caramels 1, mélanoidines 1 et PDAH 1) tels qu'ils ont été conservés.
- du sucre roux (1 2 et 3) provenant de la Réunion (lot 15) que nous avons analysé trois fois, ainsi qu'un sucre roux analysé par Bento (1995)

Les valeurs des $H\lambda f$ et $L\lambda f$, de ces différents composés sont données dans le **tableau II.3**.

Les colorants que nous avons préparés et ceux, préparés par Bento (1995) sont distincts mais pas très éloignés. Ceci indique que selon la méthode de préparation des colorants de fabrication, on aboutit à des produits non identiques mais pas complètement différents d'autant plus que les allures des spectres de nos colorants sont proches des siennes. Les positions des sucres roux sont également proches. En ce qui concerne les colorants que nous avons préparés et analysés, on constate que les trois caramels forment un groupe homogène distinct des mélanoidines et des PDAH. Ces deux derniers types forment, chacun à leur tour, un groupe homogène. Le mélange des trois colorants se situe au centre des trois groupes de colorants, quoiqu'un peu plus proche des mélanoidines et des PDAH que des caramels. Ces résultats confirment que les méthodes mises au point pour la préparation de ces colorants sont reproductibles. De plus ces résultats montrent que cette méthode est capable de bien distinguer les composés différents. En revanche, l'ennui est que la moyenne C calculée par l'équation (II.3) peut être identique pour deux composés qui n'ont pas du tout les mêmes spectres. Ceci implique que deux composés ayant des spectres différents peuvent avoir les mêmes coordonnées sur le diagramme $H\lambda f$ en fonction de $L\lambda f$. Par conséquent, certains composés devant être distingués les uns des autres ne le sont pas. De plus, le choix de 273 nm comme longueur d'onde, limite entre les hautes longueurs d'onde et les basses longueurs d'onde dans le domaine UV, est complètement arbitraire. Nous avons donc pensé à utiliser une méthode statistique plus générale, qui compare les individus en tenant compte de toutes

Tableau II.3 : Les valeurs des L λ f et H λ f des colorants de fabrication et des sucres roux analysés par [BENTO, 1995 #1325] et analysés par l'ENSIA.

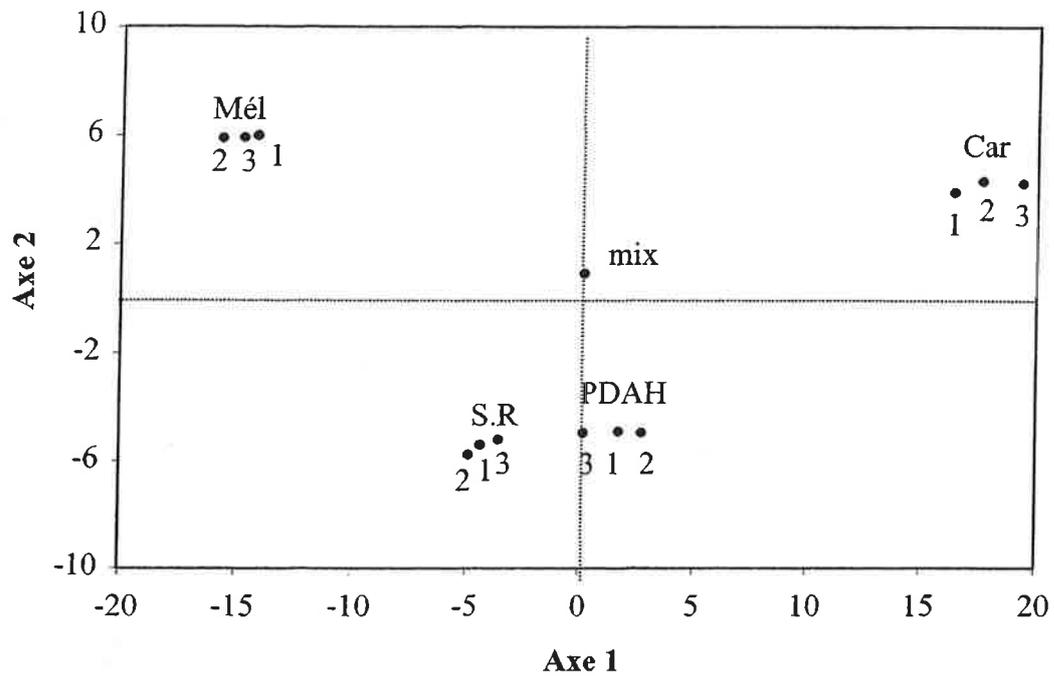
| Composés | H λ f | L λ f |
|---|---------------|---------------|
| Mélanoïdines analysées par Bento (1995) | 0,93 | 1,20 |
| Caramels analysés par Bento (1995) | 0,48 | 0,34 |
| PDAH analysées par Bento (1995) | 0,57 | 1,06 |
| Sucre roux analysé par Bento (1995) | 0,80 | 1,38 |
| Mélanoïdines 1 que nous avons préparées | 1,05 | 0,99 |
| Mélanoïdines 2 que nous avons préparées | 1,07 | 1,01 |
| Mélanoïdines 3 que nous avons préparées | 1,05 | 0,99 |
| Caramels 1 que nous avons préparés | 0,51 | 0,58 |
| Caramels 2 que nous avons préparés | 0,49 | 0,54 |
| Caramels 3 que nous avons préparés | 0,49 | 0,51 |
| PDAH 1 que nous avons préparés | 0,48 | 0,88 |
| PDAH 2 que nous avons préparés | 0,46 | 0,88 |
| PDAH 3 que nous avons préparés | 0,48 | 0,85 |
| Sucre roux 1 que nous avons analysé | 0,72 | 1,54 |
| Sucre roux 2 que nous avons analysé | 0,70 | 1,52 |
| Sucre roux 3 que nous avons analysé | 0,73 | 1,58 |

les longueurs d'onde du spectre UV avec la même importance. Cette méthode est l'analyse en composantes principales (ACP).

3.3.3.2 Méthode d'analyse en composantes principales (ACP)

Cette méthode statistique a pour objet d'analyser des données contenues dans un tableau sous la forme d'une matrice, dans le but de distinguer certains composés qu'on appelle individus (Saporta 1990 ; Bouroche et Saporta 1992). Ces individus ont une spécificité qui se présente sous la forme de caractères numériques qui vont constituer la matrice de calcul. Nous avons appliqué une ACP sur les mêmes individus que ceux présentés sur le diagramme H λ f en fonction de L λ f plus haut, à l'exception des composés analysés par Bento (1995) dont nous n'avons pas les données des spectres. Dans notre cas, les caractères représentent les absorbances de ces individus à chaque longueur d'onde (nanomètre par nanomètre), dans le domaine de l'UV (entre 220 et 390 nm). Les calculs ont été réalisés avec le logiciel « SPAD 3.1 » spécifique aux traitements des données statistiques.

Nous avons projeté ces individus sur le plan que constituent les deux premiers axes principaux. Ce plan réunit 91 % de l'information totale initiale (76 % sur l'axe 1 et 15 % sur l'axe 2). La **figure II.12** représente les projections des colorants et du sucre roux sur le plan en question. Il est intéressant de constater la distinction de cinq groupes d'individus sur ce plan. Le groupe des caramels, celui des mélanoidines, celui des PDAH, celui du mélange (mix) et enfin, celui du sucre roux. La présence de ces groupes homogènes confirme, encore une fois, que les méthodes mises au point pour la préparation de ces colorants sont reproductibles. De plus ces résultats montrent la capacité de la méthode ACP à rassembler les composés semblables et à distinguer les composés différents. On constate également que le mélange des trois colorants (mix) est situé pratiquement au centre de ceux-ci quoiqu'un peu plus proche des PDAH. Si on observe la position du sucre roux, on constate qu'elle est pratiquement confondue avec celle des PDAH selon l'axe 1 et qu'elle en est très proche selon l'axe 2, ce qui n'est pas le cas vis à vis des deux autres colorants. Ceci indique



Car 1, 2 et 3 : Caramels que nous avons préparés
Mél 1, 2 et 3 : Mélanoidines que nous avons préparées
PDAH 1, 2 et 3 : PDAH que nous avons préparés
mix : Mélange des trois colorants Car 1, Mél 1 et PDAH 1
S.R. : Sucre roux, lot 15 provenant de la Réunion, analysé trois fois

**Figure II.12 : ACP des colorants de fabrication préparés et d'un sucre roux.
Présentation sur deux axes principaux**

que la composition du sucre roux s'apparente plus aux PDAH qu'aux mélanoidines et aux caramels. Ceci correspondrait bien à l'analyse bibliographique précédente, sur la formation des colorants et le lien avec les étapes de sucrerie.

L'intérêt de la méthode ACP par rapport à la méthode de Bento (1995), est qu'elle ne nécessite pas de choix arbitraire d'une longueur d'onde qui sépare les H λ f des L λ f. Elle tient compte des absorbances à toutes les longueurs d'onde du spectre UV de manière équivalente. De ce fait, si deux individus sont différents par leurs spectres, ils seront forcément distingués. Nous avons voulu confirmer les résultats obtenus par ACP, et en particulier celui du rapprochement entre le sucre roux et les PDAH. Nous avons utilisé pour cela une méthode de classification hiérarchique ascendante qui est la méthode de Ward (voisins réciproques).

3.3.3.3 Méthodes de classification hiérarchique (méthode de Ward)

Cette méthode est différente, mais complémentaire de l'ACP. Elle consiste à construire un arbre de classification de manière ascendante. On regroupe d'abord, parmi les n individus, les deux plus proches qui forment un « sommet », il ne reste plus que n-1 individus. On itère alors le processus jusqu'à regroupement complet (Saporta 1990). La mesure de dissimilarités entre parties est basée, dans la méthode de Ward, sur la mesure des distances euclidiennes. On considère les individus comme des points constituant un nuage dans l'espace. Les coordonnées de ces individus dans l'espace sont, dans notre cas, leurs absorbances à chaque longueur d'onde de l'UV (entre 220 et 390 nm). On agrège ensuite les individus qui font le moins varier l'inertie intraclasse. En d'autres termes, on cherche à obtenir à chaque pas un minimum local de l'inertie intraclasse ou un maximum de l'inertie interclasse (moyenne des carrés des distances des centres de classes au centre de gravité total du nuage). Nous avons appliqué cette méthode sur les mêmes individus traités en ACP et nous avons obtenu l'arbre de classification présenté en **figure II.13**. Le logiciel de calcul utilisé est toujours SPAD 3.1.

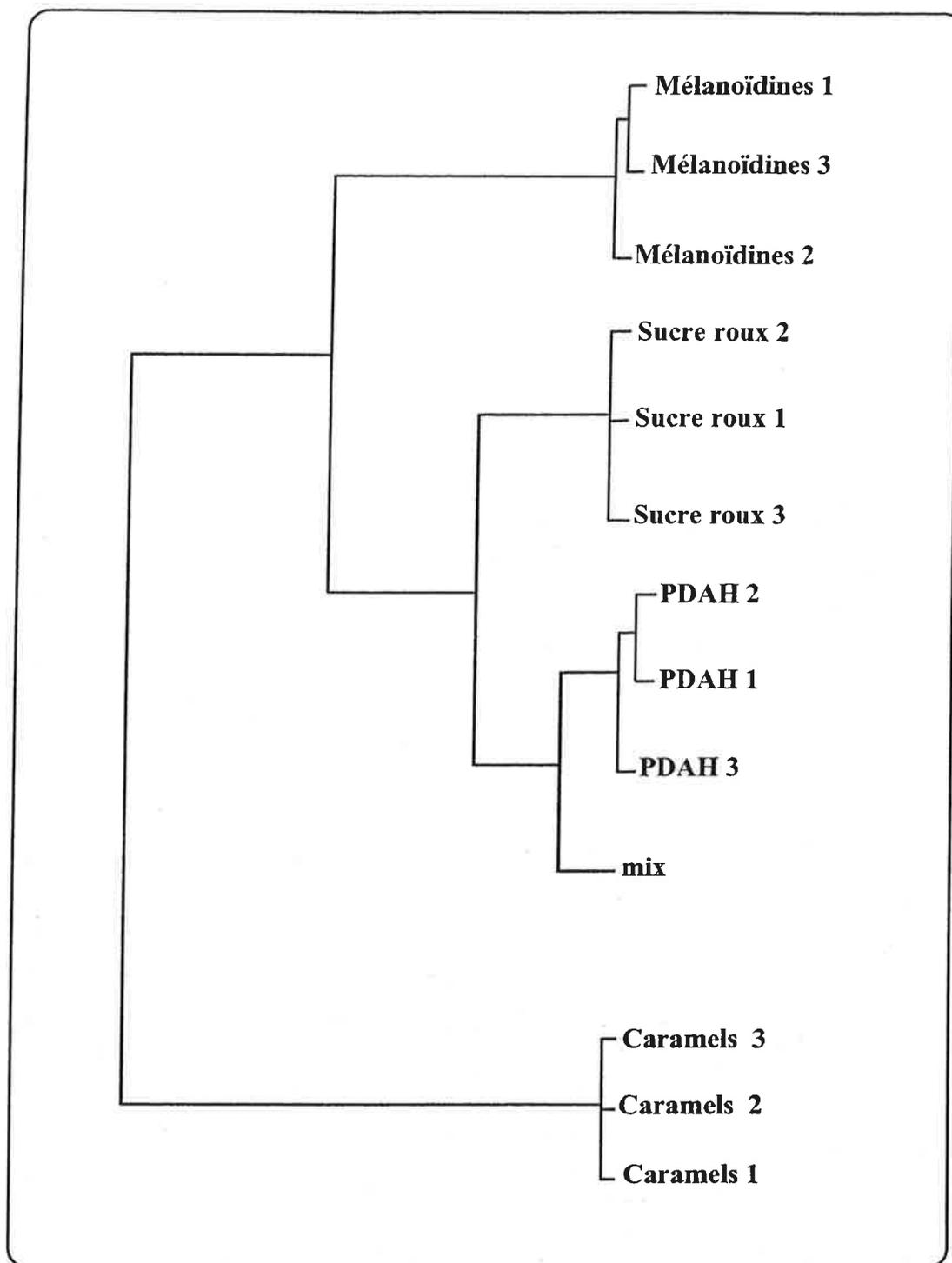


Figure II.13 : Arbre de classification hiérarchique des colorants de fabrication et du sucre roux, selon la méthode de Ward

Cette classification rejoint bien la méthode ACP. Elle regroupe, en effet, les trois échantillons du sucres roux avec les PDAH, comme il a été constaté en ACP. On constate également en ACP (**figure II.12**), que les mélanoidines 1 et 3, sont plus rapprochées entre elles qu'avec les mélanoidines 2. Ceci est représenté, dans la classification hiérarchique (**figure II.13**), par un sous-groupe des mélanoidines 1 et 3, dans le groupe des trois mélanoidines. La même remarque est à faire concernant les PDAH 1 et 2.

Par ailleurs, dans la classification hiérarchique, les caramels sont isolés en une classe à part. Ceci indique qu'ils se rapprochent beaucoup moins du sucre roux que ne s'en rapprochent les mélanoidines, qui sont, à leur tour, moins proches du sucre roux que les PDAH. Ces constatations confirment ce qui a été développé plus haut. Les PDAH semblent, effectivement, se former le plus en sucrerie, suivis par les mélanoidines, alors que la formation des caramels reste possible mais peu probable. La présence du composé « mix » dans le groupe des PDAH est surprenante puisque ce composé est censé représenter un mélange des trois colorants. Cela dit, le « mix » a été préparé en prélevant un même volume sur les trois colorants tels qu'ils ont été conservés. Or les matières sèches des colorants préparés, n'ont pas été déterminées afin de ne pas modifier leur constitution par un chauffage. La composition du « mix » n'est donc pas répartie équitablement avec les trois colorants ce qui peut expliquer sa position.

4. CONCLUSION

A travers ces résultats, on peut conclure sur plusieurs points. La superposition des spectres des trois caramels préparés à 130°C, des trois mélanoidines et des trois PDAH montre que la méthode de préparation mise au point pour ces colorants, est reproductible

Contrairement au domaine de l'UV, l'influence du pH sur les spectres des colorants dans le visible est notable. Cependant, les indices de valeur ne diffèrent pas beaucoup d'un colorant

de fabrication à un autre. Cette mesure est, en effet, surtout intéressante pour distinguer les colorants de fabrication, des colorants naturels qui ont des IV très élevés.

Les maximums d'absorbance des différents colorants que nous avons préparés sont assez proches de ceux mentionnés dans la littérature. Ceci indique que malgré la complexité des composés formés, il y en a certain, qui absorbent à ces longueurs d'onde spécifiques, et qui se forment, quelle que soit la méthode de préparation utilisée.

Les spectres du visible des colorants de fabrication ont des allures quasiment identiques alors que ceux de l'UV s'entrecroisent et les allures diffèrent d'un colorant à un autre. L'idée d'exploiter les spectres UV pour différencier ces colorants paraît donc intéressante. La méthode ACP que nous avons proposée présente les mêmes avantages que celle de Bento (1995) mais permet en plus une meilleure distinction entre les colorants car elle tient compte des absorbances à toutes les longueurs d'onde de manière équivalente. Nous avons pu constater par la méthode ACP que les PDAH sont très proches du sucre roux et nous avons confirmé ce résultat par une méthode statistique différente mais complémentaire qui est la méthode de Ward de classification hiérarchique. Par ces deux méthodes statistiques, par ce qui se dégage de la bibliographie et par l'étude de la cinétique de formation des colorants, nous considérons que les PDAH ont le plus de chance de se former en sucrerie. Les mélanoidines les suivent de près à condition qu'il y ait assez d'acides aminés et de composés azotés. Quant à la formation des caramels, elle n'est pas impossible, mais reste peu probable.

Chapitre III

MISE AU POINT DE LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE ET ANALYSE DES MASSES MOLAIRES DES COLORANTS DE FABRICATION

| | |
|---|-----------|
| 1. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE ET SON UTILISATION POUR L'ANALYSE DES COLORANTS DE SUCRERIE | 51 |
| 1.1 Définition et principe de la C.E.S. | 51 |
| 1.2 Utilisation de la C.E.S. pour l'analyse des colorants de sucrerie | 53 |
| 1.3 Conclusion | 54 |
| 2. MISE EN PLACE DE LA C.E.S. A L'ENSIA | 55 |
| 2.1 Choix des produits et matériels | 55 |
| 2.1.1 Gel | 55 |
| 2.1.2 Eluant..... | 56 |
| 2.1.3 Etalons | 57 |
| 2.1.4 Détecteurs | 59 |
| 2.1.4.1 Détecteur à barrettes de diodes..... | 59 |
| 2.1.4.2 Réfractomètre différentiel | 60 |
| 2.1.5 Colonne et pompe | 60 |
| 2.1.6 Vanne d'injection..... | 61 |
| 2.1.7 Montage de l'ensemble | 62 |
| 2.2 Détermination des conditions expérimentales | 63 |
| 2.2.1 Température | 63 |
| 2.2.2 Volume d'injection..... | 64 |
| 2.2.3 Limite de détection et gamme de linéarité des détecteurs..... | 64 |
| 2.2.4 Débit | 65 |
| 2.2.5 Volume mort et volume poreux total de la colonne..... | 66 |
| 2.2.6 Efficacité de la colonne | 67 |
| 2.2.7 Préparation des échantillons | 67 |
| 2.2.8 Résumé des conditions opératoires choisies..... | 68 |
| 3. MISE EN EVIDENCE DE PHENOMENES D'INTERACTIONS ET RECHERCHE DE SOLUTIONS | 68 |
| 3.1 Mise en évidence de phénomènes d'interactions entre le gel superose 12 et les colorants | 69 |
| 3.2 Peut-on éliminer ces d'interactions par modification de la phase éluante ? | 70 |
| 3.2.1 Modification de la force ionique..... | 71 |
| 3.2.2 Modification de la polarité | 72 |
| 3.2.3 Etude des interactions moléculaires spécifiques..... | 76 |
| 3.2.4 Conclusion | 79 |

| | |
|---|------------|
| 3.3 Vérification de l'absence d'interactions dans la gamme de fractionnement du gel | 79 |
| 3.3.1 Influence de la concentration des colorants sur leurs temps de rétention dans la gamme de fractionnement du superose 12 | 80 |
| 3.3.1.1 <i>Théorie</i> | 80 |
| 3.3.1.2 <i>Analyses et résultats</i> | 80 |
| 3.3.2 Influence de la température d'analyse sur les temps de rétention des colorants, dans la gamme de fractionnement du Superose 12..... | 83 |
| 3.3.2.1 <i>Théorie</i> | 83 |
| 3.3.2.2 <i>Analyses et résultats</i> | 83 |
| 3.3.3 Conclusion | 84 |
| 3.4 Détermination de la taille des composés présentant des interactions avec le gel par spectrométrie de masse et par chromatographie liquide de haute performance | 85 |
| 3.4.1 Analyses par spectrométrie de masse..... | 85 |
| 3.4.1.1 <i>Principe de la spectrométrie de masse</i> | 86 |
| 3.4.1.2 <i>Analyses réalisées et résultats obtenus</i> | 86 |
| 3.4.2 Confirmation des résultats obtenus en spectrométrie de masse par analyse en CLHP | 89 |
| 3.4.3 Conclusion | 91 |
| 4. ANALYSE DES COLORANTS ET DU SUCRE ROUX PAR C.E.S. | 92 |
| 4.1 Etalonnage de la colonne avec le tétraméthylammonium chlorure comme éluant | 92 |
| 4.2 Masses molaires des colorants de fabrication et du sucre roux | 93 |
| 4.2.1 Résultats obtenus par détection dans l'UV..... | 93 |
| 4.2.2 Résultats obtenus par détection dans le visible..... | 98 |
| 4.2.3 Comparaison des masses molaires que nous avons obtenues avec celles rencontrées dans la littérature..... | 99 |
| 4.2.4 Les colorants contiennent-ils une grande proportion de composés de hautes masses molaires ? | 100 |
| 5. CONCLUSION | 101 |

L'intérêt de la chromatographie d'exclusion stérique (C.E.S.) comme moyen analytique pour l'étude des macromolécules en sucrerie n'est plus à démontrer. Nous avons explicité, à travers la synthèse bibliographique précédente (cf. chapitre I § 3), l'utilité de cette méthode. En effet, c'est grâce à elle que les chercheurs ont découvert que ce sont les colorants de hautes masses molaires qui posent le plus de problèmes en sucrerie. C'est aussi en partie, grâce à cette méthode, qu'ils ont démontré que la filtration tangentielle n'est pas un simple tamisage. Ils ont alors montré que certains composés de très petites masses molaires, sont retenus par des membranes de seuil de coupure beaucoup plus grand en comparaison.

Afin d'évaluer réellement l'intérêt de la filtration tangentielle pour éliminer les colorants de fabrication gênants en cristallisation, nous avons décidé de mettre au point, à l'ENSIA, la technique de chromatographie d'exclusion stérique. Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord la chromatographie d'exclusion stérique et son utilisation actuelle pour analyser les colorants de sucrerie. Nous présentons ensuite toutes les étapes de mise au point de cette technique à l'ENSIA, avec les différentes difficultés rencontrées et les solutions proposées. Enfin, nous analysons les résultats de masses molaires, obtenus avec les colorants de fabrication que nous avons préparés et une refonte de sucre roux.

1. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE ET SON UTILISATION POUR L'ANALYSE DES COLORANTS DE SUCRERIE

1.1 DEFINITION ET PRINCIPE DE LA C.E.S.

La chromatographie d'exclusion stérique est une des méthodes les plus adaptées pour déterminer les masses molaires des grosses molécules (≥ 1000 g/mol) (Pharmacia 1979 ; Strazielle 1984 ; Caude et Jardy 1994 ; Lesec 1994). Cette méthode est basée sur le principe d'exclusion à travers un support poreux. Elle est indirecte et demande un étalonnage préalable de la colonne chromatographique. Bien que le principe de séparation reste fondamentalement le même, on distingue d'après Lesec (1994) :

- La filtration sur gel, pour l'analyse des macromolécules hydrosolubles, où la phase éluante est aqueuse et la phase stationnaire constituée d'un gel réticulé et gonflé en milieu aqueux. Cette technique est née en Suède en 1959.
- La perméation sur gel, pour l'analyse des macromolécules organiques insolubles dans l'eau, utilisant une phase éluante organique peu polaire et un gel de polystyrène réticulé. Cette technique est antérieure à la filtration sur gel de quelques années.

Puisque que le terme général qui désigne cette méthode d'analyse est chromatographie d'exclusion stérique (C.E.S.) nous l'avons retenu pour la suite, tout en précisant à chaque fois la nature des phases stationnaire et éluante utilisées, ainsi que celle des composés à analyser.

La C.E.S. est donc une chromatographie en phase liquide particulière, dans laquelle la phase stationnaire est un gel réticulé poreux, disposé dans la colonne et gonflé par l'éluant. Le principe est basé sur la capacité différente des macromolécules à pénétrer dans les pores de ce gel. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans les pores du gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites molécules entrent dans les pores du gel et se déplacent dans un plus grand volume. Les molécules sont ainsi éluées dans l'ordre

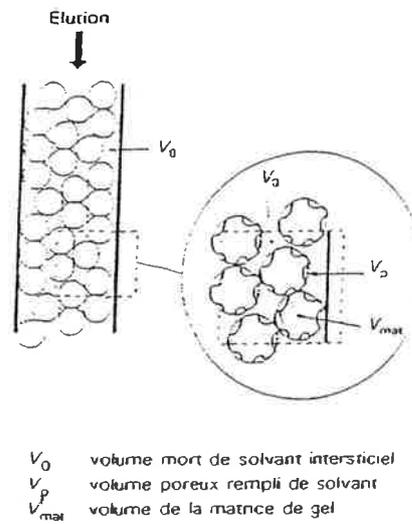


Figure III.1 : Représentation d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique

(Lesc 1994)

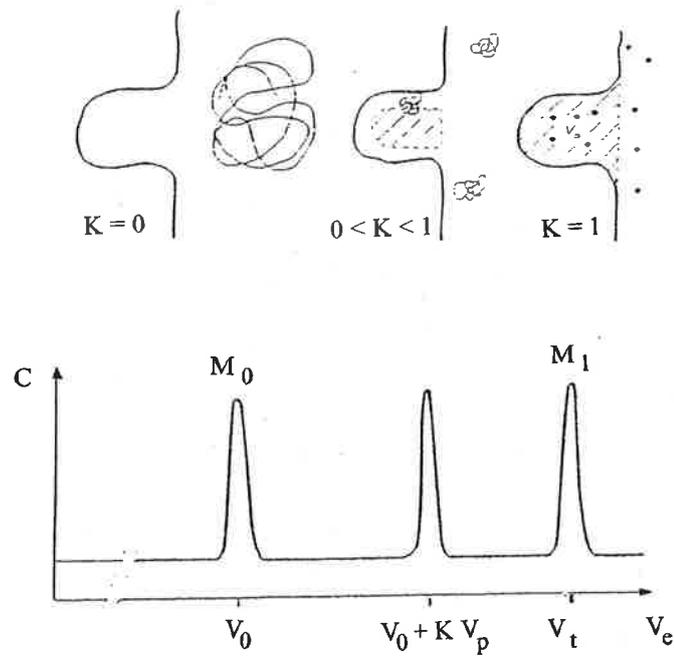


Figure III.2 : Représentation de l'exclusion stérique d'une macromolécule

(Lesc 1994)

des masses molaires décroissantes. Afin de mieux illustrer le principe, nous avons représenté dans la **figure III.1**, une colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Le volume total de la colonne (V_{col}) peut être considéré comme la somme de deux volumes, le volume mort (V_0), correspondant au solvant interstitiel autour des billes de gel, et le volume des billes de gel (V_{gel}). Ce dernier peut à son tour être divisé en deux : le volume de la matrice du gel (V_{mat}) et le volume poreux rempli de solvant (V_p). Ces différents volumes vérifient alors l'équation suivante :

$$V_{col} = V_0 + V_{mat} + V_p \quad (III.1)$$

Quand on considère la rétention des solutés en C.E.S., seul le volume total du solvant qui représente le volume total poreux (V_t) de la colonne ($V_0 + V_p$), doit être pris en considération.

$$V_t = V_0 + V_p \quad (III.2)$$

Soit K la constante représentant le coefficient de partage d'une macromolécule entre l'éluant dans la phase mobile (V_0), et l'éluant dans la phase stationnaire (V_p). Le volume d'élution de cette macromolécule (V_e) peut alors s'écrire :

$$V_e = V_0 + K \cdot V_p \quad (III.3)$$

K varie de zéro pour les grosses molécules exclues du gel (aucun accès aux pores du gel), à l'unité pour les molécules en perméation totale (accès total au volume poreux). Ceci veut dire que tous les solutés, quelles que soient leurs masses molaires, sont élués entre deux volumes V_0 et $V_0 + V_p$. Ces deux volumes doivent être déterminés expérimentalement avant toute analyse sur une colonne de C.E.S..

Supposons que V_0 soit le volume d'élution d'un étalon de masse molaire M_0 et $V_0 + V_p$ le volume d'élution d'un étalon de masse molaire M_1 . La gamme des masses molaires comprises entre M_1 et M_0 est alors appelée « gamme de fractionnement du gel ». Si une molécule est élue à V_0 , sa masse molaire est supérieure ou égale à M_0 et si elle est élue à $V_0 + V_p$, sa masse molaire est inférieure ou égale à M_1 . Nous avons représenté schématiquement les

Tableau III.1 : Masses molaires des colorants de fabrication rencontrées dans la littérature

| Auteurs | Masses molaires des Colorants de fabrication | | |
|------------------------------|---|-------------------|------------------|
| | Mélanoïdines | Caramels | PDAH |
| (Smith 1966) | $\geq 0,7$ kg/mol | $\geq 0,7$ kg/mol | $< 0,7$ kg/mol |
| (Shore <i>et al.</i> , 1984) | 0,3 - 5 kg/mol | 0,1 - 1 kg/mol | 0,1 - 1 kg/mol |
| (Bento et Sa 1998) | 2,5 - 250 kg/mol | 2,5 - 12 kg/mol | 2,5 - 250 kg/mol |

variations du volume d'élution en fonction de la taille des macromolécules dans une colonne de C.E.S. en **figure III.2**.

Il est important de signaler que pour tirer profit de cette propriété de l'exclusion stérique, il faut être très vigilant avec les mécanismes parasites comme l'adsorption, qui peuvent être très difficiles à détecter mais néanmoins perturber fortement l'analyse par C.E.S..

1.2 UTILISATION DE LA C.E.S. POUR L'ANALYSE DES COLORANTS DE SUCRERIE

Plusieurs auteurs ont déterminé expérimentalement les masses molaires des colorants de fabrication, susceptibles d'être gênants en sucrerie, en utilisant la technique de C.E.S.. Nous avons regroupé dans le **tableau III.1**, ces masses molaires, et nous décrivons ci-dessous les différentes méthodes utilisées.

Smith (1966) ont utilisé une colonne d'un gel sephadex G-10, avec une limite supérieure de fractionnement de 0,7 kg/mol. Ils ont préparé des colorants de fabrication modèles (méthode de préparation : chapitre I § 1.1), puis les ont analysés par C.E.S.. Ils ont utilisé du NH_4OH à une concentration de 0,015 N comme éluant et ils ont collecté en sortie de colonne des fractions dont ils ont mesuré l'absorbance à 280 nm. Ils n'ont pas précisé les étalons utilisés. Ils ont trouvé que les caramels et les mélanoïdines ont des masses molaires supérieures ou égales à 0,7 kg/mol, alors que les PDAH ont des masses molaires inférieures à 0,7 kg/mol.

Shore *et al.*, (1984) ont utilisé un gel sephadex G-25, avec une limite supérieure de fractionnement de 5 kg/mol. Le tampon Na_2HPO_4 a été utilisé comme éluant et l'étalonnage a été réalisé avec les composés suivants : Bleu dextran et chromate de potassium respectivement, pour déterminer le volume mort (V_0) et le volume total poreux de la colonne (V_t), de l'insuline (2,532 kg/mol), de la bradykinine (1,24 kg/mol) et du saccharose (0,342 kg/mol). Ils ont utilisé un spectromètre UV et un réfractomètre pour la

détection. Ils ont déterminé par cette méthode d'analyse, les masses molaires des colorants de fabrication qu'ils ont préparés. Ils ont ainsi trouvé que les mélanoidines ont des masses molaires qui varient entre 0,3 et 5 kg/mol (limite supérieure de leur colonne), alors que les masses molaires des caramels et des PDAH se situent entre 0,1 et 1 kg/mol.

Plus récemment, Bento et Sa (1998) ont utilisé un gel de superose 12 avec une gamme de fractionnement comprise entre 1 et 300 kg/mol. Comme phase éluante, ils ont utilisé de l'eau distillée avec de l'acétonitrile à 30 % v/v et de l'acétate d'ammonium à 0,005 M. Ils ont déterminé le volume poreux total et le volume mort de la colonne avec du saccharose (0,342 kg/mol) et du bleu dextran (2000 kg/mol) respectivement. Ils ont étalonné la colonne avec des dextrans de différentes masses molaires (12, 42 et 460 kg/mol). Ils ont trouvé que les masses molaires des mélanoidines et des PDAH sont proches (entre 2,5 et 250 kg/mol) alors que celles des caramels sont moins importantes (< 12 kg/mol).

1.3 CONCLUSION

Les masses molaires des colorants de fabrication obtenues par Bento et Sa (1998) sont largement supérieures à celles obtenues par Smith (1966) et Shore *et al.*, (1984) qui sont, quant à elles, du même ordre de grandeur. On constate aussi que tous ces auteurs sont d'accord pour dire que parmi ces colorants de fabrication, les mélanoidines ont les plus grosses masses molaires. En revanche, en ce qui concerne les PDAH, les avis diffèrent. En effet, Bento et Sa (1998) les classent avec les mélanoidines parmi les hautes masses molaires, (Shore *et al.*, 1984) les placent au même niveau que les caramels, alors que Smith (1966) les situent dans les faibles masses molaires, inférieures aux mélanoidines et caramels qui se retrouvent au même niveau. Outre des différences dans les méthodes de préparation, ces différences de masses molaires des colorants entre les auteurs proviennent probablement d'un choix différent des étalons. Or le choix de l'étalon est primordial car l'exclusion stérique est non seulement basée sur la masse molaire, mais aussi sur la configuration spatiale des

molécules. Il est donc très important de choisir l'étalon qui se rapproche le plus, au niveau de sa configuration spatiale, des composés à analyser.

2. MISE EN PLACE DE LA C.E.S. A L'ENSIA

La mise en place, puis la mise au point de la C.E.S. constituent une part importante de notre travail. Dans cette partie, nous présentons le choix des matériels et produits pour le montage du système d'analyse. Nous présentons ensuite les conditions expérimentales déterminées. Les problèmes rencontrés seront analysés dans la partie qui suivra.

2.1 CHOIX DES PRODUITS ET MATERIELS

2.1.1 GEL

Le choix du gel est très important lorsque l'on veut mesurer les masses molaires des macromolécules par chromatographie d'exclusion stérique. L'utilisation d'un type de gel inadapté peut effectivement entraîner l'élution de toutes les macromolécules intéressantes en même temps que la molécule qui caractérise le volume mort (V_0) ou en même temps que la molécule qui caractérise le volume total poreux (V_t). Les macromolécules ne sont alors pas séparées.

Le choix du gel se fait à partir des données du fournisseur et de la gamme de fractionnement recherchée. Pour chaque gel, les fournisseurs indiquent une gamme de fractionnement déterminée avec des molécules étalons précisées (Pharmacia 1979 ; Strazielle 1984). Si l'on considère les masses molaires des colorants de fabrication mentionnées dans la littérature, on constate qu'elles varient de 0,1 kg/mol à 250 kg/mol tous auteurs confondus. Nous n'avons pas trouvé de gel avec une gamme de fractionnement aussi large dans le commerce. Nous avons donc choisi le gel superose 12 de Pharmacia-Biotech avec une gamme de fractionnement entre 1 kg/mol et 300 kg/mol, gamme déterminée avec des protéines. Il

présente en effet l'une des plus larges gammes de fractionnement, dans le même ordre de grandeur que les masses molaires des colorants de fabrication, en particulier dans la gamme des grosses masses molaires censées poser problème en cristallisation. Enfin, il a fait l'objet d'une utilisation récente, en 1998 par Bento et Sa (1998) avec les colorants de fabrication de sucrerie.

Le Superose 12 est un gel de polysaccharides. Il est constitué principalement d'agar-agar, polymère de galactose et d'anhydro-galactose. L'agar ou gélose est extrait d'algues rouges. Il se dissout dans l'eau chaude et en refroidissant, il forme un gel qui peut être remarquablement solide (Determann 1969).

2.1.2 ELUANT

La composition de l'éluant n'a pas une grande importance sur la résolution d'une colonne de C.E.S. (Pharmacia 1979). Par contre, l'éluant doit impérativement solubiliser le composé à analyser car une précipitation à l'intérieur de la colonne serait très gênante. Par ailleurs, l'éluant doit être un bon agent de gonflement du gel, pour éviter le dégonflement de celui-ci et l'effondrement de la colonne (Lesec 1994). Le gonflement du gel n'est pas le même selon la nature de l'éluant.

Pour la C.E.S. des molécules non chargées, solubles en milieux aqueux, l'eau distillée peut être un bon éluant. Pour la C.E.S. des molécules chargées, un éluant composé d'une solution tampon, par exemple le Tris(hydroxyméthyl)aminoéthane, appelé communément Tris, est souvent utilisé avec une force ionique supérieure à 0,05 pour éviter les phénomènes d'interactions ioniques. Dans ce but, le chlorure de sodium NaCl est généralement utilisé (Pharmacia 1979).

D'après l'étude de Bento (1992) sur la rétention des colorants par des résines échangeuses d'ions, ces derniers seraient plutôt ioniques. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser le

Tris comme solvant d'élution avec du chlorure de sodium à 0,2 M pour éviter les interactions avec le gel. De plus, Godshall (1997) a étudié la stabilité de plusieurs tampons avec les colorants de sucrerie et a montré que le Tris fait partie des tampons les plus stables. Enfin, Pharmacia-Biotech, fournisseur du gel superose 12, annonce une parfaite compatibilité entre ce gel et le Tris. Les résultats obtenus pour la séparation par exclusion stérique des peptides et protéines sont en effet très bons.

Nous avons donc utilisé le Tris (17-1321-01 à 99,8 % de pureté Pharmacia-Biotech) comme éluant, à une concentration de 0,05 mol/L. Le Tris a un pKa de 8. La plage tampon d'un composé se situant dans la gamme de son pKa \pm 1 unité pH, le pH du Tris a été ajusté à 7 avec une solution d'acide chlorhydrique. Ce pH a été choisi car les colorants de fabrication y sont plus stables qu'à un pH basique. Du NaCl à 0,2 mol/L a été ajouté au Tris pour éviter les phénomènes d'adsorption ionique.

2.1.3 ETALONS

La mesure des masses molaires sur une colonne de C.E.S est précédée par un étalonnage de la colonne. Le volume d'élution est une fonction linéaire du logarithme de la masse molaire, pour une série de composés de densité et de configuration spatiale (forme moléculaire) identiques (Pharmacia 1979). La courbe d'étalonnage doit être déterminée expérimentalement. La méthode la plus courante consiste à injecter une série d'étalons de masses molaires variées et bien connues pour déterminer les volumes d'élution et construire la courbe d'étalonnage. Cette méthode n'est valable que pour un couple étalons-éluant donné et varie d'un couple à l'autre. Le choix de la nature des étalons est primordial car, comme indiqué précédemment, l'exclusion stérique est basée sur la configuration spatiale des molécules en plus de la masse molaire. Or actuellement, il n'existe pas d'étalons de même configuration spatiale et de mêmes masses molaires que les colorants de fabrication. D'ailleurs, ces derniers sont composés de divers produits différents. Toutefois, puisque ces colorants sont issus de la dégradation des sucres, nous avons pensé que les dextrans,

polymères de glucose pouvaient s'en rapprocher au niveau structure. De plus, Williams (1974) a comparé la C.E.S. et l'osmométrie qui repose sur le phénomène d'osmose à travers une membrane semi-perméable, ne laissant passer que les petites molécules. Il a montré qu'un étalonnage avec des dextrans est valide pour mesurer les masses molaires de ces colorants. Bento et Sa (1998) a également utilisé ce type d'étalons pour analyser les colorants de sucrerie par C.E.S.. Nous avons donc opté pour l'étalonnage de la colonne avec ces composés. Cela dit, il faut rester prudent, et toutes les masses molaires mesurées ici seront données en « équivalent dextrans ». Cinq dextrans ont été choisis, dans la gamme de fractionnement du gel :

- D 1 (1 kg/mol 31416 Fluka)
- D 9,5 (9,5 kg/mol D-9260 Sigma)
- D 43,2 (43,2 kg/mol D-4133 Sigma)
- D 188 (188 kg/mol D-4876 Sigma)
- D 270 (270 kg/mol 31423 Fluka)

Pour déterminer le volume mort (V_0), nous avons utilisé comme il est très fréquent de le faire, du bleu dextran (D-5751 Sigma). Ce polymère a une masse molaire d'environ 2000 kg/mol. Il est donc censé ne pas pénétrer dans le gel et traverser rapidement le support chromatographique.

Pour déterminer le volume total poreux de la colonne (V_t), il fallait trouver une petite molécule qui pénètre dans tous les pores du gel et qui soit éluée au volume total poreux de la colonne. D'après Pharmacia.Biotech, la gamme de fractionnement du gel superose 12 est comprise entre 1 kg/mol et 300 kg/mol pour les protéines. Pour des raisons de configuration spatiale des molécules dans l'espace, cette gamme est plus faible pour les dextrans. Nous avons donc choisi, l'acétone (0,058 kg/mol) (27,072-5 à 99,9 % de pureté pour analyse de chromatographie Sigma) qui a une masse molaire nettement inférieure à 1 kg/mol.

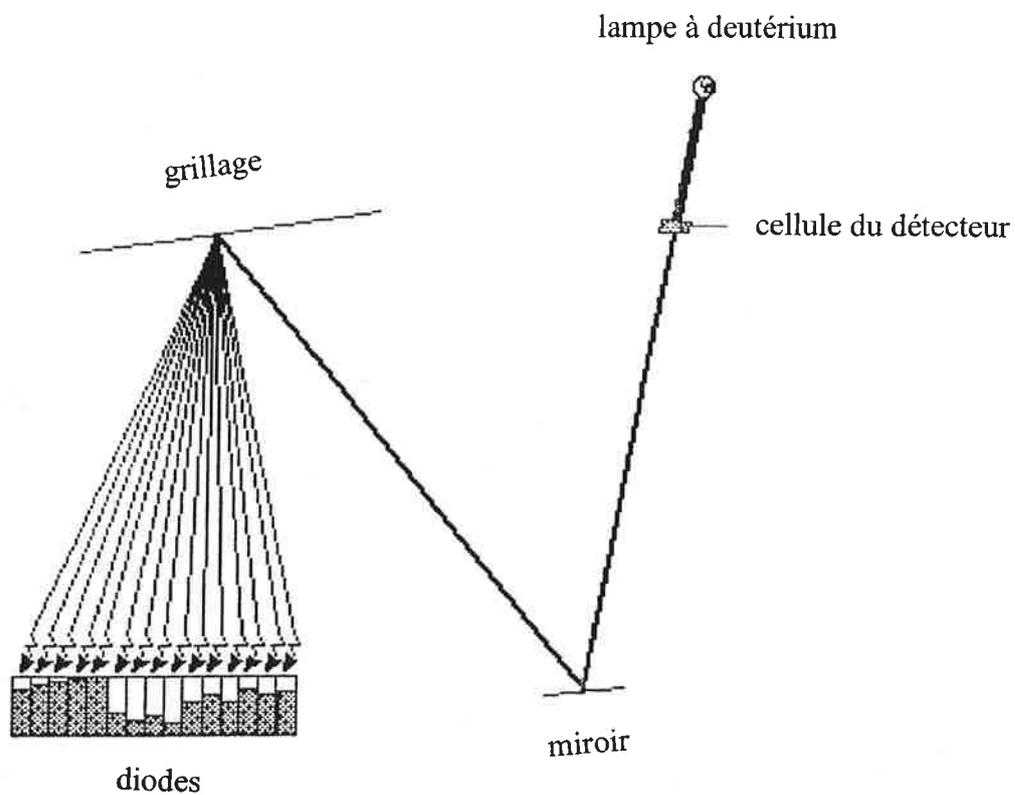


Figure III.3 : Schéma de principe d'un détecteur à barrettes de diodes
(Rouessac 1998)

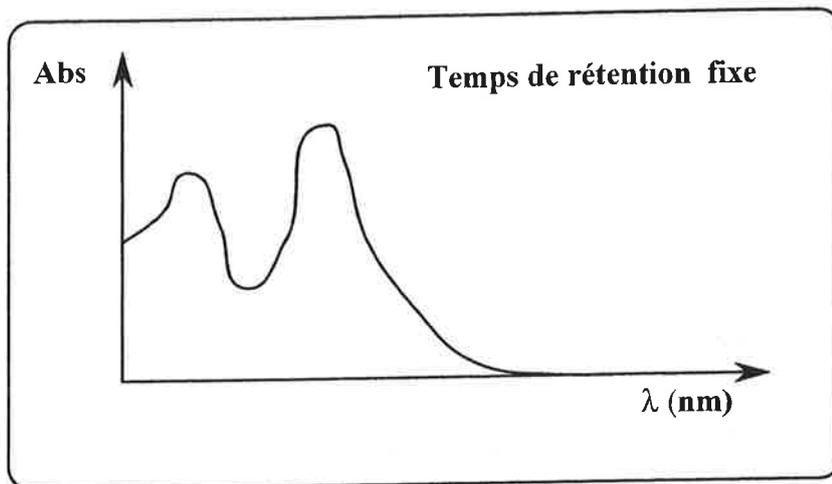


Figure III.4.a : Visualisation des spectres (absorbance en fonction de la longueur d'onde) à un temps de rétention fixe

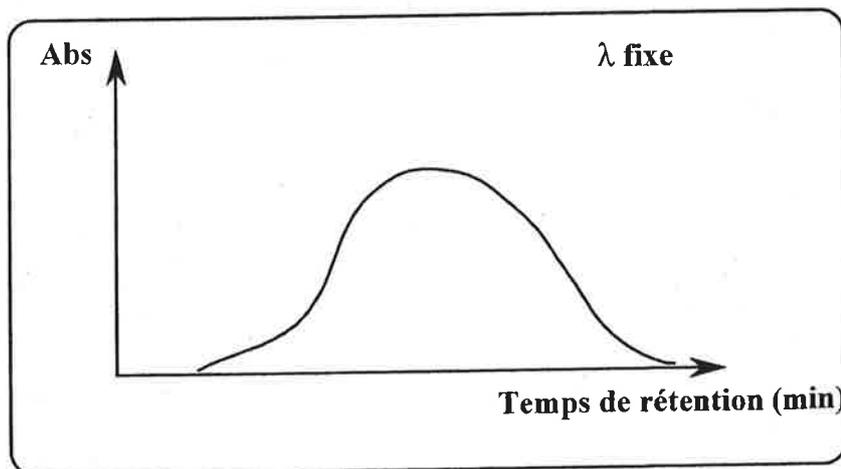


Figure III.4.b : Visualisation des chromatogrammes (absorbance en fonction du temps de rétention) à une longueur d'onde fixe

2.1.4 DETECTEURS

2.1.4.1 Détecteur à barrettes de diodes

Afin de visualiser la séparation chromatographique obtenue avec la colonne de C.E.S., il faut munir le système de détecteurs. D'après la caractérisation par spectrométrie des colorants de fabrication présentée au chapitre II, le détecteur idéal pour les colorants est un détecteur à barrettes de diodes, puisqu'il permet de déterminer les spectres des colorants séparés. Le détecteur à barrettes de diodes (D.B.D.) est un détecteur spectrométrique qui permet la mesure de l'absorbance de la phase mobile en continu à plusieurs longueurs d'ondes de l'UV-Visible. La cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique dans l'UV-Visible. La lumière transmise par l'échantillon est dispersée par un réseau à réflexion, sur un détecteur constitué par une rangée de diodes dont le nombre peut atteindre plusieurs centaines. Chaque diode indique l'absorbance moyenne dans un intervalle très étroit de longueurs d'onde (**figure III.3**) (Rouessac et Rouessac 1998). Les spectres successifs des composés élués par la phase mobile sont enregistrés au fur et à mesure de l'élution, puis ultérieurement traités par le logiciel de traitement de données. On obtient alors des spectrochromatogrammes en trois dimensions absorbance-longueur d'onde-temps, à partir desquels il est possible de visualiser des spectres (absorbance en fonction de la longueur d'onde) à un temps de rétention fixe (**figure III.4.a**) et des chromatogrammes (absorbance en fonction du temps de rétention) à une longueur d'onde fixe (**figure III.4.b**).

Le détecteur à barrettes de diodes utilisé ici est le 996 PDA de la société Waters. Il comporte 512 diodes avec une résolution optique de 1,2 nm par diode. Il couvre toute la gamme de l'UV-Visible entre 190 nm et 800 nm mais nous n'avons utilisé que la gamme 220 nm-800 nm car, comme expliqué au chapitre II, l'absorbance en dessous de 220 nm n'est pas significative. La sensibilité de cet appareil va jusqu'à 10^{-3} unité d'absorbance.

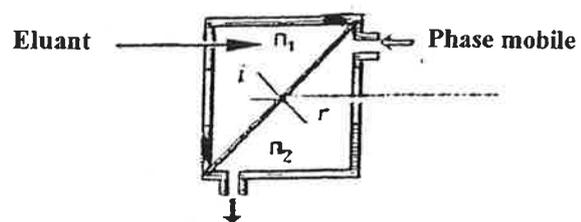


Figure III.5 : Schéma de principe d'une cellule de mesure d'un réfractomètre différentiel

(Rouessac 1998)

2.1.4.2 Réfractomètre différentiel

Malheureusement les dextrans choisies pour l'étalonnage n'absorbent pas dans l'UV-Vis. Il fallait donc ajouter un détecteur de matière sèche. Le plus communément utilisé est dans ce cas le réfractomètre différentiel qui produit un signal proportionnel à la concentration des molécules dissoutes. Ce détecteur n'est pas très sensible, mais il a l'avantage d'être non spécifique et quasi universel. Le réfractomètre différentiel que nous avons choisi est le 2410 de la société Waters. Le principe de ce détecteur est qu'un faisceau lumineux passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec de l'éluant seul et l'autre avec l'éluant sortant de la colonne. La différence d'indice de réfraction (DIR) entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est dissout dans l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté (**figure III.5**). La réponse DIR du réfractomètre est alors donnée par la relation suivante :

$$\text{DIR} = Z \cdot (n - n_0) \quad (\text{III.4})$$

- Z = Constante caractéristique de l'appareil
- n = Indice de réfraction de la phase éluee en sortie de colonne
- n_0 = Indice de réfraction de l'éluant

Le réfractomètre différentiel Waters 2410 mesure des différences jusqu'à $5 \cdot 10^{-3}$ unité d'indice de réfraction. Sa sensibilité est de $5 \cdot 10^{-8}$ unité d'indice de réfraction. Le réfractomètre est très sensible aux variations de température. Par conséquent, un long capillaire entouré d'une résistance est installé en amont de la cellule de mesure pour chauffer l'éluant avant son entrée dans la cellule de mesure. La température de la cellule peut aller jusqu'à 35°C.

2.1.5 COLONNE ET POMPE

Nous avons, dans un premier temps, choisi d'utiliser une colonne de chromatographie semi-préparative qui fonctionne à pression atmosphérique. Cette dernière est moins onéreuse qu'une colonne analytique à haute pression. Un système semi-préparatif paraissait suffisant

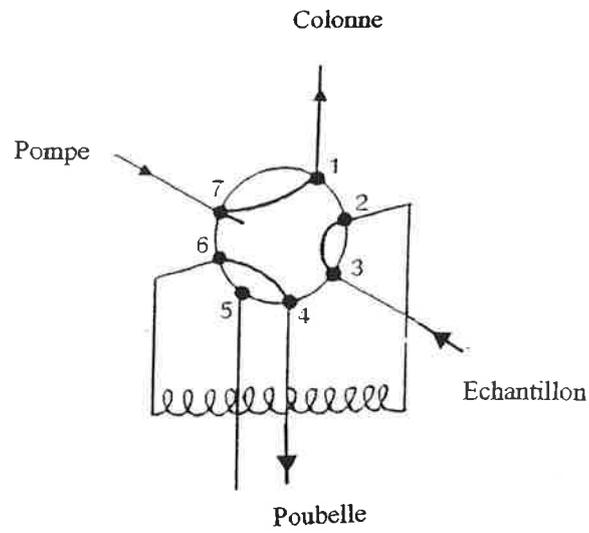
pour avoir une idée de la gamme et de la distribution des masses molaires des colorants de fabrication. Nous avons donc choisi une colonne vide de type XK16/70 de Pharmacia-Biotech, à remplir avec le gel superose 12. Cette colonne est généralement alimentée par une pompe péristaltique Pump P-1 de Pharmacia-Biotech.

Malheureusement, une fois le système monté, nous nous sommes rendus compte que la pompe péristaltique avait une fuite continue. La cause était que les détecteurs, et en particulier le réfractomètre, engendraient une contre-pression trop importante pour que la pompe puisse alimenter le système. En effet, les diamètres des capillaires et les volumes des cellules de mesure (10 μ L chacune) sont très petits. De plus, le capillaire de chauffage du réfractomètre est très long, d'où la contre-pression engendrée. Nous nous sommes donc renseignés auprès des fournisseurs sur la possibilité de remplacer ce détecteur par un autre, avec des tubes et une cellule de mesure plus larges, conçu pour les systèmes basse pression. Nous avons alors eu la surprise de découvrir que cette solution n'était plus possible. Autrement dit, avec la chromatographie basse pression, il faut utiliser un collecteur de fractions et faire ensuite les mesures sur les échantillons collectés.

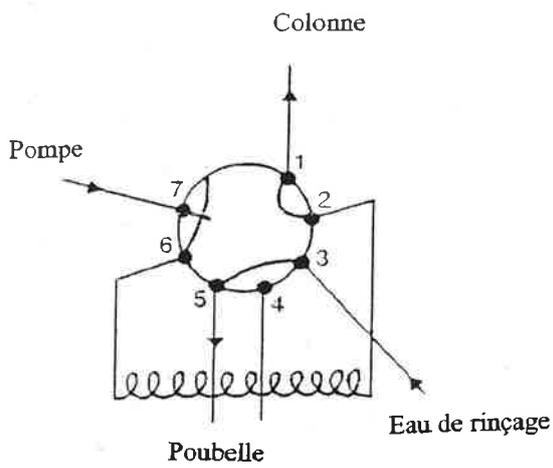
Désirant une analyse en ligne, nous avons décidé de garder les détecteurs précédemment choisis et d'utiliser une pompe haute pression. Ce choix a ensuite nécessité le remplacement de la colonne XK16/70 par une autre colonne, contenant le même gel, mais plus résistante à la pression. La colonne pré-paquée avec le gel superose 12 est la superose 12 HR 10/30 de Pharmacia-Biotech. La pompe à haute pression utilisée est une pompe LC-6A de Shimadzu qui fonctionne en régime isocratique. La colonne était fournie avec toutes les connexions adéquates en amont et en aval afin d'avoir un volume mort minimal.

2.1.6 VANNE D'INJECTION

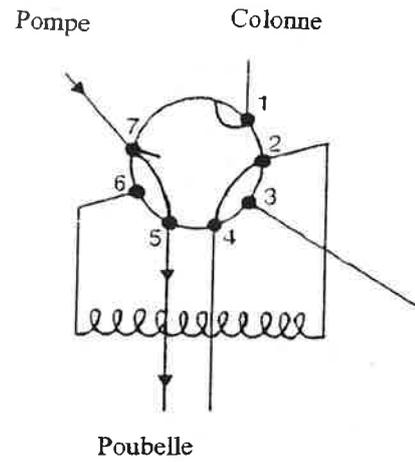
La vanne d'injection choisie est une vanne manuelle Valve V-7 de Pharmacia-Biotech. C'est une vanne à boucle qui permet d'injecter sous pression des quantités très reproductibles



Remplissage



Injection



Lavage

Figure III.6 : Positions de fonctionnement de la vanne d'injection "Valve V-7"
(Pharmacia-Biotech)

L'intérêt de la chromatographie d'exclusion stérique (C.E.S.) comme moyen analytique pour l'étude des macromolécules en sucrerie n'est plus à démontrer. Nous avons explicité, à travers la synthèse bibliographique précédente (cf. chapitre I § 3), l'utilité de cette méthode. En effet, c'est grâce à elle que les chercheurs ont découvert que ce sont les colorants de hautes masses molaires qui posent le plus de problèmes en sucrerie. C'est aussi en partie, grâce à cette méthode, qu'ils ont démontré que la filtration tangentielle n'est pas un simple tamisage. Ils ont alors montré que certains composés de très petites masses molaires, sont retenus par des membranes de seuil de coupure beaucoup plus grand en comparaison.

Afin d'évaluer réellement l'intérêt de la filtration tangentielle pour éliminer les colorants de fabrication gênants en cristallisation, nous avons décidé de mettre au point, à l'ENSIA, la technique de chromatographie d'exclusion stérique. Dans ce chapitre, nous présentons tout d'abord la chromatographie d'exclusion stérique et son utilisation actuelle pour analyser les colorants de sucrerie. Nous présentons ensuite toutes les étapes de mise au point de cette technique à l'ENSIA, avec les différentes difficultés rencontrées et les solutions proposées. Enfin, nous analysons les résultats de masses molaires, obtenus avec les colorants de fabrication que nous avons préparés et une refonte de sucre roux.

1. LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE ET SON UTILISATION POUR L'ANALYSE DES COLORANTS DE SUCRERIE

1.1 DEFINITION ET PRINCIPE DE LA C.E.S.

La chromatographie d'exclusion stérique est une des méthodes les plus adaptées pour déterminer les masses molaires des grosses molécules (≥ 1000 g/mol) (Pharmacia 1979 ; Strazielle 1984 ; Caude et Jardy 1994 ; Lescq 1994). Cette méthode est basée sur le principe d'exclusion à travers un support poreux. Elle est indirecte et demande un étalonnage préalable de la colonne chromatographique. Bien que le principe de séparation reste fondamentalement le même, on distingue d'après Lescq (1994) :

- La filtration sur gel, pour l'analyse des macromolécules hydrosolubles, où la phase éluante est aqueuse et la phase stationnaire constituée d'un gel réticulé et gonflé en milieu aqueux. Cette technique est née en Suède en 1959.
- La perméation sur gel, pour l'analyse des macromolécules organiques insolubles dans l'eau, utilisant une phase éluante organique peu polaire et un gel de polystyrène réticulé. Cette technique est antérieure à la filtration sur gel de quelques années.

Puisque que le terme général qui désigne cette méthode d'analyse est chromatographie d'exclusion stérique (C.E.S.) nous l'avons retenu pour la suite, tout en précisant à chaque fois la nature des phases stationnaire et éluante utilisées, ainsi que celle des composés à analyser.

La C.E.S. est donc une chromatographie en phase liquide particulière, dans laquelle la phase stationnaire est un gel réticulé poreux, disposé dans la colonne et gonflé par l'éluant. Le principe est basé sur la capacité différente des macromolécules à pénétrer dans les pores de ce gel. Les très grosses molécules ne pénètrent jamais dans les pores du gel et traversent plus rapidement le support chromatographique. Les plus petites molécules entrent dans les pores du gel et se déplacent dans un plus grand volume. Les molécules sont ainsi éluées dans l'ordre

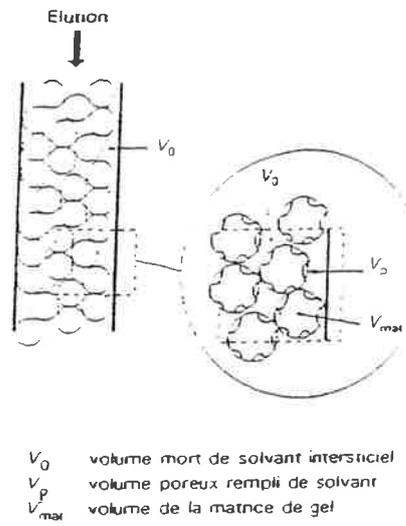


Figure III.1 : Représentation d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique
(Lesc 1994)

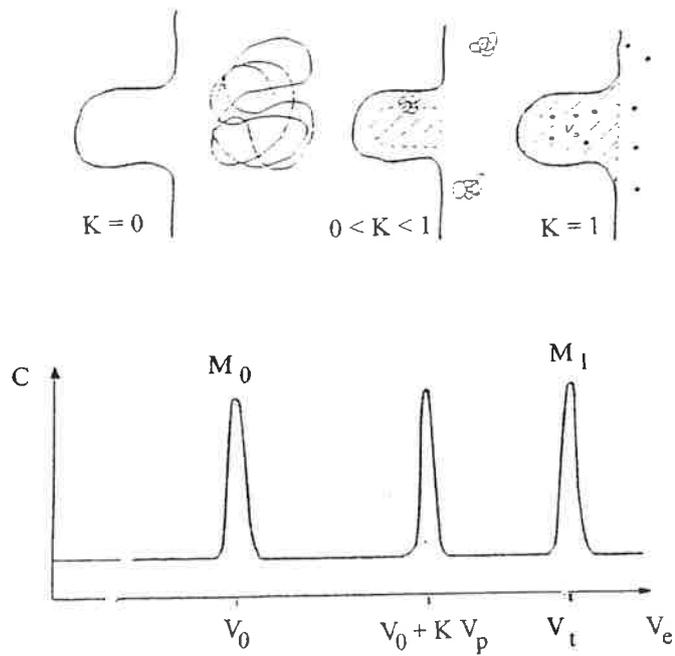


Figure III.2 : Représentation de l'exclusion stérique d'une macromolécule
(Lesc 1994)

des masses molaires décroissantes. Afin de mieux illustrer le principe, nous avons représenté dans la **figure III.1**, une colonne de chromatographie d'exclusion stérique. Le volume total de la colonne (V_{col}) peut être considéré comme la somme de deux volumes, le volume mort (V_0), correspondant au solvant interstitiel autour des billes de gel, et le volume des billes de gel (V_{gel}). Ce dernier peut à son tour être divisé en deux : le volume de la matrice du gel (V_{mat}) et le volume poreux rempli de solvant (V_p). Ces différents volumes vérifient alors l'équation suivante :

$$V_{col} = V_0 + V_{mat} + V_p \quad (III.1)$$

Quand on considère la rétention des solutés en C.E.S., seul le volume total du solvant qui représente le volume total poreux (V_t) de la colonne ($V_0 + V_p$), doit être pris en considération.

$$V_t = V_0 + V_p \quad (III.2)$$

Soit K la constante représentant le coefficient de partage d'une macromolécule entre l'éluant dans la phase mobile (V_0), et l'éluant dans la phase stationnaire (V_p). Le volume d'élution de cette macromolécule (V_e) peut alors s'écrire :

$$V_e = V_0 + K \cdot V_p \quad (III.3)$$

K varie de zéro pour les grosses molécules exclues du gel (aucun accès aux pores du gel), à l'unité pour les molécules en perméation totale (accès total au volume poreux). Ceci veut dire que tous les solutés, quelles que soient leurs masses molaires, sont élués entre deux volumes V_0 et $V_0 + V_p$. Ces deux volumes doivent être déterminés expérimentalement avant toute analyse sur une colonne de C.E.S..

Supposons que V_0 soit le volume d'élution d'un étalon de masse molaire M_0 et $V_0 + V_p$ le volume d'élution d'un étalon de masse molaire M_1 . La gamme des masses molaires comprises entre M_1 et M_0 est alors appelée « gamme de fractionnement du gel ». Si une molécule est éluee à V_0 , sa masse molaire est supérieure ou égale à M_0 et si elle est éluee à $V_0 + V_p$, sa masse molaire est inférieure ou égale à M_1 . Nous avons représenté schématiquement les

Tableau III.1 : Masses molaires des colorants de fabrication rencontrées dans la littérature

| Auteurs | Masses molaires des Colorants de fabrication | | |
|------------------------------|---|-------------------|------------------|
| | Mélanoïdines | Caramels | PDAH |
| (Smith 1966) | $\geq 0,7$ kg/mol | $\geq 0,7$ kg/mol | $< 0,7$ kg/mol |
| (Shore <i>et al.</i> , 1984) | 0,3 - 5 kg/mol | 0,1 - 1 kg/mol | 0,1 - 1 kg/mol |
| (Bento et Sa 1998) | 2,5 - 250 kg/mol | 2,5 - 12 kg/mol | 2,5 - 250 kg/mol |

variations du volume d'élution en fonction de la taille des macromolécules dans une colonne de C.E.S. en **figure III.2**.

Il est important de signaler que pour tirer profit de cette propriété de l'exclusion stérique, il faut être très vigilant avec les mécanismes parasites comme l'adsorption, qui peuvent être très difficiles à détecter mais néanmoins perturber fortement l'analyse par C.E.S..

1.2 UTILISATION DE LA C.E.S. POUR L'ANALYSE DES COLORANTS DE SUCRERIE

Plusieurs auteurs ont déterminé expérimentalement les masses molaires des colorants de fabrication, susceptibles d'être gênants en sucrerie, en utilisant la technique de C.E.S.. Nous avons regroupé dans le **tableau III.1**, ces masses molaires, et nous décrivons ci-dessous les différentes méthodes utilisées.

Smith (1966) ont utilisé une colonne d'un gel sephadex G-10, avec une limite supérieure de fractionnement de 0,7 kg/mol. Ils ont préparé des colorants de fabrication modèles (méthode de préparation : chapitre I § 1.1), puis les ont analysés par C.E.S.. Ils ont utilisé du NH_4OH à une concentration de 0,015 N comme éluant et ils ont collecté en sortie de colonne des fractions dont ils ont mesuré l'absorbance à 280 nm. Ils n'ont pas précisé les étalons utilisés. Ils ont trouvé que les caramels et les mélanoidines ont des masses molaires supérieures ou égales à 0,7 kg/mol, alors que les PDAH ont des masses molaires inférieures à 0,7 kg/mol.

Shore *et al.*, (1984) ont utilisé un gel sephadex G-25, avec une limite supérieure de fractionnement de 5 kg/mol. Le tampon Na_2HPO_4 a été utilisé comme éluant et l'étalonnage a été réalisé avec les composés suivants : Bleu dextran et chromate de potassium respectivement, pour déterminer le volume mort (V_0) et le volume total poreux de la colonne (V_t), de l'insuline (2,532 kg/mol), de la bradykinine (1,24 kg/mol) et du saccharose (0,342 kg/mol). Ils ont utilisé un spectromètre UV et un réfractomètre pour la

détection. Ils ont déterminé par cette méthode d'analyse, les masses molaires des colorants de fabrication qu'ils ont préparés. Ils ont ainsi trouvé que les mélanoidines ont des masses molaires qui varient entre 0,3 et 5 kg/mol (limite supérieure de leur colonne), alors que les masses molaires des caramels et des PDAH se situent entre 0,1 et 1 kg/mol.

Plus récemment, Bento et Sa (1998) ont utilisé un gel de superose 12 avec une gamme de fractionnement comprise entre 1 et 300 kg/mol. Comme phase éluante, ils ont utilisé de l'eau distillée avec de l'acétonitrile à 30 % v/v et de l'acétate d'ammonium à 0,005 M. Ils ont déterminé le volume poreux total et le volume mort de la colonne avec du saccharose (0,342 kg/mol) et du bleu dextran (2000 kg/mol) respectivement. Ils ont étalonné la colonne avec des dextrans de différentes masses molaires (12, 42 et 460 kg/mol). Ils ont trouvé que les masses molaires des mélanoidines et des PDAH sont proches (entre 2,5 et 250 kg/mol) alors que celles des caramels sont moins importantes (< 12 kg/mol).

1.3 CONCLUSION

Les masses molaires des colorants de fabrication obtenues par Bento et Sa (1998) sont largement supérieures à celles obtenues par Smith (1966) et Shore *et al.*, (1984) qui sont, quant à elles, du même ordre de grandeur. On constate aussi que tous ces auteurs sont d'accord pour dire que parmi ces colorants de fabrication, les mélanoidines ont les plus grosses masses molaires. En revanche, en ce qui concerne les PDAH, les avis diffèrent. En effet, Bento et Sa (1998) les classent avec les mélanoidines parmi les hautes masses molaires, (Shore *et al.*, 1984) les placent au même niveau que les caramels, alors que Smith (1966) les situent dans les faibles masses molaires, inférieures aux mélanoidines et caramels qui se retrouvent au même niveau. Outre des différences dans les méthodes de préparation, ces différences de masses molaires des colorants entre les auteurs proviennent probablement d'un choix différent des étalons. Or le choix de l'étalon est primordial car l'exclusion stérique est non seulement basée sur la masse molaire, mais aussi sur la configuration spatiale des

molécules. Il est donc très important de choisir l'étalon qui se rapproche le plus, au niveau de sa configuration spatiale, des composés à analyser.

2. MISE EN PLACE DE LA C.E.S. A L'ENSIA

La mise en place, puis la mise au point de la C.E.S. constituent une part importante de notre travail. Dans cette partie, nous présentons le choix des matériels et produits pour le montage du système d'analyse. Nous présentons ensuite les conditions expérimentales déterminées. Les problèmes rencontrés seront analysés dans la partie qui suivra.

2.1 CHOIX DES PRODUITS ET MATERIELS

2.1.1 GEL

Le choix du gel est très important lorsque l'on veut mesurer les masses molaires des macromolécules par chromatographie d'exclusion stérique. L'utilisation d'un type de gel inadapté peut effectivement entraîner l'élution de toutes les macromolécules intéressantes en même temps que la molécule qui caractérise le volume mort (V_0) ou en même temps que la molécule qui caractérise le volume total poreux (V_t). Les macromolécules ne sont alors pas séparées.

Le choix du gel se fait à partir des données du fournisseur et de la gamme de fractionnement recherchée. Pour chaque gel, les fournisseurs indiquent une gamme de fractionnement déterminée avec des molécules étalons précisées (Pharmacia 1979 ; Strazielle 1984). Si l'on considère les masses molaires des colorants de fabrication mentionnées dans la littérature, on constate qu'elles varient de 0,1 kg/mol à 250 kg/mol tous auteurs confondus. Nous n'avons pas trouvé de gel avec une gamme de fractionnement aussi large dans le commerce. Nous avons donc choisi le gel superose 12 de Pharmacia-Biotech avec une gamme de fractionnement entre 1 kg/mol et 300 kg/mol, gamme déterminée avec des protéines. Il

présente en effet l'une des plus larges gammes de fractionnement, dans le même ordre de grandeur que les masses molaires des colorants de fabrication, en particulier dans la gamme des grosses masses molaires censées poser problème en cristallisation. Enfin, il a fait l'objet d'une utilisation récente, en 1998 par Bento et Sa (1998) avec les colorants de fabrication de sucrerie.

Le Superose 12 est un gel de polysaccharides. Il est constitué principalement d'agar-agar, polymère de galactose et d'anhydro-galactose. L'agar ou gélose est extrait d'algues rouges. Il se dissout dans l'eau chaude et en refroidissant, il forme un gel qui peut être remarquablement solide (Determann 1969).

2.1.2 ELUANT

La composition de l'éluant n'a pas une grande importance sur la résolution d'une colonne de C.E.S. (Pharmacia 1979). Par contre, l'éluant doit impérativement solubiliser le composé à analyser car une précipitation à l'intérieur de la colonne serait très gênante. Par ailleurs, l'éluant doit être un bon agent de gonflement du gel, pour éviter le dégonflement de celui-ci et l'effondrement de la colonne (Lesec 1994). Le gonflement du gel n'est pas le même selon la nature de l'éluant.

Pour la C.E.S. des molécules non chargées, solubles en milieux aqueux, l'eau distillée peut être un bon éluant. Pour la C.E.S. des molécules chargées, un éluant composé d'une solution tampon, par exemple le Tris(hydroxyméthyl)aminoéthane, appelé communément Tris, est souvent utilisé avec une force ionique supérieure à 0,05 pour éviter les phénomènes d'interactions ioniques. Dans ce but, le chlorure de sodium NaCl est généralement utilisé (Pharmacia 1979).

D'après l'étude de Bento (1992) sur la rétention des colorants par des résines échangeuses d'ions, ces derniers seraient plutôt ioniques. C'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser le

Tris comme solvant d'élution avec du chlorure de sodium à 0,2 M pour éviter les interactions avec le gel. De plus, Godshall (1997) a étudié la stabilité de plusieurs tampons avec les colorants de sucrerie et a montré que le Tris fait partie des tampons les plus stables. Enfin, Pharmacia-Biotech, fournisseur du gel superose 12, annonce une parfaite compatibilité entre ce gel et le Tris. Les résultats obtenus pour la séparation par exclusion stérique des peptides et protéines sont en effet très bons.

Nous avons donc utilisé le Tris (17-1321-01 à 99,8 % de pureté Pharmacia-Biotech) comme éluant, à une concentration de 0,05 mol/L. Le Tris a un pKa de 8. La plage tampon d'un composé se situant dans la gamme de son pKa \pm 1 unité pH, le pH du Tris a été ajusté à 7 avec une solution d'acide chlorhydrique. Ce pH a été choisi car les colorants de fabrication y sont plus stables qu'à un pH basique. Du NaCl à 0,2 mol/L a été ajouté au Tris pour éviter les phénomènes d'adsorption ionique.

2.1.3 ETALONS

La mesure des masses molaires sur une colonne de C.E.S est précédée par un étalonnage de la colonne. Le volume d'élution est une fonction linéaire du logarithme de la masse molaire, pour une série de composés de densité et de configuration spatiale (forme moléculaire) identiques (Pharmacia 1979). La courbe d'étalonnage doit être déterminée expérimentalement. La méthode la plus courante consiste à injecter une série d'étalons de masses molaires variées et bien connues pour déterminer les volumes d'élution et construire la courbe d'étalonnage. Cette méthode n'est valable que pour un couple étalons-éluant donné et varie d'un couple à l'autre. Le choix de la nature des étalons est primordial car, comme indiqué précédemment, l'exclusion stérique est basée sur la configuration spatiale des molécules en plus de la masse molaire. Or actuellement, il n'existe pas d'étalons de même configuration spatiale et de mêmes masses molaires que les colorants de fabrication. D'ailleurs, ces derniers sont composés de divers produits différents. Toutefois, puisque ces colorants sont issus de la dégradation des sucres, nous avons pensé que les dextrans,

polymères de glucose pouvaient s'en rapprocher au niveau structure. De plus, Williams (1974) a comparé la C.E.S. et l'osmométrie qui repose sur le phénomène d'osmose à travers une membrane semi-perméable, ne laissant passer que les petites molécules. Il a montré qu'un étalonnage avec des dextrans est valide pour mesurer les masses molaires de ces colorants. Bento et Sa (1998) a également utilisé ce type d'étalons pour analyser les colorants de sucrerie par C.E.S.. Nous avons donc opté pour l'étalonnage de la colonne avec ces composés. Cela dit, il faut rester prudent, et toutes les masses molaires mesurées ici seront données en « équivalent dextrans ». Cinq dextrans ont été choisis, dans la gamme de fractionnement du gel :

- D 1 (1 kg/mol 31416 Fluka)
- D 9,5 (9,5 kg/mol D-9260 Sigma)
- D 43,2 (43,2 kg/mol D-4133 Sigma)
- D 188 (188 kg/mol D-4876 Sigma)
- D 270 (270 kg/mol 31423 Fluka)

Pour déterminer le volume mort (V_0), nous avons utilisé comme il est très fréquent de le faire, du bleu dextran (D-5751 Sigma). Ce polymère a une masse molaire d'environ 2000 kg/mol. Il est donc censé ne pas pénétrer dans le gel et traverser rapidement le support chromatographique.

Pour déterminer le volume total poreux de la colonne (V_t), il fallait trouver une petite molécule qui pénètre dans tous les pores du gel et qui soit éluée au volume total poreux de la colonne. D'après Pharmacia.Biotech, la gamme de fractionnement du gel superose 12 est comprise entre 1 kg/mol et 300 kg/mol pour les protéines. Pour des raisons de configuration spatiale des molécules dans l'espace, cette gamme est plus faible pour les dextrans. Nous avons donc choisi, l'acétone (0,058 kg/mol) (27,072-5 à 99,9 % de pureté pour analyse de chromatographie Sigma) qui a une masse molaire nettement inférieure à 1 kg/mol.

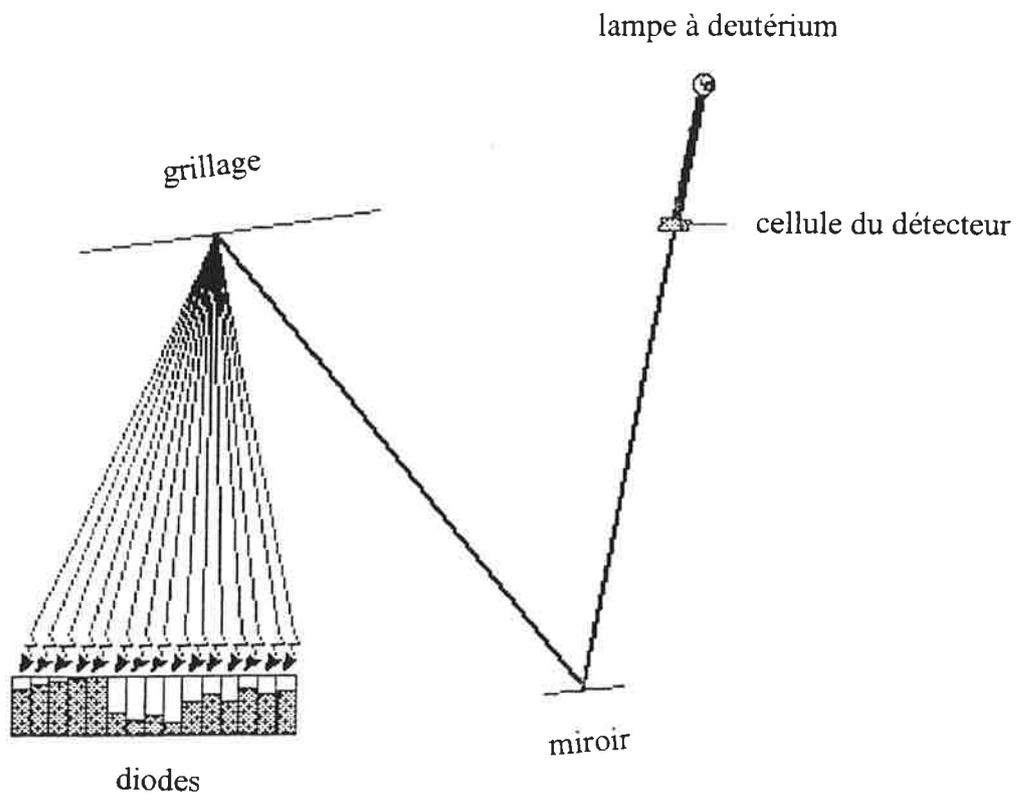


Figure III.3 : Schéma de principe d'un détecteur à barrettes de diodes

(Rouessac 1998)

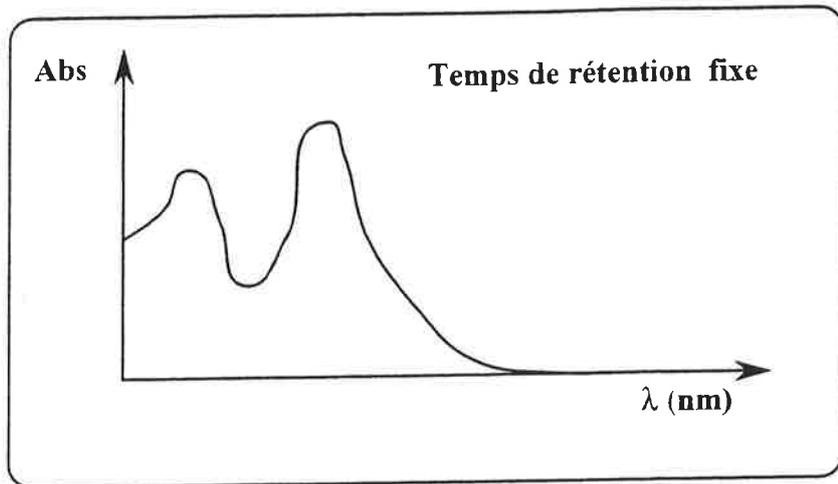


Figure III.4.a : Visualisation des spectres (absorbance en fonction de la longueur d'onde) à un temps de rétention fixe

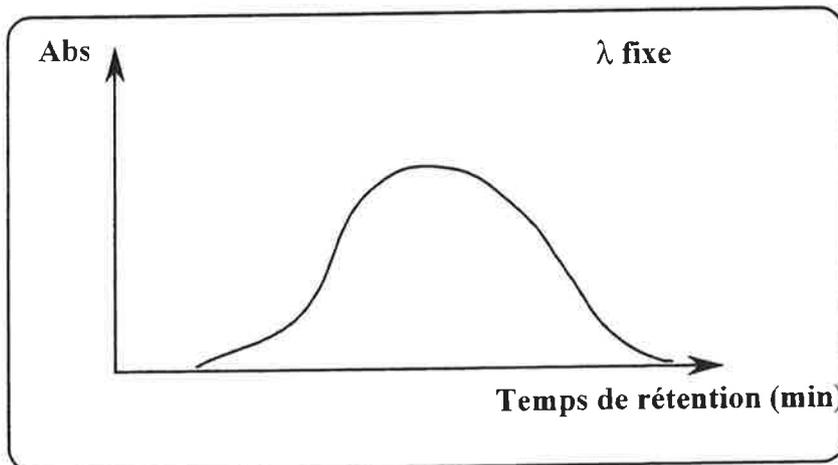


Figure III.4.b : Visualisation des chromatogrammes (absorbance en fonction du temps de rétention) à une longueur d'onde fixe

2.1.4 DETECTEURS

2.1.4.1 Détecteur à barrettes de diodes

Afin de visualiser la séparation chromatographique obtenue avec la colonne de C.E.S., il faut munir le système de détecteurs. D'après la caractérisation par spectrométrie des colorants de fabrication présentée au chapitre II, le détecteur idéal pour les colorants est un détecteur à barrettes de diodes, puisqu'il permet de déterminer les spectres des colorants séparés. Le détecteur à barrettes de diodes (D.B.D.) est un détecteur spectrométrique qui permet la mesure de l'absorbance de la phase mobile en continu à plusieurs longueurs d'ondes de l'UV-Visible. La cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique dans l'UV-Visible. La lumière transmise par l'échantillon est dispersée par un réseau à réflexion, sur un détecteur constitué par une rangée de diodes dont le nombre peut atteindre plusieurs centaines. Chaque diode indique l'absorbance moyenne dans un intervalle très étroit de longueurs d'onde (**figure III.3**) (Rouessac et Rouessac 1998). Les spectres successifs des composés élués par la phase mobile sont enregistrés au fur et à mesure de l'élution, puis ultérieurement traités par le logiciel de traitement de données. On obtient alors des spectrochromatogrammes en trois dimensions absorbance-longueur d'onde-temps, à partir desquels il est possible de visualiser des spectres (absorbance en fonction de la longueur d'onde) à un temps de rétention fixe (**figure III.4.a**) et des chromatogrammes (absorbance en fonction du temps de rétention) à une longueur d'onde fixe (**figure III.4.b**).

Le détecteur à barrettes de diodes utilisé ici est le 996 PDA de la société Waters. Il comporte 512 diodes avec une résolution optique de 1,2 nm par diode. Il couvre toute la gamme de l'UV-Visible entre 190 nm et 800 nm mais nous n'avons utilisé que la gamme 220 nm-800 nm car, comme expliqué au chapitre II, l'absorbance en dessous de 220 nm n'est pas significative. La sensibilité de cet appareil va jusqu'à 10^{-3} unité d'absorbance.

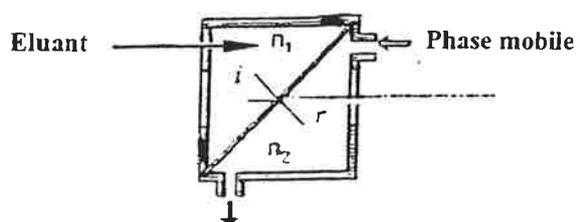


Figure III.5 : Schéma de principe d'une cellule de mesure d'un réfractomètre différentiel
(Rouessac 1998)

2.1.4.2 Réfractomètre différentiel

Malheureusement les dextrans choisies pour l'étalonnage n'absorbent pas dans l'UV-Vis. Il fallait donc ajouter un détecteur de matière sèche. Le plus communément utilisé est dans ce cas le réfractomètre différentiel qui produit un signal proportionnel à la concentration des molécules dissoutes. Ce détecteur n'est pas très sensible, mais il a l'avantage d'être non spécifique et quasi universel. Le réfractomètre différentiel que nous avons choisi est le 2410 de la société Waters. Le principe de ce détecteur est qu'un faisceau lumineux passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec de l'éluant seul et l'autre avec l'éluant sortant de la colonne. La différence d'indice de réfraction (DIR) entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est dissout dans l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté (**figure III.5**). La réponse DIR du réfractomètre est alors donnée par la relation suivante :

$$\text{DIR} = Z \cdot (n - n_0) \quad (\text{III.4})$$

- Z = Constante caractéristique de l'appareil
- n = Indice de réfraction de la phase éluee en sortie de colonne
- n_0 = Indice de réfraction de l'éluant

Le réfractomètre différentiel Waters 2410 mesure des différences jusqu'à $5 \cdot 10^{-3}$ unité d'indice de réfraction. Sa sensibilité est de $5 \cdot 10^{-8}$ unité d'indice de réfraction. Le réfractomètre est très sensible aux variations de température. Par conséquent, un long capillaire entouré d'une résistance est installé en amont de la cellule de mesure pour chauffer l'éluant avant son entrée dans la cellule de mesure. La température de la cellule peut aller jusqu'à 35°C .

2.1.5 COLONNE ET POMPE

Nous avons, dans un premier temps, choisi d'utiliser une colonne de chromatographie semi-préparative qui fonctionne à pression atmosphérique. Cette dernière est moins onéreuse qu'une colonne analytique à haute pression. Un système semi-préparatif paraissait suffisant

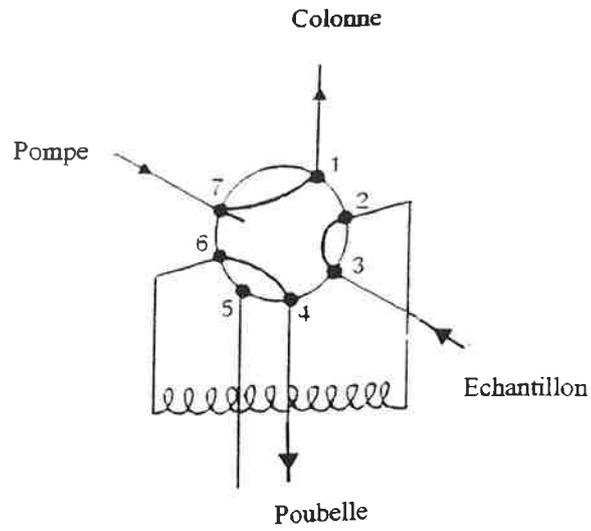
pour avoir une idée de la gamme et de la distribution des masses molaires des colorants de fabrication. Nous avons donc choisi une colonne vide de type XK16/70 de Pharmacia-Biotech, à remplir avec le gel superose 12. Cette colonne est généralement alimentée par une pompe péristaltique Pump P-1 de Pharmacia-Biotech.

Malheureusement, une fois le système monté, nous nous sommes rendus compte que la pompe péristaltique avait une fuite continue. La cause était que les détecteurs, et en particulier le réfractomètre, engendraient une contre-pression trop importante pour que la pompe puisse alimenter le système. En effet, les diamètres des capillaires et les volumes des cellules de mesure (10 μ L chacune) sont très petits. De plus, le capillaire de chauffage du réfractomètre est très long, d'où la contre-pression engendrée. Nous nous sommes donc renseignés auprès des fournisseurs sur la possibilité de remplacer ce détecteur par un autre, avec des tubes et une cellule de mesure plus larges, conçu pour les systèmes basse pression. Nous avons alors eu la surprise de découvrir que cette solution n'était plus possible. Autrement dit, avec la chromatographie basse pression, il faut utiliser un collecteur de fractions et faire ensuite les mesures sur les échantillons collectés.

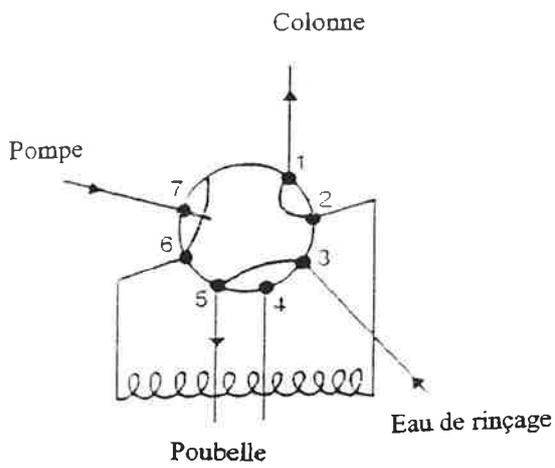
Désirant une analyse en ligne, nous avons décidé de garder les détecteurs précédemment choisis et d'utiliser une pompe haute pression. Ce choix a ensuite nécessité le remplacement de la colonne XK16/70 par une autre colonne, contenant le même gel, mais plus résistante à la pression. La colonne pré-paquée avec le gel superose 12 est la superose 12 HR 10/30 de Pharmacia-Biotech. La pompe à haute pression utilisée est une pompe LC-6A de Shimadzu qui fonctionne en régime isocratique. La colonne était fournie avec toutes les connexions adéquates en amont et en aval afin d'avoir un volume mort minimal.

2.1.6 VANNE D'INJECTION

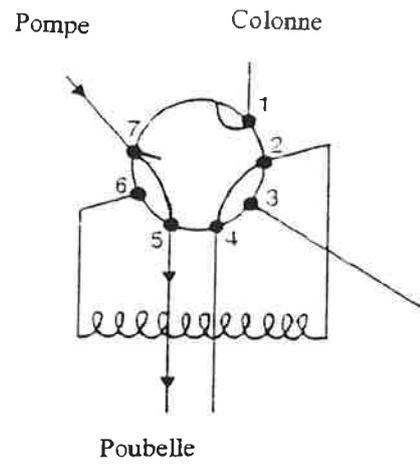
La vanne d'injection choisie est une vanne manuelle Valve V-7 de Pharmacia-Biotech. C'est une vanne à boucle qui permet d'injecter sous pression des quantités très reproductibles



Remplissage



Injection



Lavage

Figure III.6 : Positions de fonctionnement de la vanne d'injection "Valve V-7"
(Pharmacia-Biotech)

d'échantillons. Elle est placée entre la pompe et la colonne. Elle peut être utilisée dans trois positions différentes, comme l'indique la **figure III.6** :

- **Remplissage** : Cette position permet de rincer et de remplir la vanne avec l'échantillon à injecter à l'aide d'une seringue, sans arrêter l'alimentation de la colonne par l'éluant.
- **Injection** : Cette position permet de faire basculer l'éluant vers la boucle d'injection de manière à pousser l'échantillon qui s'y trouve sans introduction d'air et avec une parfaite étanchéité.
- **Lavage** : Cette position permet d'isoler la colonne ainsi que la boucle d'injection avec une parfaite étanchéité pour que la pompe puisse être lavée en cas de changement d'éluant. Elle peut également être utilisée pour alimenter directement les détecteurs sans passer par la colonne, ou pour alimenter un autre circuit.

2.1.7 MONTAGE DE L'ENSEMBLE

Les éléments nécessaires à l'analyse par C.E.S. choisis comme indiqué plus haut ont été assemblés dans un ordre bien précis pour constituer le système chromatographique présenté en **figure III.7**. L'éluant, placé dans un récipient, est aspiré par la pompe haute pression. Les bulles d'air pouvant augmenter considérablement la pression du circuit et gêner l'analyse, nous avons installé un dégazeur en ligne entre le réservoir d'éluant et la pompe. Ce dégazeur détecte les bulles d'air et les élimine avant qu'elles ne soient aspirées par la pompe dans le circuit. En sortie de pompe, nous avons installé un amortisseur de pulsations suivi d'un manomètre. Le premier sert, comme son nom l'indique, à amortir les pulsations de la pompe pour que la ligne de base soit régulière. Le second sert à contrôler la pression dans le circuit, ce qui permet de signaler les problèmes éventuels de colmatage ou de bouchage du circuit. La pompe est également munie d'un manomètre de sécurité intégré qui ne fournit pas de valeur de pression mais qui arrête la pompe en cas de dépassement de la consigne. Cette consigne a été fixée à la limite supérieure de la résistance de la colonne (30 bar). La sortie du manomètre est reliée à l'entrée de la vanne d'injection qui est elle-même directement reliée à la colonne. L'éluant en sortie de colonne arrive directement dans les détecteurs. Dans tous les cas, les

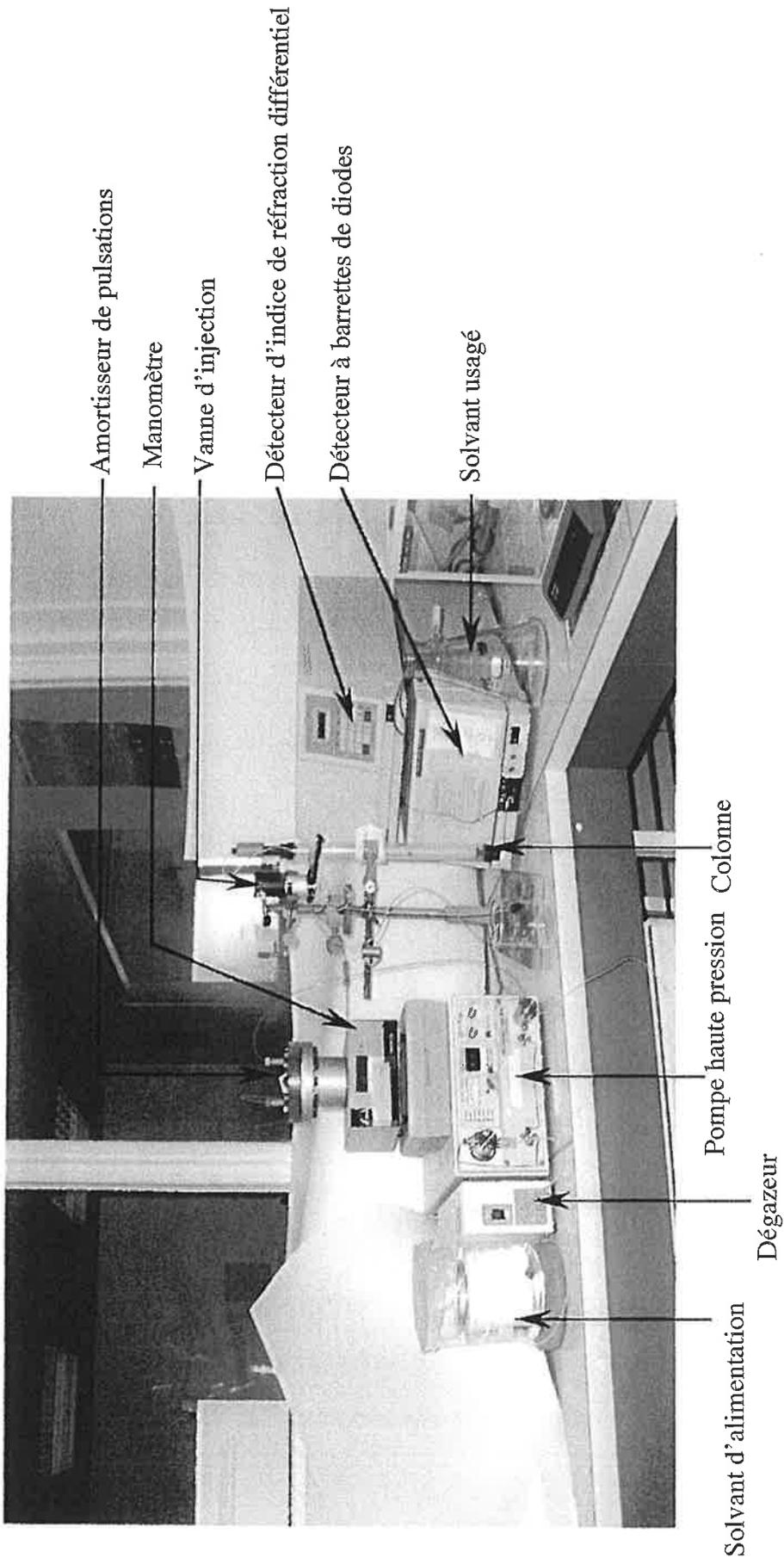


Figure III.7 : Système de chromatographie d'exclusion stérique que nous avons installé à l'ENSIA.

volumes des capillaires de liaisons sont les plus petits possibles pour minimiser les volumes morts.

Contrairement à la cellule du détecteur à barrettes de diodes, celle du réfractomètre est extrêmement fragile (prismes en verre collés). Il ne faut donc pas avoir de pertes de charge en aval de cette cellule. C'est pourquoi le réfractomètre doit toujours être placé en dernier dans un système de chromatographie. En sortie du réfractomètre, un récipient est prévu pour collecter l'éluant usagé. Les deux détecteurs fournissent un signal qui est transmis par des câbles IEEE vers un ordinateur. Celui-ci est muni d'un logiciel d'acquisition et de traitement des données Millennium 32, mis au point par la société Waters. Ce logiciel permet de tracer le signal de chaque détecteur en fonction du temps. Il permet donc de déterminer le temps de rétention des différents composés élués de la colonne et de tracer des chromatogrammes. Il permet aussi de tracer les courbes d'étalonnage suite à des injections successives d'étalons.

2.2 DETERMINATION DES CONDITIONS EXPERIMENTALES

Une fois le système d'analyse monté, restait à décider des conditions expérimentales les mieux adaptées aux analyses à effectuer. Nous avons décidé de travailler en régime isocratique et à débit constant pour obtenir des résultats précis et reproductibles. La détermination des différentes conditions expérimentales pour l'analyse est présentée ci-dessous.

2.2.1 TEMPERATURE

La température n'est pas un paramètre important en C.E.S. car elle n'affecte que très peu le mécanisme de fractionnement (Lesec 1994). Il est cependant recommandé de maintenir la température constante (proche de la température ambiante) pour avoir une bonne reproductibilité et stabilité. La colonne superose 12 HR 10/30 n'étant pas équipée d'enveloppe thermostatée, nous n'avons pas la possibilité de réguler ce paramètre. Nous

avons donc mené toutes les analyses à température ambiante ($20^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$) en considérant que les variations de celle-ci ont un impact négligeable sur les résultats d'analyse. Mais la température ayant une importance capitale sur la mesure de la DIR, nous avons régulé cette dernière à 35°C , valeur maximale possible du réfractomètre. Cette régulation permet d'éviter d'avoir des valeurs de DIR trop différentes entre les périodes d'été et d'hiver. Le détecteur à barrettes de diodes n'a pas de régulation de température car celle-ci influence peu les mesures d'absorbance.

2.2.2 VOLUME D'INJECTION

Le volume d'injection ne doit pas être trop important pour ne pas détruire les performances de la colonne. D'après pharmacia-Biotech, le volume d'injection doit être compris entre 0,5 % et 2 % du volume total de la colonne. Le volume de la colonne superose 12 HR 10/30 est de 24 mL environ (300 mm de hauteur sur 10 mm de diamètre interne), le volume d'injection doit donc être compris entre 12 μL et 480 μL . Nous avons choisi, parmi les boucles d'injection qui ont été fournies avec la vanne d'injection, un volume d'injection intermédiaire de 200 μL . L'injection manuelle est réalisée en même temps que le lancement de l'enregistrement au niveau des détecteurs.

2.2.3 LIMITE DE DETECTION ET GAMME DE LINEARITE DES DETECTEURS

Par définition, le domaine de linéarité d'un appareil de mesure est compris entre deux limites, supérieure et inférieure :

- La limite inférieure représente la concentration du soluté dont l'introduction directe dans la cellule donne un signal égal à deux fois le bruit de fond.
- La limite supérieure représente la concentration du soluté dont l'introduction directe dans la cellule donne un signal correspondant à un écart de linéarité de 5 % (Caude et Jardy 1995).

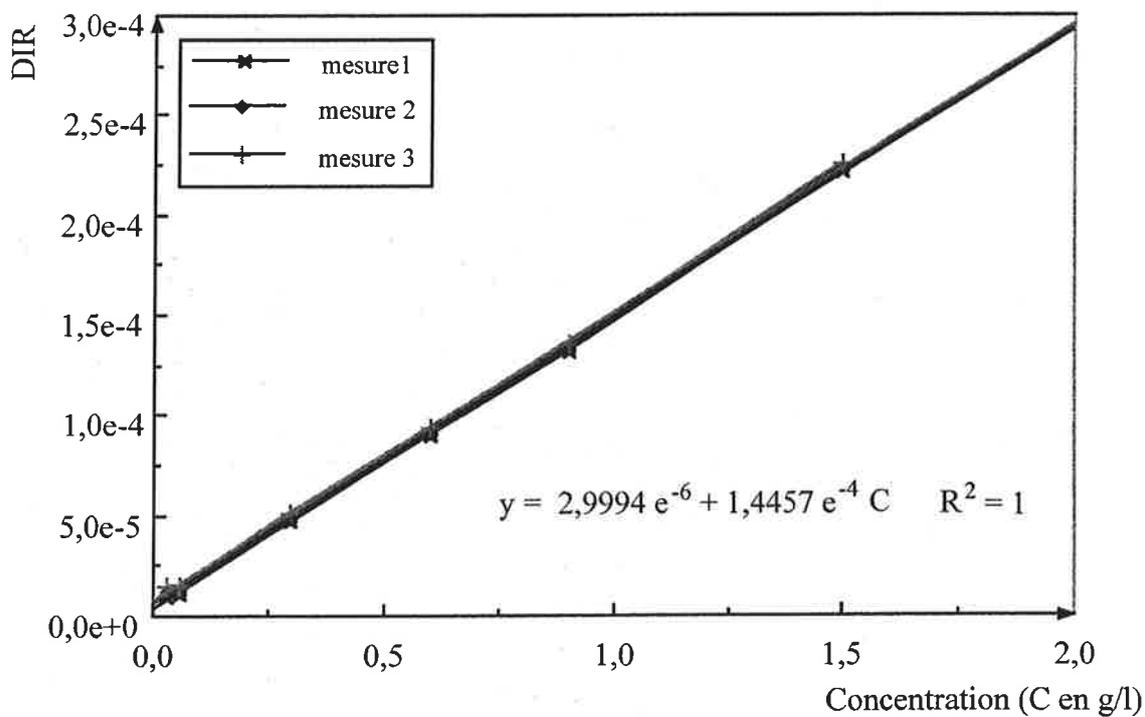
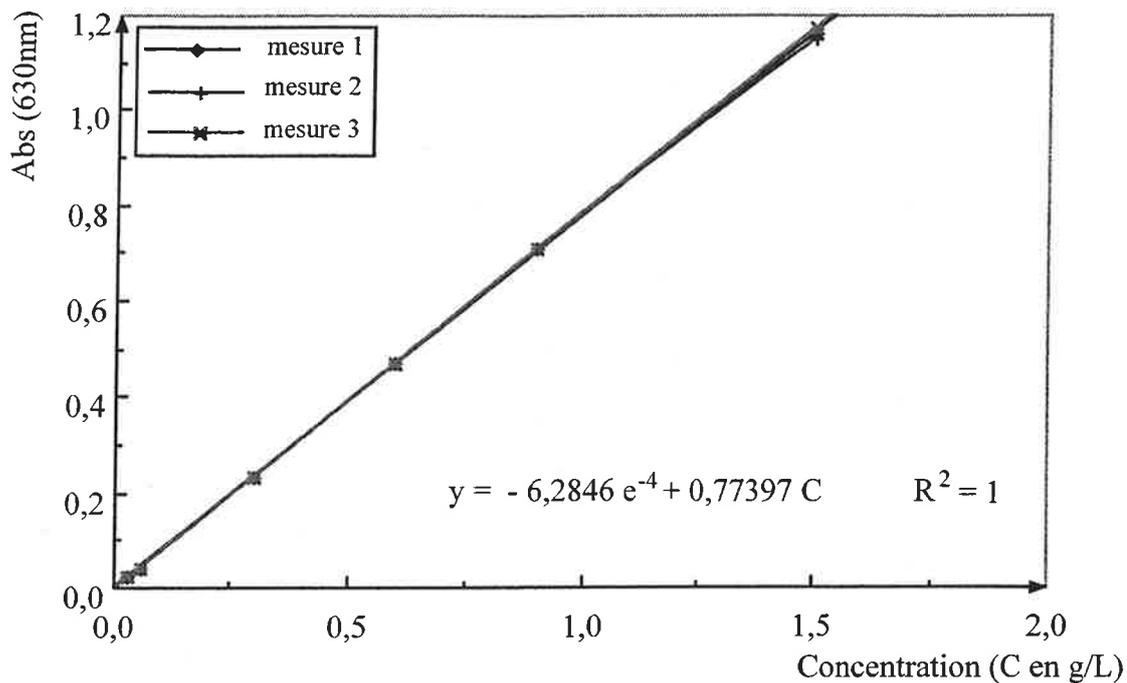


Figure III.8 : Gammes de linéarité des détecteurs (réfractomètre différentiel et D.B.D) déterminées avec du bleu dextran

Les bruits de fond enregistrés sur le réfractomètre et le D.B.D. sont respectivement de $\pm 5.10^{-7}$ unités d'indice de réfraction et de $\pm 1.10^{-3}$ unités d'absorbance. Les limites de détection de ces deux appareils sont donc respectivement de 1.10^{-6} unités d'indice de réfraction et 2.10^{-3} unités d'absorbance.

Afin de déterminer la gamme de linéarité des détecteurs, nous avons préparé des solutions de bleu dextran à des concentrations de (0,03 – 0,06 – 0,3 – 0,6 – 0,9 et 1,5 g/L). Ces concentrations ont été déterminées de manière à ce que le bleu dextran soit détecté par les deux appareils. Nous avons réalisé des injections successives de concentrations croissantes et à intervalles réguliers directement dans les détecteurs sans passer par la colonne (vanne d'injection en position lavage).

Nous avons alors relevé, aux sommets des pics obtenus par détection, les valeurs de DIR et d'absorbance. En traçant les deux courbes de DIR et d'absorbance à 630 nm (maximum du bleu dextran) en fonction de la concentration en bleu dextran, nous avons obtenu deux droites avec un coefficient de corrélation de 1 (**figure III.8**). Nous avons également vérifié cette linéarité avec du saccharose pour le réfractomètre, en testant des concentrations plus élevées jusqu'à 10 g/L. Nous sommes toujours restés dans la gamme de linéarité de l'appareil. A cette concentration (10 g/L), nous avons obtenu une DIR de $155,82 \cdot 10^{-5}$. Nous n'avons pas déterminé la limite supérieure de linéarité des détecteurs, mais si on reste dans la gamme étudiée, il n'y a pas de risque.

2.2.4 DEBIT

Un débit trop élevé engendre une contre-pression trop forte et une mauvaise résolution. Un débit trop faible améliore la résolution mais il est synonyme de temps d'analyse plus long. D'après Pharmacia-Biotech, un optimum de séparation est obtenu avec un débit de 0,3 à 0,5 mL/min pour la colonne superose 12 HR 10/30. Nous avons donc décidé de tester ces deux débits pour en fixer un.

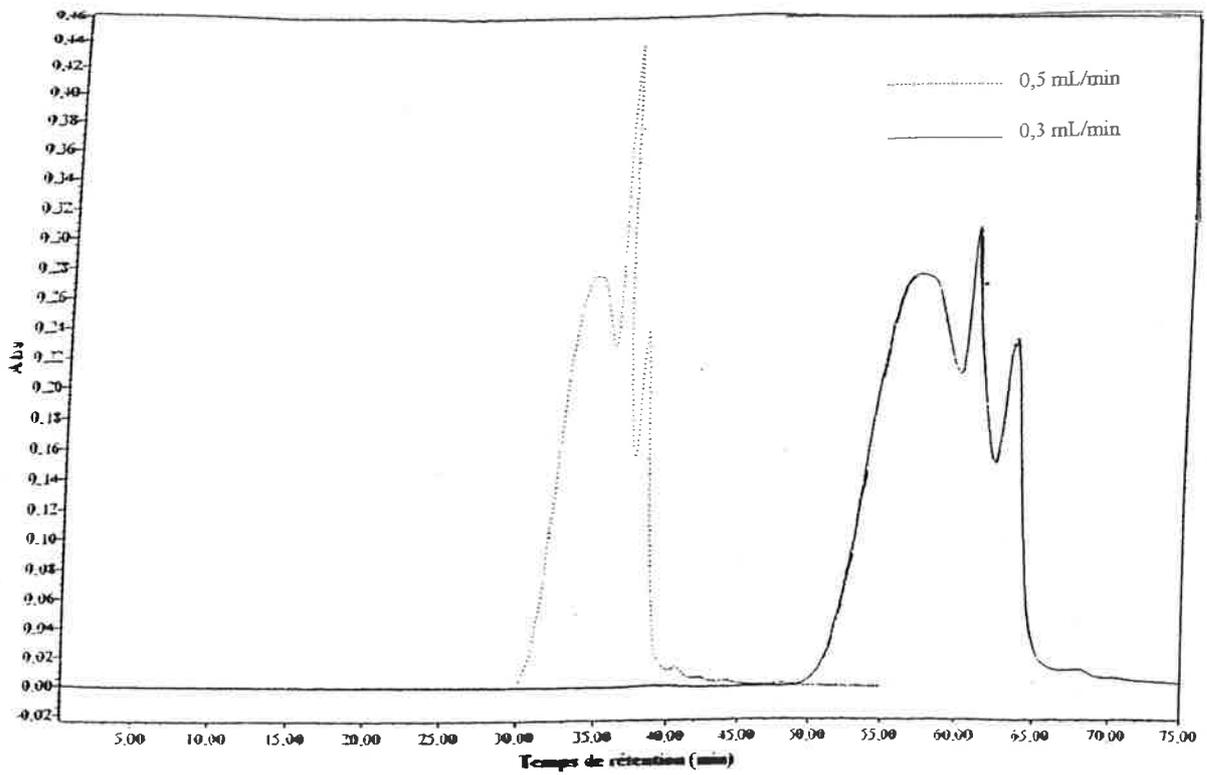


Figure III.9 : Chromatogrammes superposés à 300 nm des mélanoidines sur la colonne superose 12 HR 10/30 à deux débits différents (0,5 mL/min et 0,3 mL/min). Phase éluante : Tris à 0,05M et NaCl à 0,2M

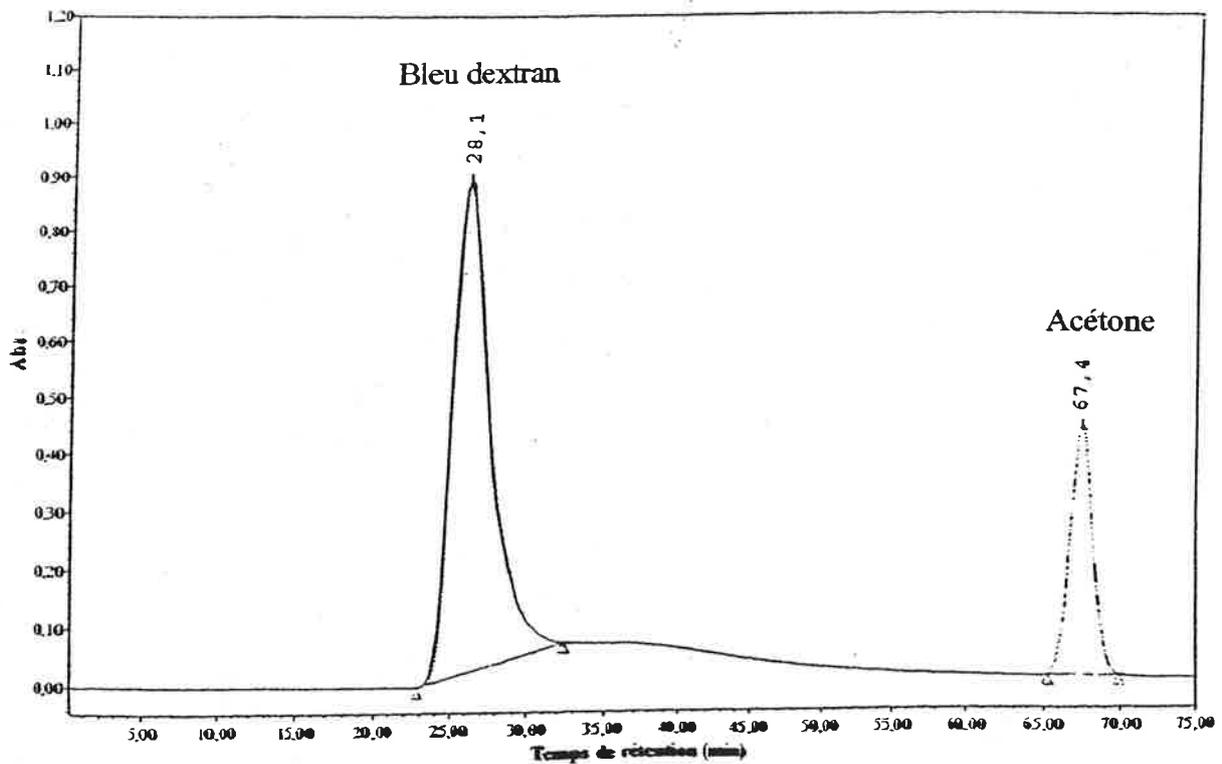


Figure III.10 : Chromatogrammes d'éluion à 260 nm du bleu dextran (2 g/L) et de l'acétone (0,5% v/v) à 0,3 mL/min sur la colonne superose 12 HR 10/30. Détermination des volumes mort et total poreux de la colonne. Phase éluante : Tris à 0,05M et NaCl à 0,2M

Nous avons choisi arbitrairement, parmi les colorants de fabrication préparés, les mélanoidines et nous les avons injectés dans la colonne à 0,3 mL/min puis à 0,5 mL/min. Nous avons ensuite comparé les chromatogrammes à 300 nm (maximum d'absorbance des mélanoidines), enregistrés par le D.B.D.. Le résultat est présenté en **figure III.9**. On constate tout de suite que, même si l'analyse à 0,3 mL/min est un peu plus longue, les pics sont plus larges et la séparation des composés est meilleure qu'à 0,5 mL/min. Nous avons donc décidé de faire toutes les analyses à ce débit.

2.2.5 VOLUME MORT ET VOLUME POREUX TOTAL DE LA COLONNE

Pour déterminer le volume mort (V_0) et le volume total poreux (V_t) de la colonne nous avons utilisé comme mentionné précédemment du bleu dextran et de l'acétone.

Il est utile de remarquer que pour obtenir un pic symétrique sans étalement, il est déconseillé d'injecter le bleu dextran à des concentrations supérieures à 2,5 g/L. Ce dernier est en effet très peu soluble en milieu aqueux à cause de ses propriétés hydrophobes. Les particules non solubilisées s'accrochent donc aux billes de gel et se décrochent tardivement, provoquant un étalement important du pic. Pour bien solubiliser ce composé, il faut chauffer légèrement (environ 40°C) la solution en agitant.

Nous avons donc préparé une solution contenant un mélange de bleu dextran (2 g/L) et d'acétone (0,5 % v/v) et l'avons injecté dans la colonne. Nous avons ainsi obtenu le chromatogramme à 260 nm (maximum d'absorbance de l'acétone et absorbance significative du bleu dextran), présenté en **figure III.10**. Les volumes, mort et total poreux de la colonne, ont été déterminés en relevant les temps de rétention au sommet des pics puis en calculant le volume, connaissant le débit. Les résultats obtenus indiquent que la gamme de fractionnement du gel est comprise entre 26,1 min et 67,4 min, d'où un volume mort de 7,83 mL et un volume total poreux de 20,22 mL. Dans ce qui suit, les résultats seront présentés en temps de rétention pour plus de commodité.

2.2.6 EFFICACITE DE LA COLONNE

L'efficacité d'une colonne de chromatographie, dont dépend l'étalement des pics, est mesurée pour chaque composé par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne. En assimilant les pics d'élution à des courbes de Gauss, on établit que le nombre de plateaux théoriques d'une colonne s'exprime, pour un soluté donné, par la relation :

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 \quad (\text{III.5})$$

- δ : Largeur du pic à sa mi-hauteur (min)
- t_R : Temps de rétention du soluté considéré mesuré au sommet du pic (min)

Il est utile de déterminer le nombre de plateaux théoriques d'une colonne de chromatographie, afin de voir s'il n'y a pas de volumes morts trop importants dans le système, créant des étalements excessifs des pics. On vérifie également que le remplissage de la colonne a été bien effectué et qu'il n'y a pas de passages préférentiels.

Pharmacia-Biotech spécifie que la colonne superose 12 HR 10/30 doit avoir un nombre de plateaux théoriques supérieur à 30000 plateaux par mètre. Nous avons calculé ce nombre de plateaux expérimentalement, pour un chromatogramme à 260 nm de l'acétone (à 0,5 % v/v), et nous avons trouvé $N = 32600$ plateaux par mètre. Ceci indique que nous utilisons cette colonne dans de bonnes conditions.

2.2.7 PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les analyses de chromatographie d'exclusion stérique ont été réalisées avec les colorants de fabrication modèles que nous avons préparés (cf. chapitre II), tels qu'ils ont été conservés. Les détections dans l'UV et le visible ne peuvent avoir lieu simultanément car la dilution des échantillons nécessaire n'est pas la même dans les deux domaines. Nous avons choisi de

travailler dans l'UV car, comme il a été montré au chapitre II, on y voit mieux la différence entre les colorants. Par des essais préliminaires, nous avons déterminé, en tenant compte de la dilution apportée par le trajet dans la colonne, qu'il fallait diluer les caramels 50 fois, les mélanoidines 100 fois et les PDAH à 3 mL dans 50 mL afin d'avoir une bonne détection dans l'UV. L'acétone a été injecté à 1 % v/v. Tous les échantillons à analyser sont dilués dans l'éluant, avant d'être injectés dans la colonne

Tous les échantillons, ainsi que les phases éluantes, ont été au préalable filtrés avec des membranes de 0,45 μm , puis dégazés aux ultrasons (bac à ultrasons : Branson 5200) avant toute injection. Les membranes de 0,45 μm sont des membranes Millipore de deux types. Les premières de type (HAWP Millipore) sont pour les phases aqueuses, et les secondes de type (Durapore HVLP Millipore), résistantes, sont pour les phases organiques.

2.2.8 RESUME DES CONDITIONS OPERATOIRES CHOISIES

Pour résumer les choix décrits plus haut, l'éluant est composé de Tris à 0,05M avec du NaCl à 0,2M. Le volume de la boucle d'injection est de 200 μL et le débit de circulation de l'éluant dans le système est de 0,3 mL/min. Nous avons fixé le temps de détection à 75 min, légèrement supérieur au temps de rétention de l'acétone (67,7 min), qui délimite le volume total poreux de la colonne.

A chaque analyse, les chromatogrammes UV des colorants et de l'acétone sont visualisés à partir des enregistrements du D.B.D.. Ceux des caramels sont à 285 nm, ceux des mélanoidines à 300 nm, ceux des PDAH à 265 nm et ceux de l'acétone à 260 nm.

3. MISE EN EVIDENCE DE PHENOMENES D'INTERACTIONS ET RECHERCHE DE SOLUTIONS

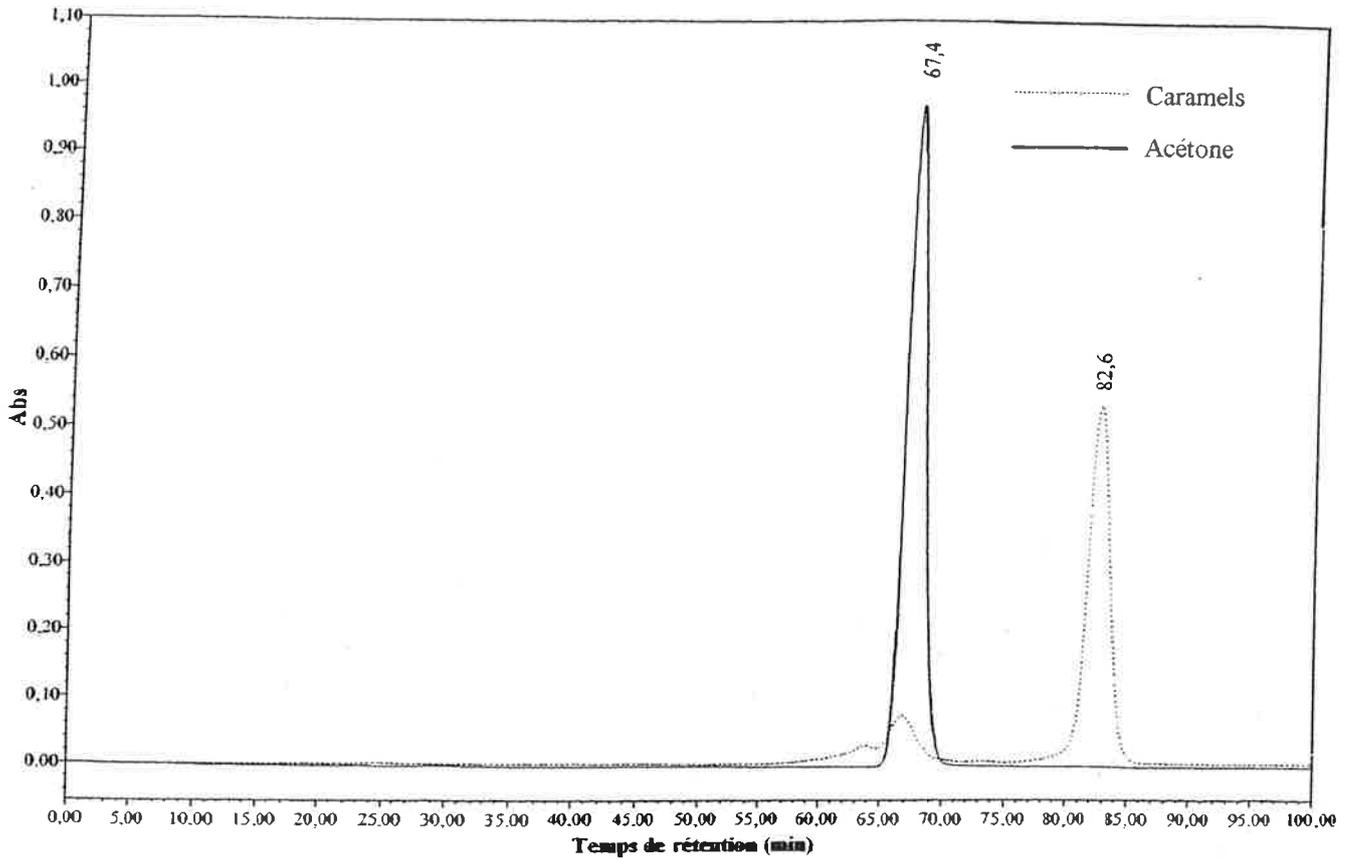


Figure III.11 : Chromatogrammes superposés des caramels (285 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30. Phase éluante : Tris à 0,05M et NaCl à 0,2M

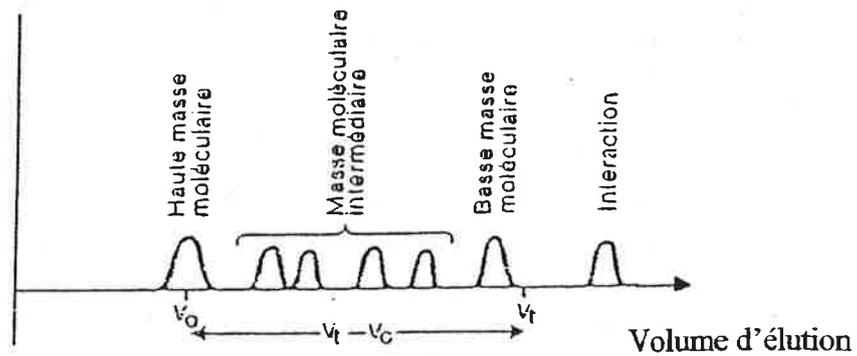


Figure III.12 : Distribution des masses molaires dans un chromatogramme d'exclusion stérique. Présence d'interactions
(Pharmacia 1971)

Lors de l'analyse des colorants, nous avons tout de suite constaté des phénomènes d'interactions entre la matrice de gel et les colorants. Nous avons alors essayé de comprendre l'origine de ces interactions et avons tenté d'y remédier de différentes façons que nous décrivons ci-dessous.

3.1 MISE EN EVIDENCE DE PHENOMENES D'INTERACTIONS ENTRE LE GEL SUPEROSE 12 ET LES COLORANTS

Dans un premier temps, nous avons effectué deux injections successives des caramels, afin de nous assurer de la répétabilité. Nous avons alors constaté au cours de la deuxième injection, l'apparition d'un pic au tout début du chromatogramme (285 nm), avant même le pic du bleu dextran représentant le volume mort. Le spectre au sommet de ce pic a un maximum d'absorbance à 285 nm et présente la même allure que celui des caramels. Nous avons donc soupçonné ce pic de provenir de la première injection et de sortir au-delà du volume total poreux du gel. Pour nous assurer de ce résultat, nous avons effectué une troisième injection des caramels et nous avons augmenté le temps de détection à 100 min, afin d'enregistrer le pic retardé. La **figure III.11** présente le chromatogramme à 285 nm obtenu, superposé avec celui de l'acétone à 260 nm injecté dans les mêmes conditions. On constate que les caramels présentent deux pics principaux, le premier (**pic 1**) coïncide avec le pic d'acétone et le deuxième (**pic 2**) sort bien après celui-ci. Ceci indique que ce deuxième pic de caramels présente des interactions avec le gel superose 12. En effet, d'après (Pharmacia 1979), aucune molécule ne doit sortir après le volume poreux total d'une colonne de C.E.S.. Si c'est le cas, il y a des phénomènes d'interactions entre cette molécule et le gel (**figure III.12**). Dans le cas d'interactions, ce n'est plus le phénomène d'exclusion stérique qui intervient seul. En effet, les molécules ne sont plus séparées selon leurs tailles ou leurs configurations spatiales mais selon leurs affinités vis-à-vis de la matrice de gel. Dans ce cas, on ne peut plus parler de mesure de masses molaires.

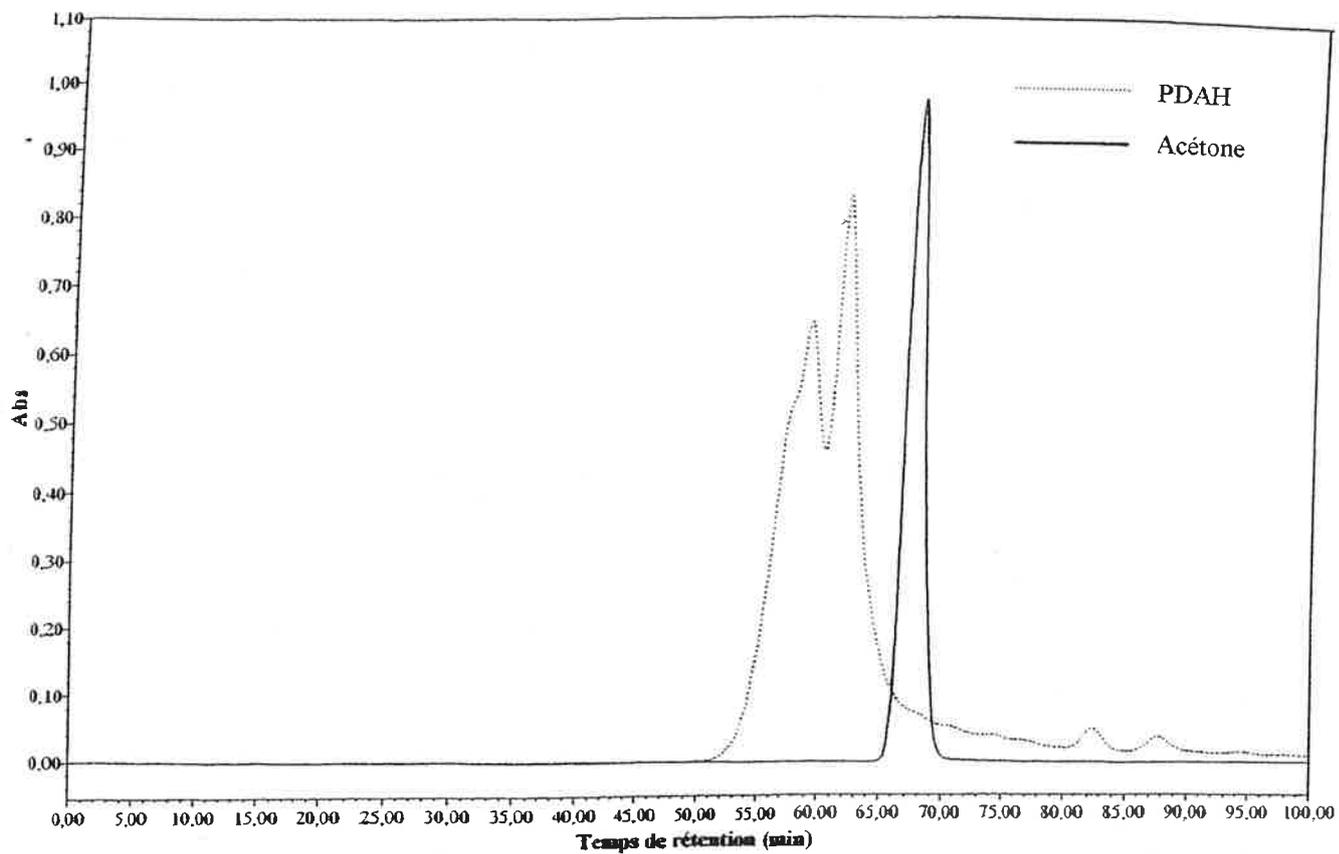


Figure III.13 : Chromatogrammes superposés des PDAH (265 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30. Phase éluante : Tris à 0,05M et NaCl à 0,2M

Nous avons présenté en **figure III.13** le chromatogramme à 265 nm issu de l'injection des PDAH, superposé avec celui de l'acétone à 260 nm injecté dans les mêmes conditions. Nous constatons pour ces colorants, des pics élués au-delà du volume total de la colonne. Cependant, contrairement aux caramels, ces pics ont des intensités d'absorbance faibles par rapport à ceux qui sont élués dans le volume total poreux de la colonne.

Notre objectif étant de déterminer les masses molaires des colorants, ces phénomènes d'interactions sont particulièrement gênants. Compte tenu de la complexité des produits qui composent les colorants de fabrication (cf. : chapitre I), et du fait que beaucoup d'entre eux ne sont pas encore identifiés, il n'était pas aisé de déterminer les types d'interactions impliquées.

En considérant la matrice du gel, on se rend compte que c'est un gel qui peut présenter des interactions spécifiques avec certaines molécules. En effet, d'après Determann (1969), l'agarose naturel extrait d'une algue rouge se compose de deux parties, l'agarose neutre constituant principal et l'agaropectine, qui contiendrait tous les groupements carboxyles et sulfates de la gélose. Ces groupements peuvent provoquer dans le gel d'agar, une adsorption considérable pour certains composés. Nous avons donc essayé dans ce qui suit, d'éliminer ces phénomènes d'interactions par modification de la composition de la phase éluante.

3.2 PEUT-ON ELIMINER CES D'INTERACTIONS PAR MODIFICATION DE LA PHASE ELUANTE ?

Ne connaissant pas la nature exacte de tout ce qui compose les colorants, nous ne pouvons déterminer a priori s'il s'agissait d'interactions ioniques, d'interactions hydrophobes ou encore d'affinités spécifiques entre certaines molécules. Pour balayer les trois possibilités, nous avons tout d'abord modifié la force ionique de la phase éluante, puis sa polarité. Enfin, nous avons introduit dans la phase éluante, des composés qui entreraient éventuellement en compétition avec les composés des colorants, pour interagir avec la matrice de gel.

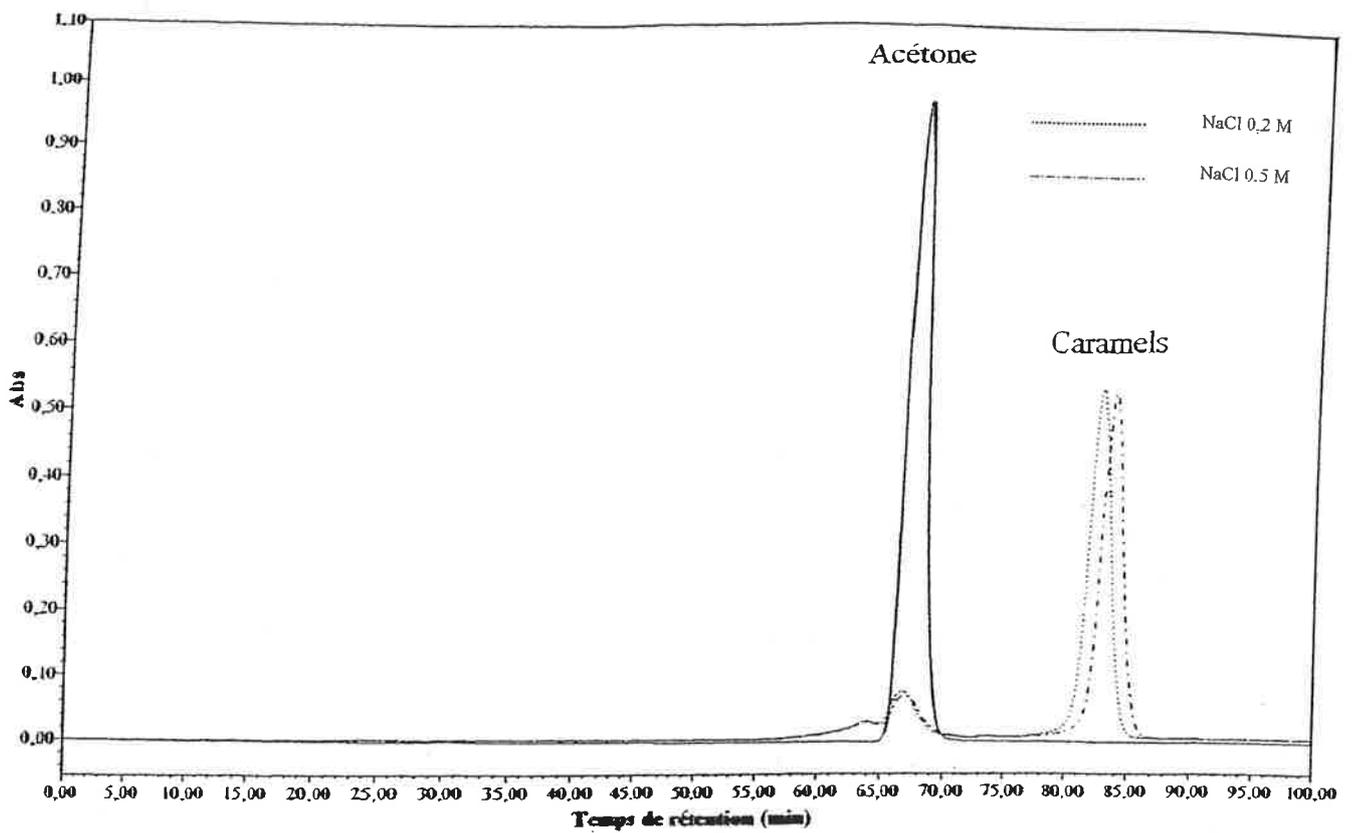


Figure III.14 : Chromatogrammes superposés des caramels (285 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30.
Phase éluante : Tris à 0,05M avec NaCl à 0,2M et 0,5M

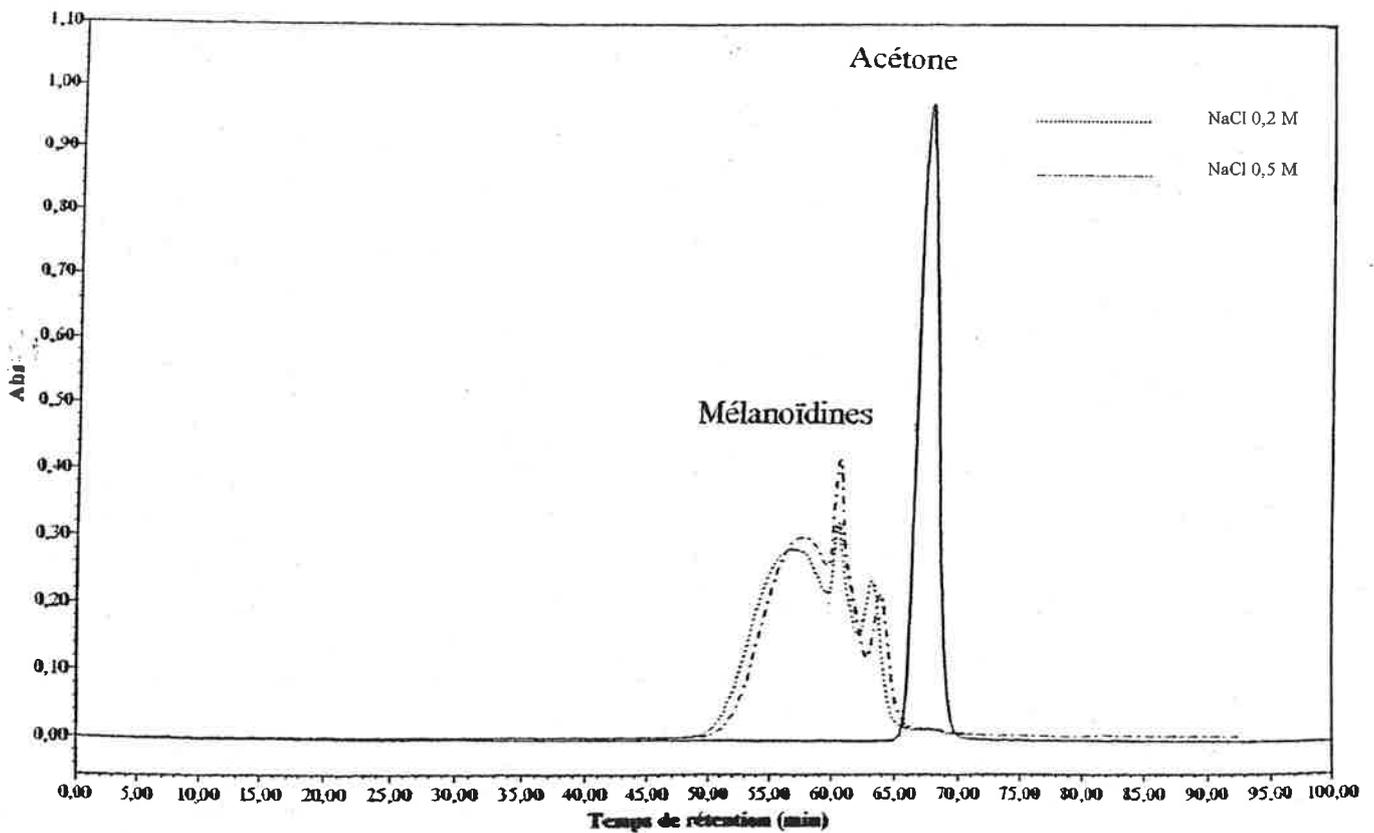


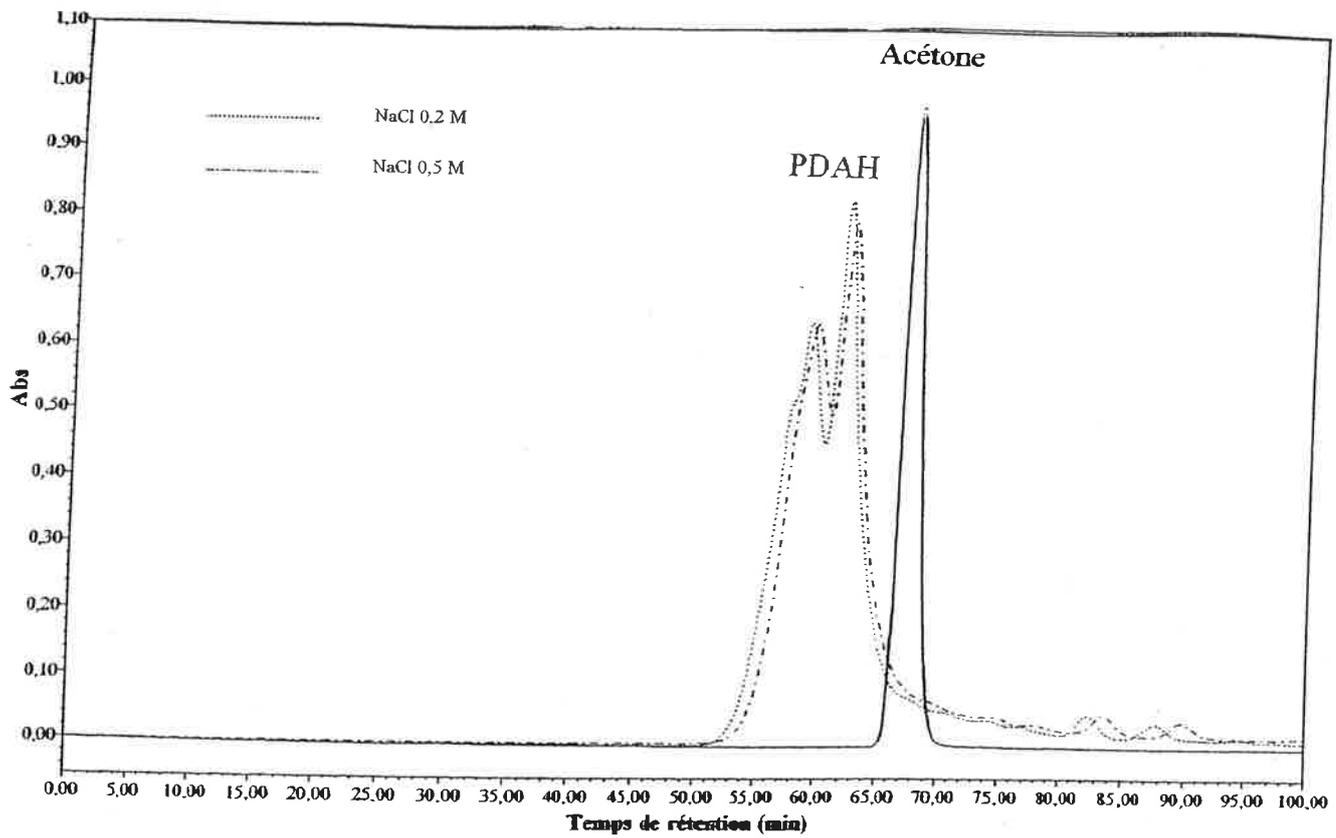
Figure III.15 : Chromatogrammes superposés des mélanoïdines (300 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30.
Phase éluante : Tris à 0,05M avec NaCl à 0,2M et 0,5M

3.2.1 MODIFICATION DE LA FORCE IONIQUE

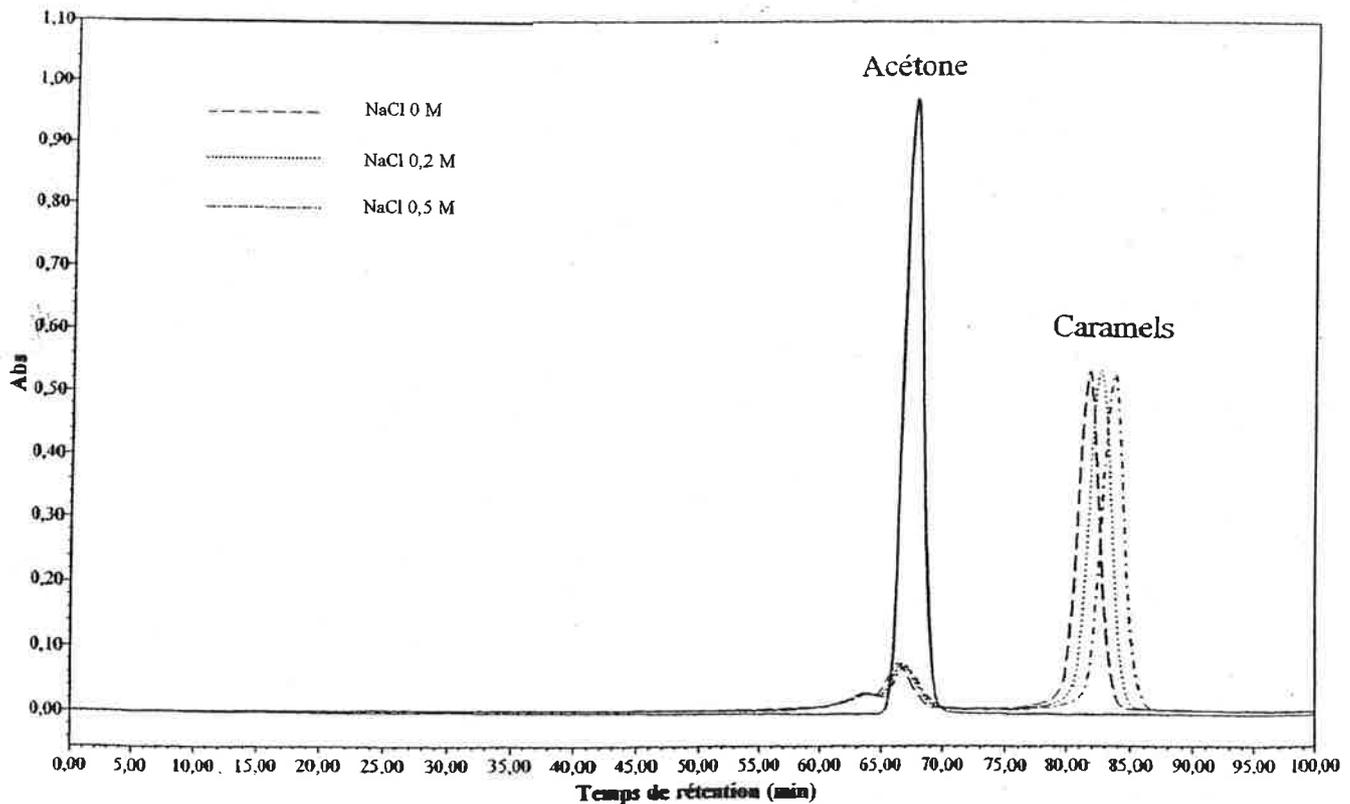
La première possibilité envisagée était des interactions ioniques. Nous avons donc augmenté la concentration ionique de la phase éluante pour voir si ces ions ajoutés entrent en concurrence avec les composés des colorants vis à vis des interactions avec le gel. Nous avons, pour cela, augmenté la concentration de NaCl à 0,5 mol/L dans l'éluant et nous avons injecté les caramels, les mélanoidines et les PDAH ainsi que l'acétone. Les **figures III.14, III.15 et III.16** représentent les chromatogrammes respectifs des caramels à 285 nm, des mélanoidines à 300 nm et des PDAH à 265 nm, superposés à chaque fois avec celui de l'acétone à 260 nm, ce dernier étant désormais l'élément de comparaison principal. Cette augmentation en concentration de sel n'a aucune influence sur le temps de rétention de l'acétone. Par contre, l'augmentation de la concentration en sel dans la phase éluante engendre un retard de tous les pics des colorants, ceux élués avant V_t (volume total poreux de la colonne), et ceux élués après V_t .

D'après Janson (1967), l'intensité des interactions d'un composé, par rapport à une phase stationnaire donnée, est évaluée par le temps de rétention. Plus celui-ci est grand, plus les interactions, entre le composé et la phase stationnaire, sont importantes. On raisonne différemment avec les composés élués après V_t , pour lesquels la présence d'interactions est évidente, et ceux élués avant V_t où les interactions ne sont pas réellement mises en évidence.

Les composés des caramels et des PDAH élués après V_t sont retardés par augmentation de la concentration en sel de la phase éluante. L'augmentation de la force ionique favorise donc les interactions mises en jeu entre ces composés et le superose 12, ce qui ne serait pas le cas si les principales interactions mises en jeu étaient justement de type ionique.



**Figure III.16 : Chromatogrammes superposés des PDAH (265 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30.
Phase éluante : Tris à 0,05M avec NaCl à 0,2M et 0,5M**



**Figure III.17 : Chromatogrammes superposés des caramels (285 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30.
Phase éluante : Tris à 0,05 M sans NaCl et avec NaCl 0,2 M et 0,5 M**

Concernant les composés des trois colorants élués avant V_t , deux possibilités sont à considérer :

- si les interactions ont lieu dans cette zone, on se retrouve dans le même cas que celui des composés élués après V_t où l'augmentation de la force ionique augmente les interactions.
- si les interactions sont inexistantes dans cette zone, on en déduit que la force ionique engendre un phénomène de rétraction des molécules, diminuant ainsi leurs tailles. Williams (1974) a également observé cet effet de rétrécissement des mélanoidines sous l'effet de la force ionique, en analysant ces colorants avec une colonne de sephadex G-50.

Nous avons tenté une injection des caramels avec un éluant constitué uniquement du Tris sans ajout de NaCl. Le résultat qui s'illustre dans le chromatogramme à 285 nm présenté en **figure III.17** montre que les composés élués après V_t ont un temps de rétention plus faible en absence de NaCl qu'en sa présence. Cependant, ces composés sont toujours élués après V_t et le problème d'interactions est toujours présent.

Ces résultats montrent qu'une augmentation de la force ionique de la phase éluante favorise les interactions. Par sa solvataion, le sel diminue la quantité de molécules d'eau libre qui entourent les colorants (Rosset *et al.*, 1991). Ces derniers se trouvent apparemment plus attirés par la matrice du gel. Une augmentation de la rétention des colorants par augmentation de la concentration en sel peut éventuellement signifier que ces colorants présentent des interactions hydrophobes avec la matrice de gel. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons décidé de diminuer la polarité de la phase d'éluion.

3.2.2 MODIFICATION DE LA POLARITE

Nous avons choisi, dans ce qui suit de travailler uniquement avec les caramels et de valider ensuite les résultats, s'ils sont concluants, avec les deux autres colorants.

Pour déterminer la présence d'interactions, nous avons toujours comparé l'injection des caramels avec celle de l'acétone dans les mêmes conditions. Ceci est très important puisqu'un

Tableau III.2 : Temps de rétention des caramels élués après V_t et de l'acétone pour différentes compositions de la phase éluante. Modification de la polarité

| Phase éluantes | t_{RC} (min) | t_{RA} (min) | Δt_R (min) |
|---|----------------|----------------|--------------------|
| Tris 0,05M sans NaCl | 81,7 | 67,4 | 14,3 |
| Acétonitrile (30 %) + Acétate d'ammonium (0,015M) | 71,9 | 66,8 | 5,1 |
| Acétonitrile (40 %) | 69,6 | 66,1 | 3,5 |
| Ethanol (40 %) | 75,9 | 67,9 | 8,0 |
| Acétonitrile (30 %) + éthanol (20 %) | 69,2 | 65,7 | 3,5 |
| Acétonitrile (30 %) + éthanol (40 %) | 68,6 | 65,8 | 2,8 |
| Acétonitrile (30 %) + éthanol (60 %) | 71,5 | 66,7 | 4,8 |
| Acétonitrile (45 %) | 68,5 | 65,2 | 3,3 |

Remarque : Toutes les phases éluantes présentées dans ce tableau ont été préparées en phase aqueuse et les pourcentages sont des pourcentages en volume.

changement de la phase éluante peut engendrer des phénomènes de gonflement du gel, faisant varier ainsi le volume total poreux de la colonne.

Nous avons donc défini un terme Δt_R qui représente la différence entre le temps de rétention des composés des caramels élués après le volume total poreux de la colonne (**pic 2**) et le temps de rétention de l'acétone, injecté avec une même phase éluante et dans les mêmes conditions.

$$\Delta t_R = t_{RC} - t_{RA} \quad (\text{III.6})$$

- t_{RC} : temps de rétention du **pic 2** des caramels (min)
- t_{RA} : temps de rétention de l'acétone (min)

Ce terme est notre élément de comparaison entre les différentes phases éluantes testées, pour évaluer l'intensité des interactions.

L'intérêt de diminuer la polarité de l'éluant est de créer des interactions apolaires entre cette phase et le gel. Ces interactions pourraient entrer en compétition avec celles des colorants. De plus, il peut se créer des interactions « phase éluante–colorants », retenant ainsi ces derniers dans la phase éluante. Lorsque nous parlons de diminuer la polarité de la phase éluante, nous sous-entendons l'ajout de certains solvants moins polaires que l'eau, à des pourcentages donnés mais toujours en phase aqueuse. En effet, pour des raisons de compatibilité et de résistance du gel, nous n'avons pas pu tester des solvants très apolaires comme le tétrahydrofurane ou le diméthylsulfoxyde. De plus les colorants y sont insolubles.

Nous avons regroupé dans le **tableau III.2**, pour chaque phase d'éluion testée, les différents temps de rétention de l'acétone, des caramels élués après V_t et les Δt_R qui en découlent. Nous avons également reporté sur ce tableau, à titre comparatif, les résultats obtenus avec le **pic 2** des caramels élué avec le Tris sans NaCl.

Acétonitrile

Bento et Sa (1998) ont utilisé le même type de colonne avec le même type de colorants sans mentionner de problèmes d'interactions. Il ont utilisé comme phase éluante de l'acétonitrile à 30 % v/v dans de l'eau avec 0,015 mol/L d'acétate d'ammonium. D'après l'échelle de polarité des solvants, établie par Rohrschneider (Caude et Jardy 1994), l'acétonitrile est moins polaire que l'eau. Nous avons donc décidé, dans un premier temps, de tester ce solvant. L'acétonitrile utilisé est le A/0627/15 pour analyses de chromatographie (Fisher chemicals).

Les résultats obtenus avec l'acétonitrile à 30 % v/v et l'acétate d'ammonium à 0,015 M sont meilleurs qu'avec le Tris dans l'eau. En effet, on trouve un Δt_R de 5,1 min contre 14,3 min pour le Tris dans l'eau (**tableau III.2**). Ceci indique que l'acétonitrile diminue les interactions mais ne les élimine pas. En effet, le **pic 2** des caramels est toujours élué après l'acétone.

Des tests que nous avons effectués ont montré que l'acétate d'ammonium n'a aucun effet sur les temps de rétention. Nous avons donc augmenté la concentration en acétonitrile à 40 % v/v sans ajout d'acétate d'ammonium. Toutefois, il faut noter que des essais ont montré, qu'à cette concentration d'acétonitrile, les dextrans ne sont plus solubles. Ceci implique que si le problème d'interactions est résolu avec ce solvant, il faudra reconsidérer le choix des étalons. Le Δt_R avec l'acétonitrile à 40 %v/v n'est plus que de 3,5 min, mais des interactions ont toujours lieu. Il a été impossible d'augmenter encore la concentration en acétonitrile car, d'après Pharmacia Biotech, le gel superose 12 peut ne pas résister.

Ethanol

Pensant que les améliorations apportées par l'acétonitrile étaient dues à la diminution de polarité de l'éluant, nous avons recherché un solvant plus apolaire que l'acétonitrile. Nous avons choisi l'éthanol et nous l'avons utilisé à même concentration (40 % v/v). L'éthanol utilisé est de l'éthanol 200 578 6, absolu analypur à 99,7 % (Fisher chemicals). Les résultats

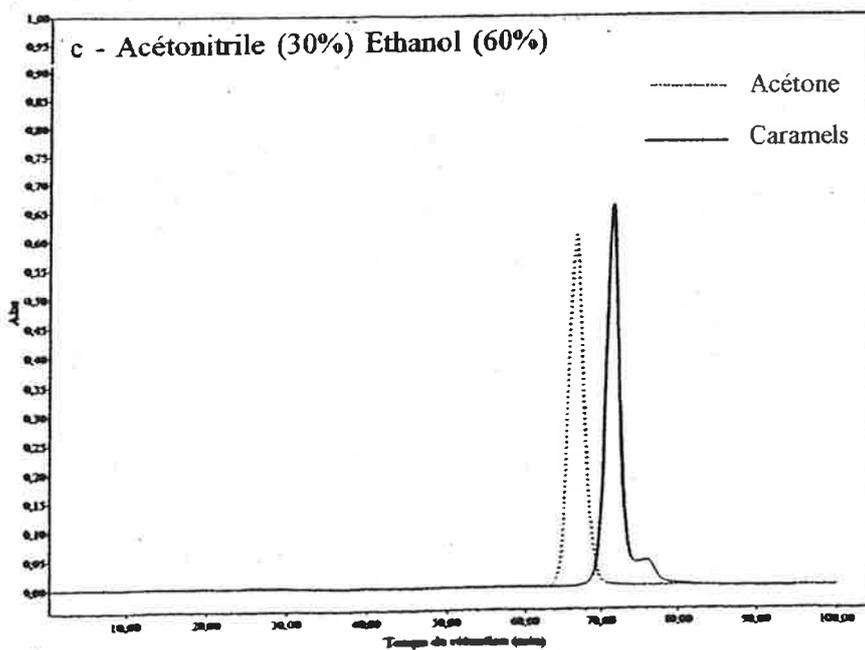
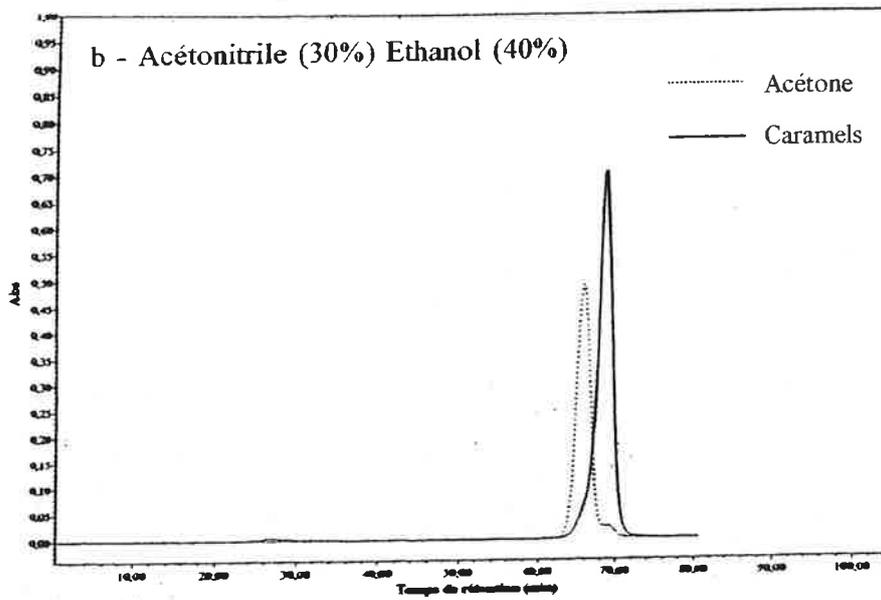
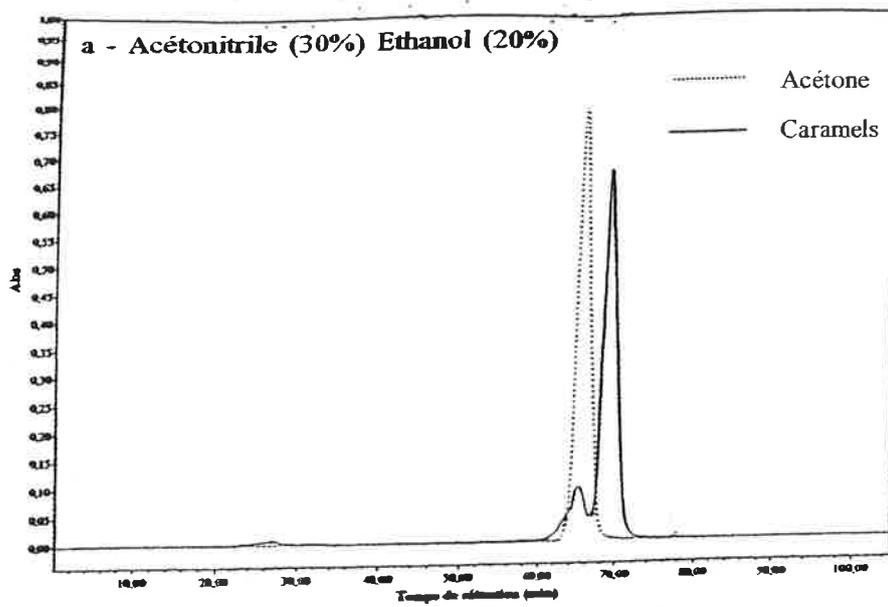


Figure III.18 : Chromatogrammes superposés des caramels (285 nm) et de l'acétone (260 nm) avec la colonne superose 12 HR 10/30.
Phase éluante : mélange Acétonitrile avec 20%, 40% et 60% v/v d'Ethanol

obtenus ne correspondaient pas du tout à notre attente puisque le Δ_{tr} est de 8 min (**tableau III.2**).

Puisque les résultats obtenus avec l'acétonitrile et l'éthanol sont tous deux meilleurs qu'avec le Tris dans l'eau, nous avons tenté un mélange en phase aqueuse, de l'acétonitrile à 30 % avec différentes proportions d'éthanol (20, 40, puis 60 %). Les **figures III.18.a, b et c** représentent les chromatogrammes superposés des caramels à 285 nm et de l'acétone à 260 nm, pour 30 % d'acétonitrile avec respectivement 20, 40 et 60 % v/v d'éthanol.

La **figure III.18.a** montre que l'ajout de 20 % d'éthanol n'améliore pas le Δ_{tr} du **pic 2** qui reste égal à celui obtenu avec l'acétonitrile à 40 % seul (**tableau III.2**). Dans la **figure III.18.b**, un seul pic apparaît présentant un Δ_{tr} par rapport à l'acétone de 2,8 min. La **figure III.18.c** montre que le **pic 1** est retardé par l'augmentation de la concentration en éthanol puisqu'il est élué après le **pic 2**. On remarque d'ailleurs que dans ces conditions, le **pic 1** présente des interactions avec le gel puisqu'il est élué après l'acétone. Le retardement du **pic 1** avec l'augmentation de la concentration en éthanol explique l'unique pic obtenu en **figure III.18.b**. En effet, il représente une co-élution des **pic 1** et **pic 2** des caramels. La diminution de la polarité ne paraît donc pas être la solution à notre problème d'interactions.

A ce stade, l'acétonitrile reste le solvant qui donne les meilleurs résultats. Nous l'avons donc testé à 45 %, malgré la mise en garde de Pharmacia-Biotech concernant la résistance du gel. Le Δ_{tr} diminue alors à 3,3 min (**tableau III.2**). Cependant, nous avons constaté que le gain en temps de rétention n'est pas linéaire et a tendance à se stabiliser pour former un plateau à partir de 40 % d'acétonitrile. Par conséquent, le fait de concentrer davantage l'acétonitrile ne servirait à rien, sinon à détériorer le gel.

La modification de la phase éluante par augmentation de la force ionique ou diminution de la polarité n'empêche pas les interactions entre les caramels et le gel superose 12. Nous avons

Tableau III.3 : Temps de rétention des caramels élués après V_t et de l'acétone pour différentes compositions de la phase éluante. Étude des interactions moléculaires spécifiques

| Phase éluantes | t_{RC} (min) | t_{RA} (min) | Δt_R (min) |
|---|----------------|----------------|--------------------|
| Urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) à 8 M | 70,0 | 66,5 | 3,5 |
| Acétonitrile 40 % et Urée 8 M | 67,5 | 66,2 | 1,3 |
| Sulfates d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 0,015 M | 82,7 | 68,2 | 14,5 |
| Tétraméthylammonium chlorure $(\text{CH}_3)_4\text{NHCl}$ à 0,1 M | 82,5 | 67,9 | 14,6 |

Remarque : Toutes les phases éluantes présentées dans ce tableau ont été préparées en phase aqueuse.

donc décidé, dans ce qui suit, d'étudier la troisième possibilité d'interactions envisagée, à savoir les interactions spécifiques entre les molécules.

3.2.3 ETUDE DES INTERACTIONS MOLECULAIRES SPECIFIQUES

Dans cette partie, nous avons également testé plusieurs phases éluantes contenant des composés censés, pour différentes raisons, empêcher les interactions. Nous avons suivi exactement la même présentation que pour la modification de la polarité. C'est-à-dire que nous avons regroupé dans le **tableau III.3**, pour chaque phase d'éluion testée, les différents temps de rétention de l'acétone, des caramels élués après V_t et les Δt_r , en nous basant sur l'équation III.6, présentée plus haut.

Urée

La composition chimique du gel superose est proche de celle du sephadex. En effet ce sont tous deux des gels de polysaccharides. Le superose est un polymère de galactose, tandis que le sephadex est constitué de dextrans, polymères de glucose. Nous n'avons pas rencontré dans nos recherches bibliographiques beaucoup d'études concernant le superose. Par contre, plusieurs auteurs mentionnent des problèmes d'interactions entre des colorants et le sephadex et indiquent que ces interactions peuvent être supprimées par l'utilisation de l'urée 8 M comme phase d'éluion. En effet, Williams (1974) préconise l'utilisation de l'urée 8 M pour éviter les phénomènes d'interactions lors de l'analyse par C.E.S. des mélanoidines avec du sephadex G 50. Cookson *et al.*, (1971) indiquent aussi que tous les phénomènes d'interactions sont éliminés par utilisation de l'urée 8 M en analyse de C.E.S. des colorants de sucrerie avec les sephadex G-25 et G-50 ». Enfin, Parker et Williams (1968) ont testé plusieurs phases d'éluion pour l'analyse des colorants anioniques de sucrerie avec le sephadex G-25. Ils ont montré qu'avec l'urée 8 M les interactions ont été supprimées. Puisque l'utilisation de l'urée a permis de supprimer les interactions des colorants avec le sephadex et que les deux

gels superose et sephadex sont proches chimiquement, nous avons décidé de tester l'urée 8 M avec le superose.

Avec l'urée 8 M comme phase d'éluion, nous obtenons exactement le même résultat qu'avec l'acétonitrile à 40 % puisque le Δ_{tr} , est le même (3,5 min) (**tableau III.1 et 2**). Ceci montre que, contrairement au cas du sephadex, l'urée 8 M n'élimine pas les interactions entre les colorants et le superose 12. La concentration de l'urée au-delà de 8 M est impossible du fait des risques de précipitation dans les capillaires et la pompe du système d'analyse.

Les meilleurs Δ_{tr} ont été obtenus avec l'urée 8 M et l'acétonitrile 40 %. Ceci peut s'expliquer par la similitude (fort moment dipolaire) de la structure chimique de l'urée ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) et de celle de l'acétonitrile (CH_3CN). Mais l'utilisation de ces composés à des concentrations plus importantes n'est pas conseillée pour des raisons évoquées plus haut. Par contre, l'utilisation d'un mélange d'urée 8 M et d'acétonitrile 40 % comme phase éluante peut être envisagée. Nous avons alors testé ce mélange et le Δ_{tr} obtenu est de 1,3 min (**tableau III.3**). C'est le meilleur résultat obtenu jusque-là, mais les interactions sont toujours présentes.

Sulfates d'ammonium et tétraméthylammonium chlorure

La différence majeure entre le sephadex et le superose est que le premier est produit par polymérisation synthétique du glucose, alors que le deuxième existe tel quel dans la nature. Il est extrait d'algues rouges et contient des groupements sulfates naturels responsables d'interactions, ce qui expliquerait probablement que l'urée 8 M ne supprime pas les interactions avec le gel superose. Pour éventuellement neutraliser l'action des groupements sulfates, nous avons testé deux sels en phase aqueuse :

- du sulfate d'ammonium (A 4915 Sigma), pour fournir des groupements sulfates dans la phase éluante afin d'attirer dans celle-ci les composés interagissant avec le gel

- du tétraméthylammonium chlorure (S32234 Merck), car nous avons pensé que l'ammonium pourrait se fixer sur les groupements sulfates. Les groupements méthyles entoureraient et masqueraient éventuellement les sites d'interaction.

L'utilisation de ces deux sels n'apporte pas d'amélioration de Δt_R , par rapport à la phase aqueuse initiale constituée de Tris (**tableau III.2 et 3**).

Après toutes ces tentatives non concluantes, nous avons émis l'éventualité de changer de gel et d'utiliser le sephadex avec l'urée 8 M, mais cela aussi était impossible. En effet, le gel de sephadex présente l'inconvénient de ne pas résister aux pressions élevées et d'avoir une moins bonne résolution que le superose. Or comme nous l'avons expliqué précédemment, les détecteurs choisis engendrent une contre-pression et nécessitent un minimum de 8 bar. L'utilisation du Sephadex aurait sous-entendu la modification de tout le système pour une installation semi-préparative avec un collecteur de fractions. Ceci aurait donc impliqué une augmentation des temps d'analyses sans garantie de résolution du problème.

Nous avons également pensé tester d'autres types de gels, mais il était impossible de faire des essais sans acheter une colonne avec le risque de se trouver encore en présence d'interactions. Le seul fournisseur de colonnes qui a accepté de nous en laisser une en test est « Polymers Laboratories ». Leur colonne était constituée d'un gel de polystyrène-divinylbenzène sur lequel ont été greffés des groupements OH pour qu'il puisse être utilisé en phase aqueuse. Nous avons testé cette colonne avec différentes phases éluantes. De l'eau déminéralisée, un tampon à pH=8,5 (NaNO_3 à 0,3 M et NaH_2PO_4 à 0,01 M) pour des interactions anioniques, un tampon à pH=5,0 (NaNO_3 à 0,8 M et NaH_2PO_4 à 0,01 M) pour des interactions cationiques, de l'eau avec du méthanol à 50 % v/v, pour les interactions apolaires, et enfin l'urée 6 M. Puisque l'acétone a été irréversiblement retenu par ce gel, nous avons utilisé du furfurol pour déterminer le volume total poreux de la colonne. Toutes les injections de caramels ont abouti à l'apparition d'un pic très étalé, élué bien au-delà du volume total poreux de la colonne.

3.2.4 CONCLUSION

A l'issue de tous ces essais, il apparaît que l'élimination des interactions entre le gel superose 12 et les caramels n'est pas aisée. La tentative de changement de gel n'a pas apporté non plus de meilleure alternative. Il restait la solution d'étudier plus précisément les colorants, de faire l'inventaire de tous les gels d'exclusion stérique existants, puis de bien vérifier théoriquement les possibilités d'interactions avant de faire des essais. Mais compte tenu de la complexité des colorants et de la variété des gels existants, cette possibilité pouvait s'avérer extrêmement longue. Nous avons alors décidé de considérer le problème autrement. Tout d'abord, nous avons vérifié l'absence d'interactions entre les colorants et le gel, dans la gamme de fractionnement de celui-ci. Puis nous avons analysé les composés adsorbés par le gel (élués après V_i) par spectrométrie de masse. Cette technique permet de mesurer des masses molaires inférieures à 1 kg/mol. Elle peut donc permettre de vérifier si les masses molaires des composés adsorbés sont faibles. Au cas où ces composés auraient effectivement des faibles masses molaires, il serait alors possible de les ignorer et d'axer les analyses sur les colorants de hautes masses molaires (élués dans la gamme de fractionnement du gel).

3.3 VERIFICATION DE L'ABSENCE D'INTERACTIONS DANS LA GAMME DE FRACTIONNEMENT DU GEL

Lorsque des solutés sont élués d'une phase stationnaire, il se trouve que l'influence de leur concentration et de celle de la température d'analyse sont différentes selon qu'il s'agisse d'adsorption ou d'exclusion stérique. Nous avons utilisé cette propriété pour vérifier l'absence d'interactions entre les colorants et le gel superose 12, dans la gamme de fractionnement de celui-ci.

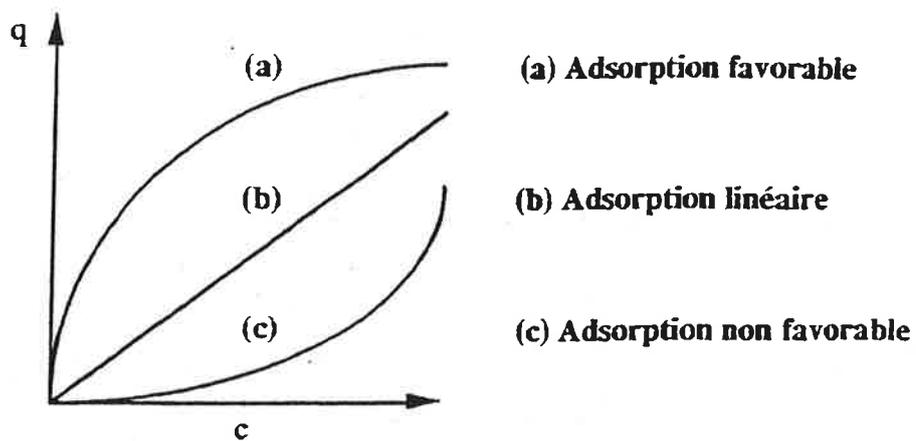


Figure III.19 : Représentation des trois différentes formes d'isothermes d'adsorption

q : quantité de soluté adsorbé dans la phase stationnaire

c : quantité de soluté dans la phase mobile

3.3.1 INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES COLORANTS SUR LEURS TEMPS DE RETENTION DANS LA GAMME DE FRACTIONNEMENT DU SUPEROSE 12

3.3.1.1 Théorie

La chromatographie d'exclusion stérique est basée sur la séparation des molécules selon leurs tailles ou leurs configurations spatiales. Les temps de rétention sont alors indépendants de la concentration des molécules analysées. Lorsqu'il y a interaction, donc adsorption d'une molécule par la phase stationnaire, le temps de rétention de la molécule concernée peut varier avec sa concentration, à température constante. Cette variation est décrite par des isothermes d'adsorption à l'équilibre. Une isotherme représente le tracé de la quantité (q) de soluté adsorbé par la phase stationnaire, en fonction de la quantité de soluté (c) dans la phase mobile (Chenou 1993).

On distingue trois formes d'isothermes d'adsorption (Chenou 1993) (**figure III.19**) :

- Adsorption favorable (**a**) : Le temps de rétention d'un soluté augmente avec l'augmentation de sa concentration. C'est le cas d'une isotherme concave
- Adsorption linéaire (**b**) : Le temps de rétention d'un soluté ne varie pas avec sa concentration. C'est le cas d'une isotherme linéaire
- Adsorption défavorable (**c**) : Le temps de rétention d'un soluté diminue avec l'augmentation de sa concentration. C'est le cas d'une isotherme convexe

3.3.1.2 Analyses et résultats

La logique aurait voulu que la phase éluante soit l'acétonitrile à 40 % v/v avec l'urée 8 M, car le Δt_R , le plus faible a été obtenu avec cette phase. Cependant, puisqu'il était prévu par la suite de faire des analyses par spectrométrie de masse des pics élués après V_t , nous n'avons pas pu utiliser l'urée. En effet ce composé, à concentration élevée (8 M) aurait masqué la détection de

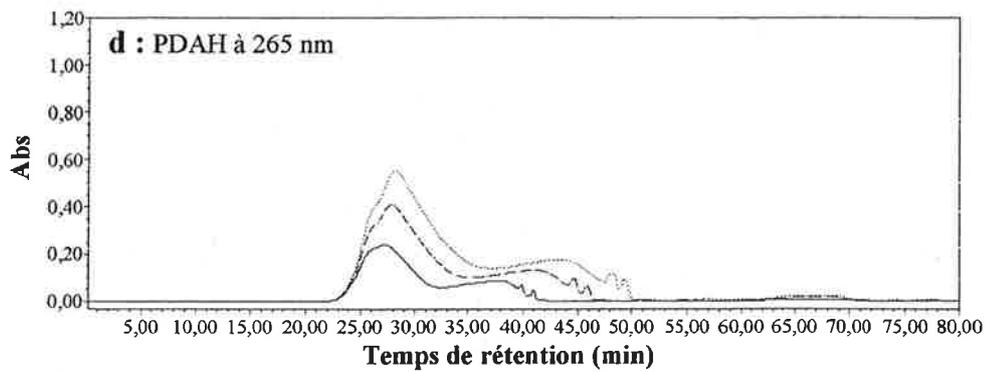
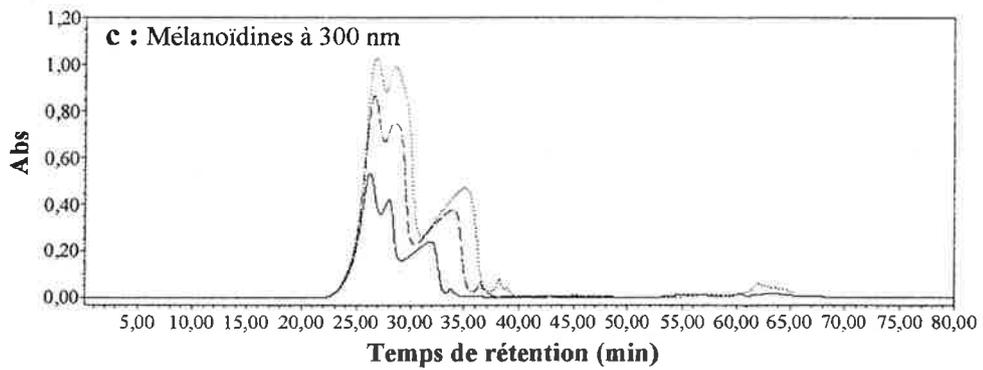
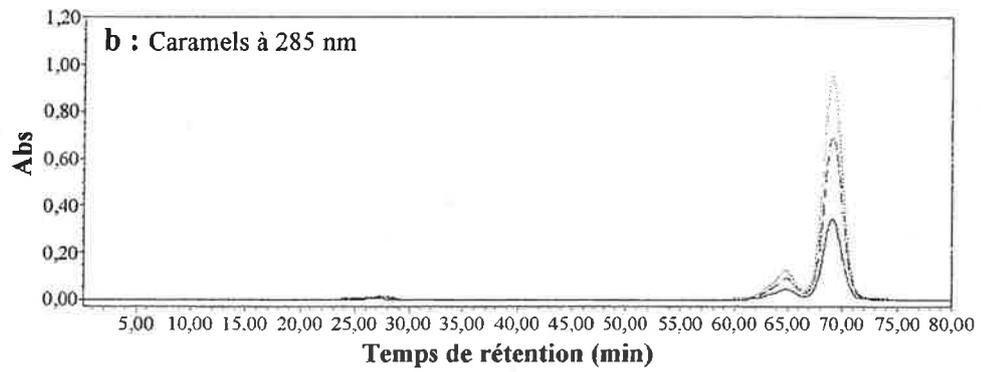
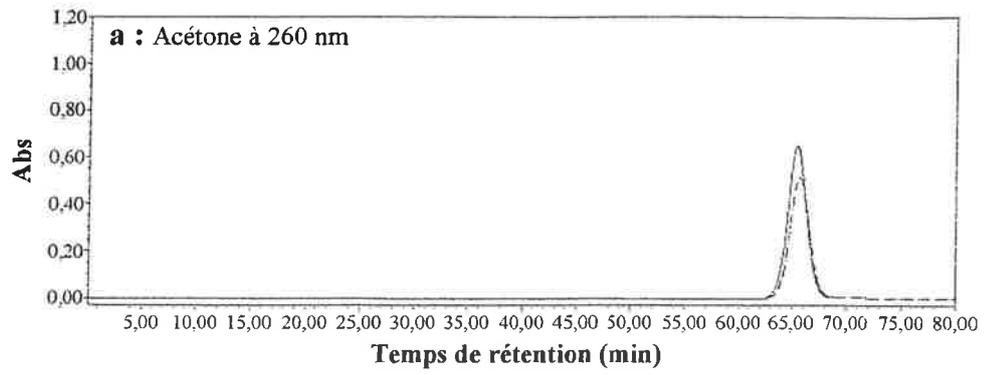


Figure III.20 : Influence de la concentration, sur la variation du temps de rétention des colorants de fabrication et de l'acétone, sur colonne Superose 12 HR 10/30 . Phase éluante : Acétonitrile 40 %v/v

tous les autres composés. Par conséquent, nous avons opté pour l'acétonitrile à 40 % v/v seul, comme phase éluante.

Les colorants de fabrication ont été injectés, à trois dilutions différentes :

- Dilution de 1 mL/100 mL, 1 mL/50 mL et 1,4 mL/50 mL pour les caramels et les mélanoidines
- Dilution de 1 mL/50 mL, 2 mL/50 mL et de 3 mL/50 mL pour les PDAH

A titre comparatif, l'acétone a également été injecté mais à deux concentrations seulement (1 % et 1,5 % v/v).

Les chromatogrammes obtenus pour l'acétone à 260 nm (**a**), les caramels à 285 nm (**b**), les mélanoidines à 300 nm (**c**) et les PDAH à 265 nm (**d**) sont présentés en **figure III.20**. On constate que les temps de rétention des mélanoidines et des PDAH augmentent avec la concentration de ces derniers. C'est donc le cas d'une adsorption favorable entre ces deux colorants et la matrice du gel. En ce qui concerne les caramels, l'augmentation de leur concentration n'a aucun effet, ni sur le temps de rétention du **pic 1** ni sur celui du **pic 2**. Puisque ce dernier est élué après l'acétone, il présenterait alors une adsorption linéaire. Concernant le **pic 1** les possibilités d'absence d'interaction et d'adsorption linéaire peuvent être toutes les deux envisagées. Ces résultats montrent qu'avec l'acétonitrile à 40 % comme phase éluante, les interactions entre la matrice du gel et les colorants de fabrication sont incontestables dans la gamme de fractionnement du gel. L'acétonitrile à 40 % ne semble donc pas être la phase éluante adéquate à notre objectif, d'autant plus que les dextrans étalons n'y sont pas solubles (cf. § 3.2.2, cas de l'acétonitrile).

Le fait que l'acétonitrile présente des interactions dans la gamme de fractionnement du gel montre que les Δt_r évalués précédemment ne sont pas les seuls paramètres à considérer pour étudier les interactions. Nous avons donc cherché, parmi les phases éluantes testées précédemment, celle qui ne présente pas d'interaction dans la gamme de fractionnement du

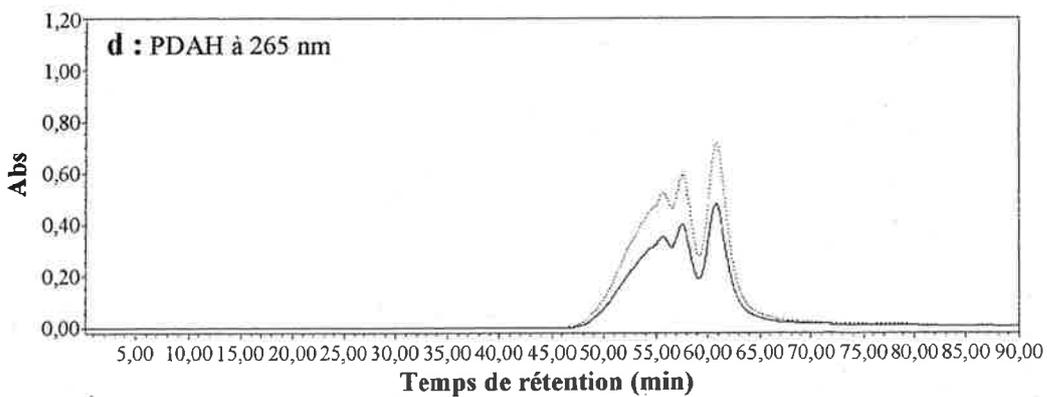
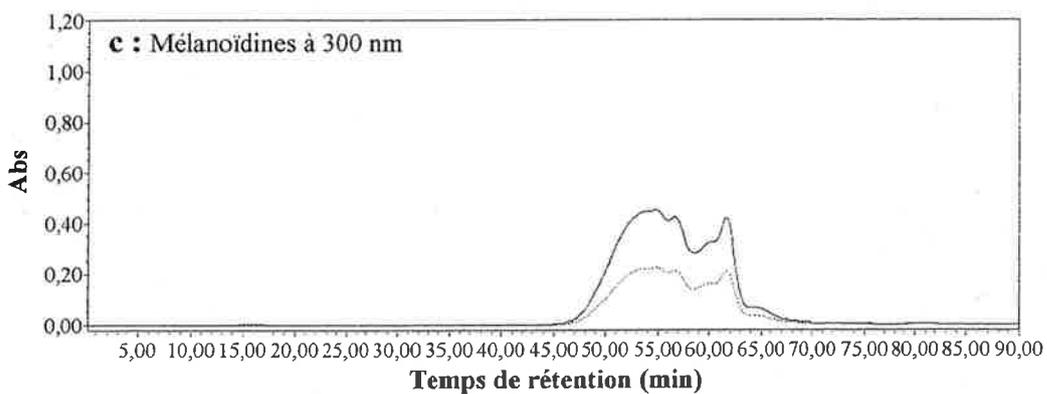
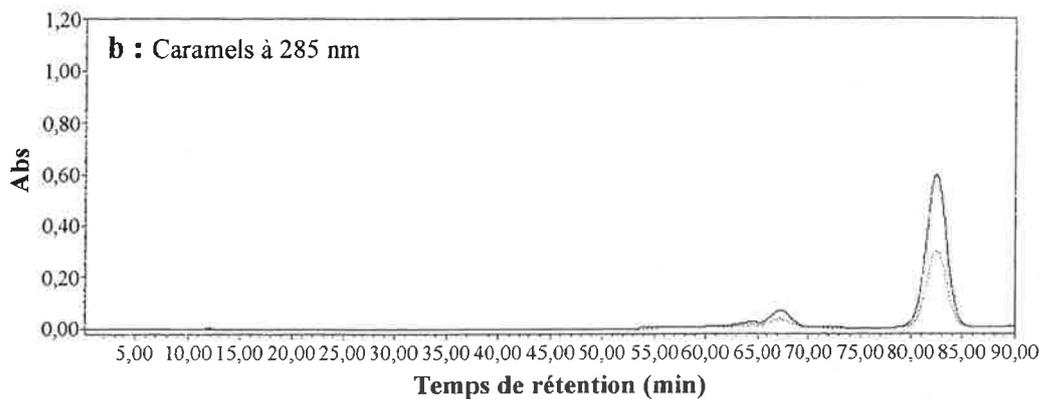
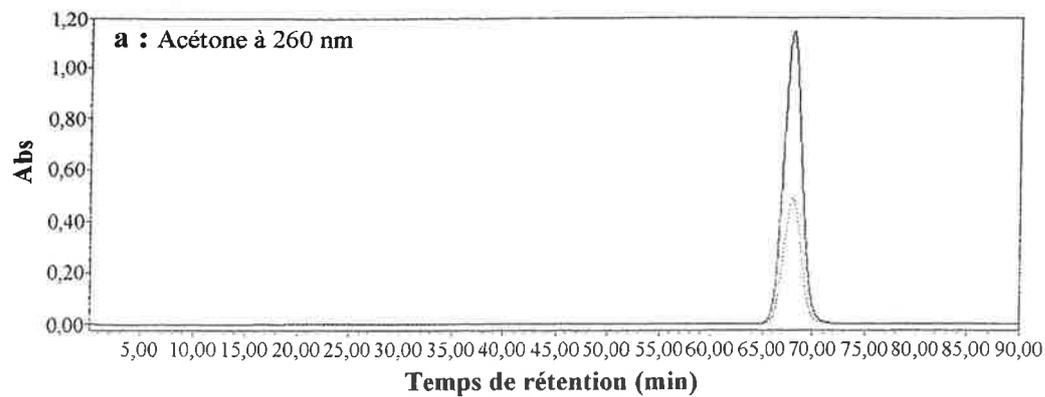


Figure III.21 : Influence de la concentration, sur la variation des temps de rétention des colorants de fabrication et de l'acétone, sur colonne superose 12 HR 10/30. Phase éluante : tétraméthylammonium chlorure 0,1 M

gel, sans tenir compte des composés élués après V_t (ces derniers étant de toutes les façons analysés par spectrométrie de masse).

Nous avons alors testé l'influence de la concentration des colorants sur leurs temps de rétention avec comme éluant, le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M dans l'eau. On s'est limité dans cette expérience à deux dilutions :

- Dilution de 1 mL/100 mL et 1 mL/50 mL pour les caramels et les mélanoidines
- Dilution de 2 mL/50 mL et de 3 mL/50 mL pour les PDAH

Pour l'acétone, nous avons reproduit les mêmes dilutions que précédemment (1 % et 1,5 % v/v).

Les chromatogrammes obtenus pour, l'acétone à 260 nm **(a)**, les caramels à 285 nm **(b)**, les mélanoidines à 300 nm **(c)** et les PDAH à 265 nm **(d)** sont présentés en **figure III.21**. On constate tout d'abord que les petits pics des PDAH, élués après le volume total poreux de la colonne avec le Tris, ont disparu. On constate ensuite, et c'est beaucoup plus intéressant, que la concentration n'a plus du tout d'influence sur les temps de rétention des colorants de fabrication.

Cependant, il reste la possibilité d'une adsorption linéaire qui n'engendre pas de lien entre la concentration et les temps de rétention des composés adsorbés. Nous avons donc testé, dans ce qui suit, l'influence de la température sur les temps de rétention des colorants, afin de valider l'absence d'interactions dans la gamme de fractionnement du gel.

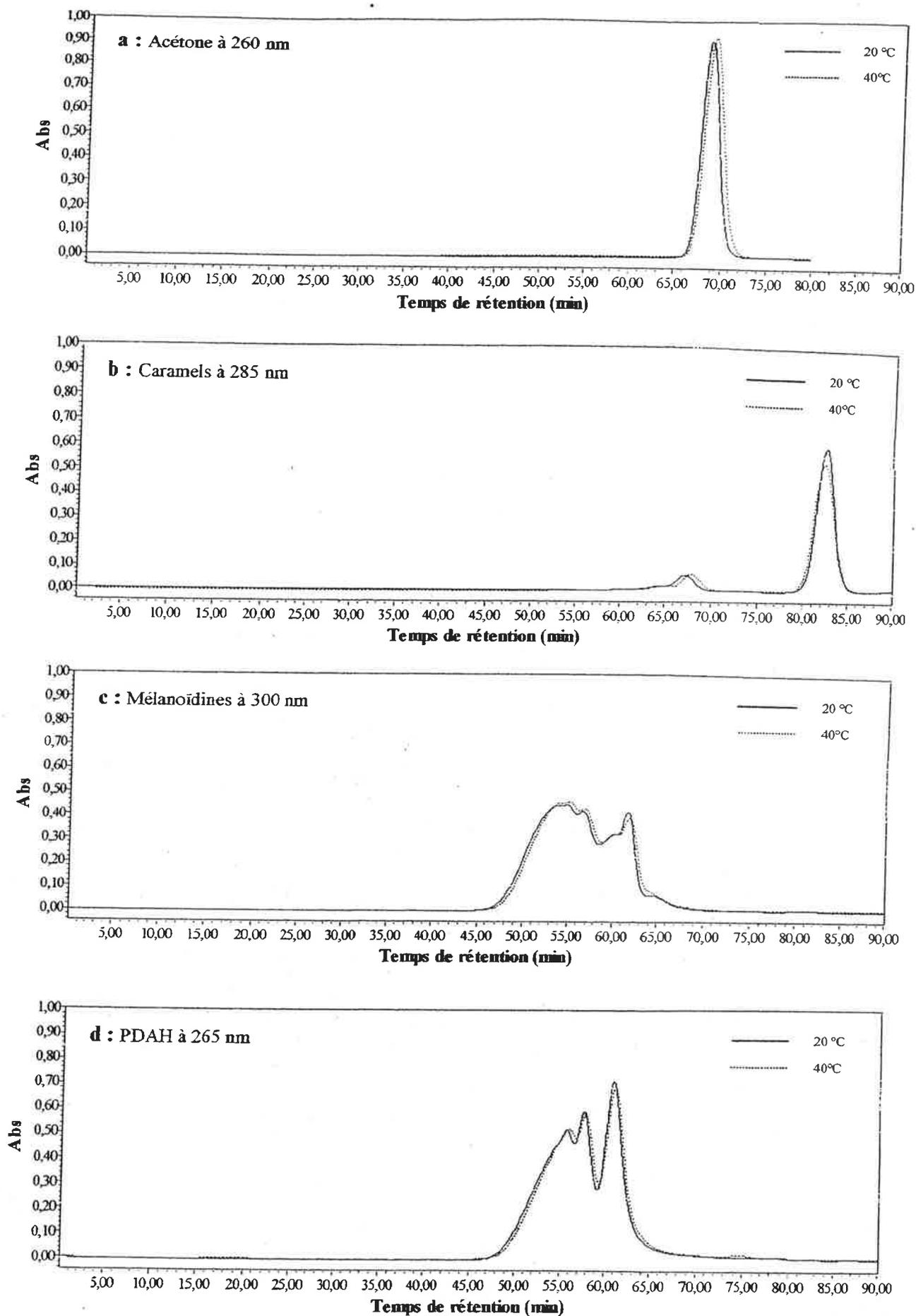


Figure III.22 : Influence de la température sur la variation des temps de rétention des colorants de fabrication et de l'acétone, sur colonne Superose 12 HR 10/30. Phase éluante : tétraméthylammonium chlorures 0,1 M

3.3.2 INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'ANALYSE SUR LES TEMPS DE RETENTION DES COLORANTS, DANS LA GAMME DE FRACTIONNEMENT DU SUPEROSE 12

3.3.2.1 Théorie

Dans la chromatographie d'adsorption, les temps de rétention des molécules adsorbées dépendent de la température. D'après Rosset *et al.*, (1991), le temps de rétention diminue avec l'augmentation de la température. En revanche, en exclusion stérique, la variation de la température n'affecte pas les temps de rétention des molécules. Le seul effet de celle-ci est de modifier légèrement la taille des molécules (Rosset *et al.*, 1991), ou d'être responsable d'une modification du gonflement des billes de gel. Le temps de rétention des molécules peut alors être légèrement décalé, mais c'est aussi valable pour les étalons et pour la molécule qui représente le volume total poreux de la colonne. Par conséquent, la variation de la température n'a aucune influence sur la mesure des masses molaires.

3.3.2.2 Analyses et résultats

Pour évaluer l'influence de la température sur les temps de rétention des colorants, nous avons plongé la colonne dans un bain marie dont la température a été maintenue à 40°C. Nous avons bien entendu gardé la même phase éluante qui est le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M. Après stabilisation de la température à 40°C, nous avons injecté les colorants dans la colonne. Les caramels et les mélanoidines ont été dilués à 1 mL/50 mL et les PDAH à 3 mL/50 mL. L'acétone a été préparé à 1,5 % v/v. Nous avons ensuite comparé les chromatogrammes obtenus à ceux obtenus à même concentration mais à température ambiante (20°C).

Les chromatogrammes obtenus pour l'acétone à 260 nm **(a)**, les caramels à 285 nm **(b)**, les mélanoidines à 300 nm **(c)** et les PDAH à 265 nm **(d)** sont présentés en **figure III.22**. On constate tout d'abord que l'augmentation de la température de 20°C à 40°C a une très faible influence sur les temps de rétention de tous les composés injectés. Il aurait été préférable de

tester une température supérieure pour mieux visualiser son influence, mais cela n'était pas possible car la colonne ne résiste pas trop à la chaleur.

En considérant attentivement les chromatogrammes de la **figure III.22**, on constate cependant qu'une augmentation de la température entraîne un léger retard de tous les pics des colorants, exception faite du **pic 2** des caramels où l'inverse est observé. Ce léger retard va dans le même sens que celui du pic d'acétone et est pratiquement de même amplitude.

L'étude de l'influence de la température sur les temps de rétention n'a donc pas mis en évidence, pour le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M comme phase éluante, des interactions entre la matrice du gel et les mélanoidines, les PDAH et les composés du **pic 1** des caramels. Les seuls composés suspects sont ceux qui composent le **pic 2** des caramels. En effet, l'augmentation de la température entraîne une diminution du temps de rétention de ce **pic 2**, ce qui va dans le même sens que l'influence de la température dans le cas d'une adsorption (Rosset *et al.*, 1991).

Le tétraméthylammonium chlorure semble donc convenir comme phase éluante pour l'analyse par C.E.S. des colorants de fabrication. De plus, c'est un bon solvant des dextrans choisies pour l'étalonnage.

3.3.3 CONCLUSION

L'étude de l'influence de la concentration et de la température sur le temps de rétention des colorants n'a pas mis en évidence la présence d'interactions entre les colorants de fabrication et le superose 12 dans la gamme de fractionnement de celui-ci, avec le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M comme phase éluante. Le seul pic qui pose encore problème, est le **pic 2** des caramels. Nous avons donc décidé de collecter ce pic et de l'analyser par spectrométrie de masse afin de déterminer s'il s'agit de macromolécules ou simplement de composés de faibles masses molaires. Si cette deuxième possibilité est

vérifiée, alors il sera possible de mesurer les masses molaires des caramels en s'affranchissant de ce pic, puisqu'on s'intéresse surtout aux masses molaires élevées. Pour des raisons pratiques, nous avons décidé, à partir de maintenant, de nommer le **pic 2** des caramels, « caramels adsorbés » et le **pic 1** des caramels « caramels non adsorbés ».

3.4 DETERMINATION DE LA TAILLE DES COMPOSES PRESENTANT DES INTERACTIONS AVEC LE GEL PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE HAUTE PERFORMANCE

La technique de spectrométrie de masse est très puissante pour déterminer la masse molaire d'un composé, à condition que celle-ci ne soit pas trop grande. En effet, il n'existe pas, actuellement, beaucoup d'appareils de spectrométrie de masse capables de mesurer des masses molaires $> 1 \text{ kg/mol}$. Cette méthode est généralement appliquée pour l'analyse des composés purs et non pas pour celle des mélanges. Notre objectif, en utilisant cette méthode, n'était pas de déterminer précisément la taille des caramels adsorbés, mais uniquement de savoir si ces derniers ont des masses molaires supérieures ou plutôt inférieures à 1 kg/mol . Les résultats obtenus par spectrométrie de masse ont été par la suite confirmés par CLHP, où la séparation est également régie dans certains cas par la taille des molécules.

3.4.1 ANALYSES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Avant de présenter l'analyse des caramels adsorbés par spectrométrie de masse et les résultats obtenus, nous décrivons brièvement ci-dessous le principe de cette méthode d'analyse.

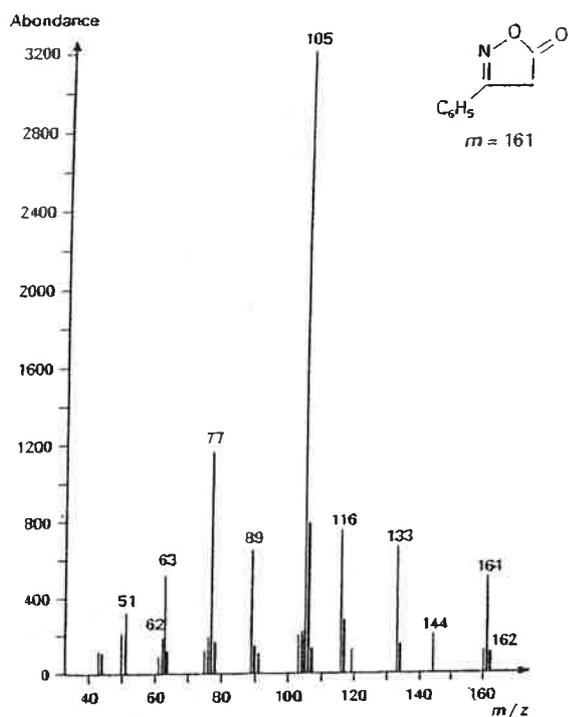


Figure III.23 : Spectre de masse de la 3-phénylisoxazole-5(4H)-one par bombardement électronique

(Botter et Bouchoux 1995)

3.4.1.1 Principe de la spectrométrie de masse

Le principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse repose sur l'action d'un champ électromagnétique, sur une particule chargée, afin d'en déterminer le rapport masse/charge (Botter et Bouchoux 1995). Cette technique permet de mesurer la masse d'un ion et de déterminer son abondance. Lorsqu'une molécule poly-atomique est introduite dans l'appareil, son ionisation produit généralement plusieurs ions de masses distinctes. Le relevé des abondances de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) constitue le spectre de masse. Un spectromètre de masse est composé d'un système d'introduction, d'une source d'ions, d'un analyseur et d'un ensemble de détection d'ions. Pratiquement, tous les spectromètres sont aujourd'hui équipés d'un système informatique de pilotage et de traitement des données. Un spectromètre à pouvoir de résolution élevé permet en principe la détermination précise des masses. Si cette précision est suffisante, on peut même atteindre la composition élémentaire (Botter et Bouchoux 1995). Prenons comme exemple le spectre de masse de la 3 phénylisoxazole 5(4H)one **figure III.23**. Les différents pics, dont l'intensité est représentée sous forme de barre, constituent les éléments structuraux de la molécule analysée. En mode impact électronique, le pic moléculaire est théoriquement celui dont le m/z est le plus élevé. Il n'est pas rare toutefois qu'il soit absent du spectre si l'ion moléculaire se fragmente assez facilement. Dans ce cas, les différents éléments structuraux qui apparaissent dans le spectre de masse peuvent contribuer à remonter à la molécule initiale (Botter et Bouchoux 1995).

3.4.1.2 Analyses réalisées et résultats obtenus

Afin de déterminer les masses molaires des caramels adsorbés par spectrométrie de masse, nous les avons tout d'abord récupérés individuellement après séparation dans la colonne superose 12 HR 10/30. Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées au laboratoire d'études des techniques et instruments d'analyse moléculaire (LETIAM) à l'IUT d'Orsay. L'appareil que nous avons utilisé est un spectromètre de masse quadripolaire à

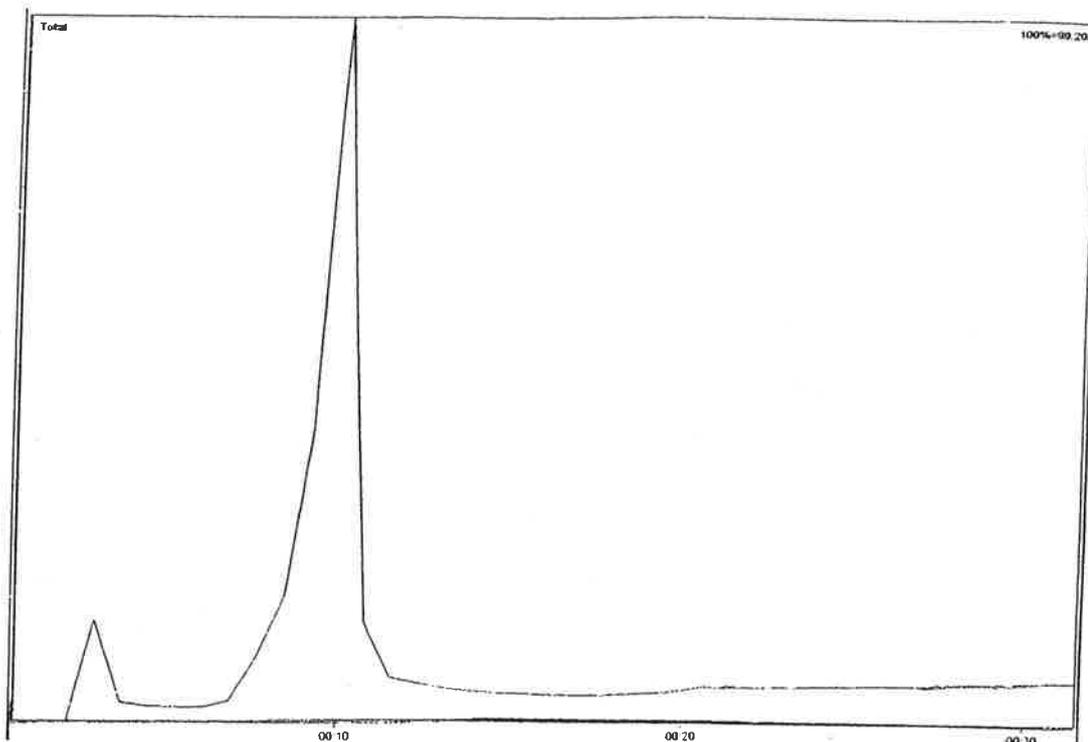


Figure III.24.a : Pics d'ionisation (des caramels adsorbés) par spectrométrie de masse

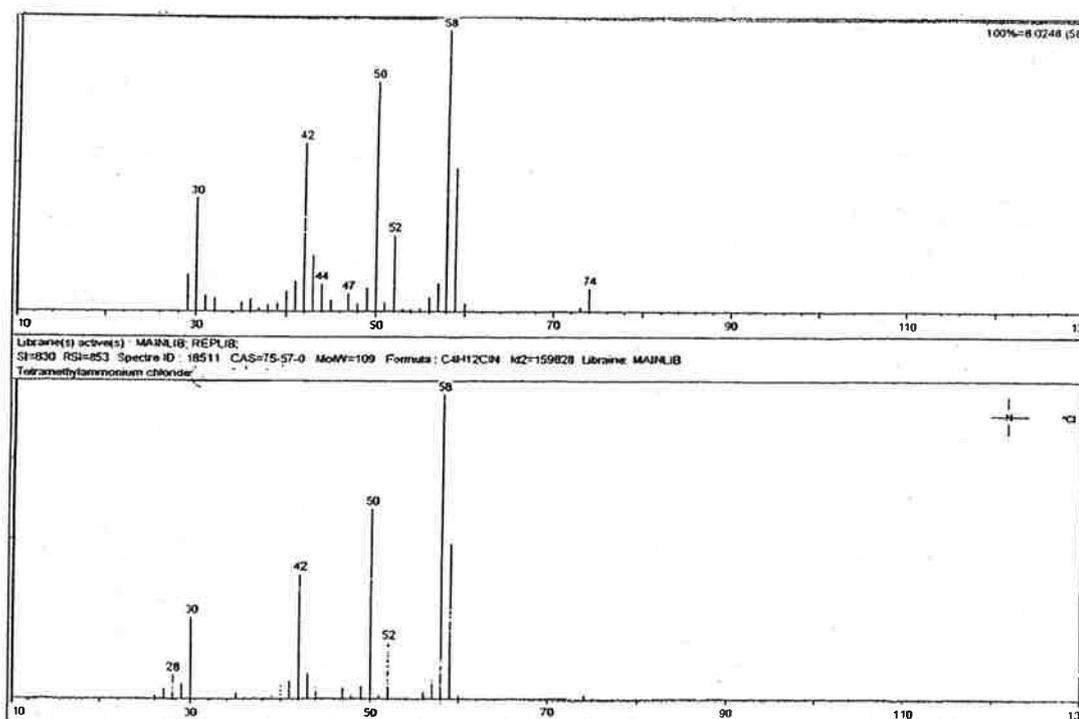
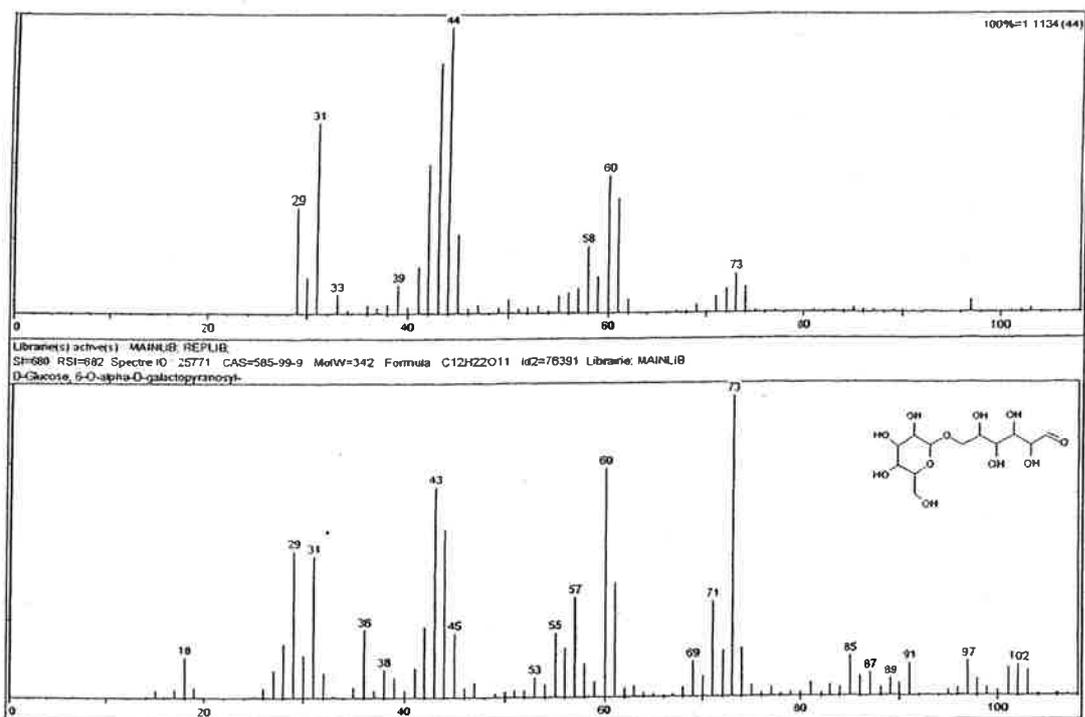


Figure III.24.b : Reconnaissance du spectre de masse du tétraméthylammonium chlorure au temps 8 secondes d'ionisation des caramels adsorbés
Résultat d'une recherche en bibliothèque des spectres (SI = 830)

ionisation par bombardement électronique. Nous avons placé, à l'aide d'une seringue, 2 μL des caramels adsorbés collectés, au bout d'une canne coulissante. Cette dernière a été introduite directement après évaporation de l'eau, dans la source d'ions du spectromètre, par l'intermédiaire d'un sas sous vide. C'est le mode en introduction directe. La température de la source d'ions a été réglée à 180°C. Nous avons réalisé une montée en température de l'échantillon, de 30°C à 1000°C, à raison de 50°C par seconde, puis maintenu la température de 1000°C jusqu'à la fin de l'analyse. La durée d'une analyse était d'environ 3 min, avec un balayage de masses molaires de 0,029 à 1 kg/mol. Les résultats obtenus sont présentés en **figure III.24 a, b et c**.

La **figure III.24.a**, représente les pics d'ionisation des caramels adsorbés, en fonction du temps de l'analyse. Cette figure représente l'intensité de réponse (suite à l'ionisation des molécules) en fonction du temps (secondes), lui-même fonction de la montée en température. Comme l'indique la **figure III.24.a**, tous les composés sont ionisés au bout de 15 secondes d'analyse. Pour qu'un composé soit considéré comme pur, il doit présenter un seul pic d'ionisation. Celui-ci doit être étroit et doit représenter le même spectre de masse en tout point. Pour les caramels adsorbés, nous avons obtenu deux pics d'ionisation ce qui montre qu'ils sont constitués d'un mélange de composés. Nous avons alors visualisé les spectres de masse, en plusieurs points de ces pics et nous les avons comparés avec une bibliothèque de spectres. Cette bibliothèque existait dans le logiciel Quest V 2.3 que nous avons utilisé pour traiter les résultats. L'exploitation d'une telle bibliothèque est gérée par le système informatique où différents algorithmes permettent de rechercher les spectres les plus proches du spectre de l'échantillon analysé. La ressemblance de deux spectres est estimée par l'indice de similarité (SI). Si celui-ci est égal à 1000, alors les deux spectres de masse comparés sont identiques, et si le SI est égal à 0, ces spectres sont complètement différents. De tous les spectres de masse que nous avons visualisés sur les pics d'ionisation de la **figure III.24.a**, aucun ne correspondait à une masse supérieure à 0,2 kg/mol. On identifie bien par la recherche en bibliothèque, au temps 8 secondes d'analyse, le spectre de masse du



**Figure III.24.c : Assimilation d'un spectre de masse des caramels absorbés à un disaccharide
 Résultat d'une recherche en bibliothèque des spectres (SI = 680)**

tétraméthylammonium chlorure de la phase éluante (SI = 830) (**figure III.24.b**). Les autres spectres extraits indiquent tous, par recherche en bibliothèque des spectres, des ressemblances avec des holosides ou diholosides. Nous n'avons présenté que le spectre correspondant aux masses molaires les plus élevées c'est-à-dire aux diholosides (SI = 680) (**figure III.24.c**).

Ces résultats indiquent que les caramels adsorbés ne présentent apparemment pas de masses molaires élevées et sont plutôt assimilables à des holosides ou à des diholosides. Cependant, nous n'étions pas certains que les composés analysés ne se soient pas fragmentés dans la cellule du spectromètre de masse, surtout que les températures d'analyse sont très élevées. Dans ce cas, la véritable masse molaire n'apparaîtrait pas dans leurs spectres de masse (Botter et Bouchoux 1995).

Nous avons donc pensé que l'analyse des caramels tels qu'ils ont été préparés avant fractionnement sur la colonne de C.E.S. (notés caramels bruts) et des caramels non adsorbés collectés en sortie de colonne pourrait éventuellement éclaircir ce point. En effet, leur analyse par spectrométrie de masse aboutirait alors à deux cas possibles :

- Certains spectres obtenus sont assimilés par comparaison avec la bibliothèque de spectres à des composés dont la masse molaire est supérieure à des diholosides. Ceci prouverait qu'il est possible par cette méthode de détecter sur ce type de composés des masses molaires supérieures à celles des diholosides. Par conséquent, si les caramels adsorbés avaient des masses molaires élevées on l'aurait vu par cette technique d'analyse.
- Les spectres obtenus sont assimilés par comparaison avec la bibliothèque à des composés dont la masse molaire est inférieure ou égale à des diholosides. Dans ce cas, nous ne pouvons rien déduire.

Les spectres de masse des caramels non adsorbés et des caramels bruts à différents points du pic d'ionisation, correspondaient à des holosides, diholosides et triholosides. Ceux qui correspondent aux plus hautes masses molaires, donc aux triholosides, sont présentés en **figure III.25** et **figure III.26**. On constate que ces deux composés présentent des spectres de

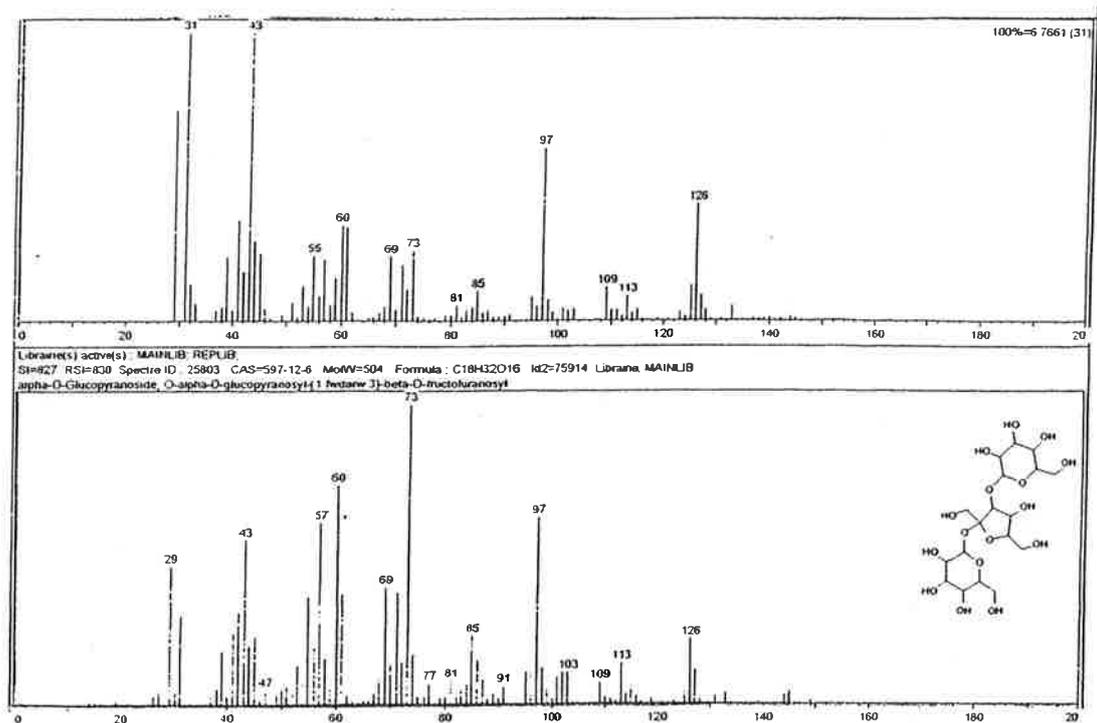


Figure III.25 : Assimilation d'un spectre de masse des caramels non absorbés à un trisaccharide
 Résultat d'une recherche en bibliothèque des spectres (SI = 827)

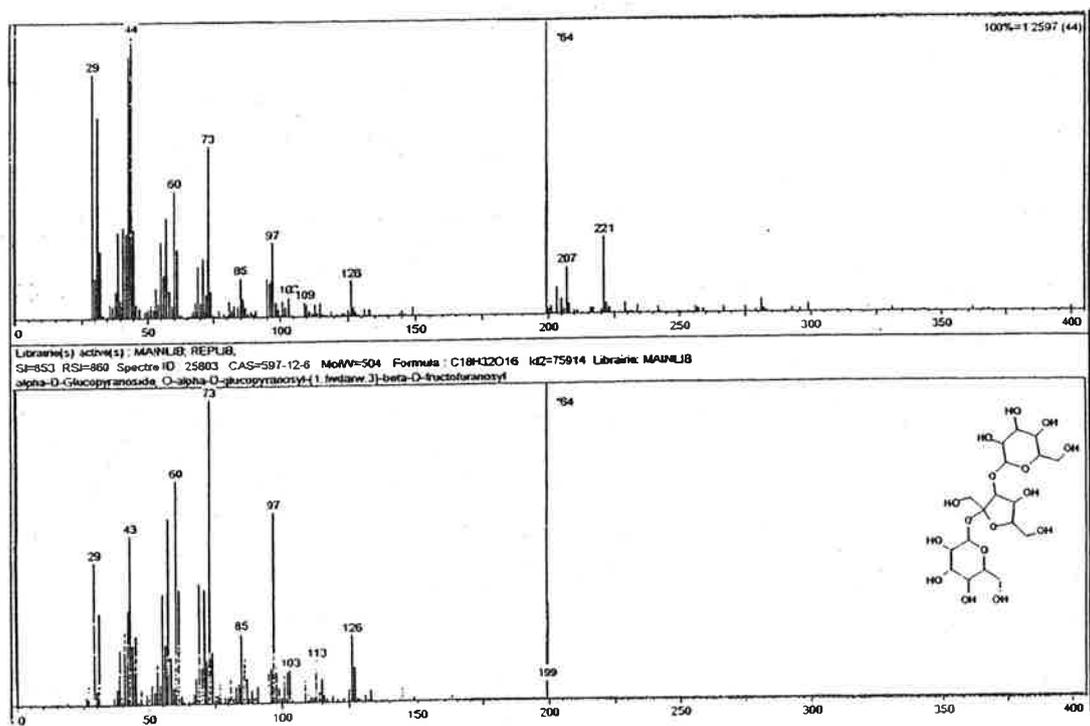


Figure III.26 : Assimilation d'un spectre de masse des caramels bruts à un trisaccharide
 Résultat d'une recherche en bibliothèque des spectres (SI = 853)

masse proches du même triholoside, avec des SI de 827 et 853. Puisque nous n'avions pas détecté de triholosides dans les spectres de masse des caramels adsorbés, cela indique qu'ils sont effectivement constitués de composés de masses molaires inférieures à celles des triholosides.

Tous les composés des caramels ont été rapprochés, par la spectrométrie de masse, à des composés similaires à des holosides, diholosides ou triholosides. Sachant que la séparation des sucres par chromatographie liquide de haute performance (CLHP) se fait entre autres, selon la masse molaire de ces derniers, nous avons utilisé cette méthode d'analyse pour confirmer les résultats précédents.

A titre d'information, nous avons comparé tous les spectres de masse des caramels avec celui de l'hydroxyméthyl-furfural et nous avons constaté avec surprise qu'il n'y a aucune ressemblance des spectres avec ce dernier.

3.4.2 CONFIRMATION DES RESULTATS OBTENUS EN SPECTROMETRIE DE MASSE PAR ANALYSE EN CLHP

Afin de confirmer les résultats obtenus par spectrométrie de masse, nous avons injecté les caramels adsorbés, les caramels non adsorbés ainsi que les caramels bruts, dans une colonne de CLHP spécifique pour l'analyse des sucres (Aminex HPX-87C sous forme calcium). Cette colonne permet non seulement l'analyse des holosides mais aussi la séparation des classes de diholosides, triholosides et tétraholosides. Cette séparation est basée sur le même principe que l'exclusion stérique où les sucres les plus gros sortent en premier. Le but de ces analyses par CLHP est de comparer les temps de rétention des caramels adsorbés et non adsorbés, ainsi que les caramels bruts. En partant de l'hypothèse que ces composés sont semblables à des sucres au niveau structure, on pourra confirmer si les caramels adsorbés sont réellement plus petits en masses molaires que les caramels bruts et non adsorbés. A titre de comparaison, nous avons injecté un étalon constitué d'un mélange de sucres de masses molaires

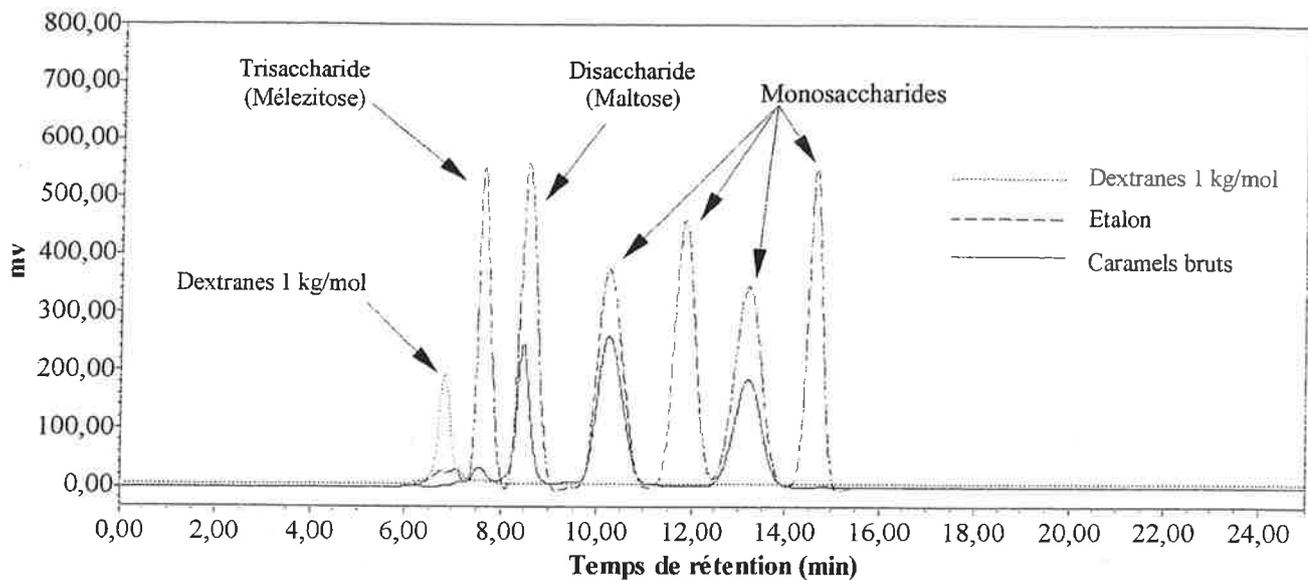


Figure III.27 : Chromatogrammes superposés des caramels bruts, de l'étalon (mélange de plusieurs sucres) et des dextrans à 1 kg/mol analysés par CLHP

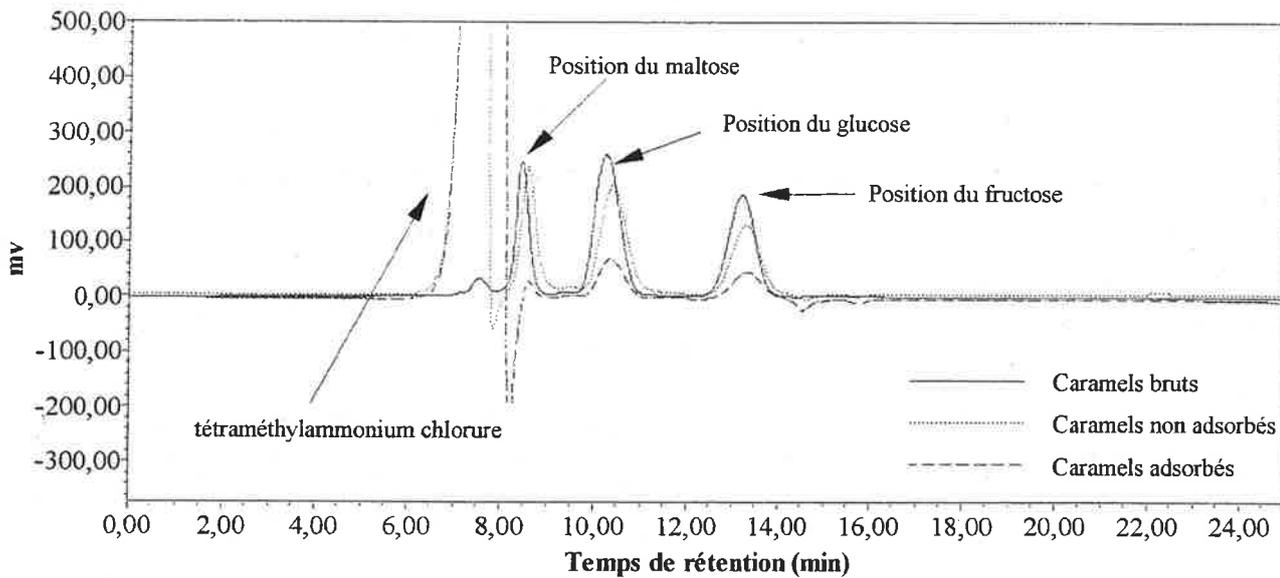


Figure III.28 : Chromatogrammes superposés des caramels bruts, des caramels adsorbés et des caramels non adsorbés analysés par CLHP

différentes : [triholoside (melezitose), diholoside (maltose) et holosides (glucose, mannose, fructose et ribitol). Nous avons également injecté un étalon de dextranses de masse molaire de 1 kg/mol. Nous avons utilisé de l'eau ultra pure comme phase éluante, à un débit de 0,6 mL/min. La détection a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre différentiel RID 6A Shimadzu.

Nous avons présenté en **figure III.27** les chromatogrammes de CLHP superposés des caramels bruts, ainsi que ceux de l'étalon (mélange de sucres) et des dextranses de 1 kg/mol. On constate que les caramels bruts présentent quatre pics distincts. Le premier pic élué est très petit par rapport aux autres. Il coïncide avec le pic du melezitose (triholosides) de l'étalon. Le deuxième pic coïncide avec le maltose (diholoside), alors que les deux autres coïncident avec le glucose et le fructose (holosides). Aucun des pic des caramels bruts n'est élué avant les dextranses de 1 kg/mol, ce qui indique que les masses molaires des caramels que nous avons préparés ne dépassent pas 1 kg/mol. Elles sont plutôt proches de l'ordre de celles d'un triholoside.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de l'analyse par spectrométrie de masse. En effet, les deux analyses indiquent que dans les caramels bruts, on rencontre des composés voisins au niveau structure des triholosides, diholosides et holosides. La présence de glucose et de fructose dans les caramels bruts ne serait d'ailleurs pas surprenante, puisqu'on a préparé ces caramels à partir du saccharose. De plus, les deux analyses indiquent que les caramels que nous avons préparés ont apparemment des masses molaires inférieures ou égales aux masses molaires des triholosides.

Dans la **figure III.28**, nous avons présenté les chromatogrammes superposés des caramels bruts, adsorbés et non adsorbés. On constate que ces trois composés présentent des pics qui coïncident avec le glucose et le fructose. Les composés non adsorbés présentent également un pic qui coïncide avec les diholosides. Ce pic est à peine visible pour les caramels adsorbés.

Concernant le domaine d'élution des triholosides et des dextrans de 1 kg/mol, on ne peut rien affirmer puisqu'un pic important correspondant au tétraméthylammonium chlorure masque tout le reste.

3.4.3 CONCLUSION

Sans prétendre avoir identifié les composés des caramels, nous pouvons conclure que ces analyses (par spectrométrie de masse et par CLHP) se recoupent et ont permis de voir que les caramels tels que nous les avons préparés sont similaires, au niveau structure, à des sucres. Ils ont également permis de voir que ces caramels ont des masses molaires inférieures à 1 kg/mol.

Ces résultats permettent de confirmer ce que nous avons montré au chapitre II sur les caramels et leur cinétique de formation. En effet, les conditions dans lesquelles nous avons préparé ces composés sont similaires aux conditions de sucrerie. Or ces dernières ne sont pas forcément très favorables à la formation des caramels. Ces derniers n'ont donc pas eu le temps de se polymériser d'où des masses molaires peu élevées. De plus, sachant que ce sont les produits de dégradation du saccharose, il n'est pas étonnant que ces composés ressemblent à des sucres au niveau structure. Ce qui est surprenant pas contre, c'est qu'aucun des spectres de masse des caramels n'ait présenté de ressemblances avec celui de l'hydroxyméthylfurfural.

Ces résultats permettent également de nous affranchir du pic adsorbé des caramels considéré de masse molaires au moins inférieure à 1 kg/mol. Nous avons ainsi pu retenir le tétraméthylammonium chlorure comme phase éluante et les étalons de dextrans pour l'étalonnage pour mesurer les masses molaires des colorants de fabrication avec la colonne « Superose 12 HR 10/30 ».

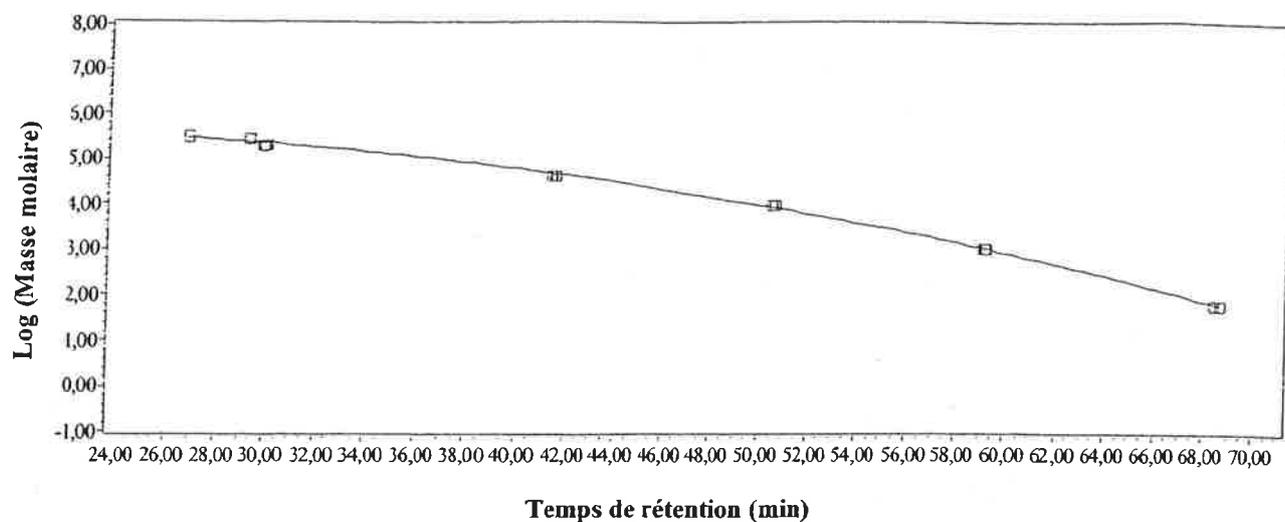
4. ANALYSE DES COLORANTS ET DU SUCRE ROUX PAR C.E.S.

Puisque la phase éluante a été modifiée lors de la mise au point de la méthode d'analyse, l'étalonnage avec les dextrans a été repris avec cette nouvelle phase (tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M). Nous présentons tout d'abord les résultats de cet étalonnage avant de présenter les résultats des analyses des colorants de fabrication et du sucre roux par chromatographie d'exclusion stérique.

4.1 ETALONNAGE DE LA COLONNE AVEC LE TETRAMETHYLAMMONIUM CHLORURE COMME ELUANT

Avant d'effectuer l'étalonnage de la colonne, nous avons déterminé une nouvelle fois le volume mort et le volume total poreux de celle-ci comme décrit précédemment. Il était important de réévaluer ces volumes car la phase éluante n'est plus le Tris, mais le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M ce qui peut modifier le gonflement du gel. L'étalonnage a été réalisé à un débit de 0,3 mL/min, avec le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M comme phase éluante et avec un volume d'injection de 200 µL. Le nouveau volume mort de la colonne est de 8,04 mL (temps de rétention de 26,8 min) et le nouveau volume total poreux est de 20,59 mL (temps de rétention de 68,63 min).

Les différents dextrans étalons (270 kg/mol, 188 kg/mol, 43,2 kg/mol, 9,5 kg/mol et 1 kg/mol), ont été injectés dans la colonne à des concentrations suffisantes pour qu'ils soient détectés dans la gamme de linéarité du réfractomètre. Trois injections successives ont été réalisées pour chaque étalon. Le bleu dextran et l'acétone ont également été injectés trois fois. Nous avons calculé une première courbe d'étalonnage avec les étalons à partir du



Equation de la courbe de calibration : $\text{Log}(\text{Masse molaire}[\text{g/mol}]) = -1,29 * 10^{-3} t_R^2 + 3,53 * 10^{-2} t_R + 5,45$

Coefficient de corrélation : $R^2 = 0,99$

Figure III.29 : Courbe d'étalonnage de la colonne superose 12 HR 10/30 avec des dextrans étalons, du bleu dextran et de l'acétone. Courbe réalisée pour le D.B.D. par calcul du temps de retard entre les détecteurs.

Tableau III.4 : Dilution des colorants de fabrication pour les analyses avec la colonne Superose 12 HR 12/30

| Domaine de détection | Caramels | Mélanoïdines | PDAH |
|----------------------|-----------------|-----------------|------------------|
| UV | 1 mL dans 25 mL | 1 mL dans 50 mL | 3 mL dans 50 mL |
| Visible | sans dilution | 1 mL dans 50 mL | 30 mL dans 50 mL |

réfractomètre, puis en tenant compte du temps de retard entre les deux détecteurs, nous avons calculé cet étalonnage pour le D.B.D..

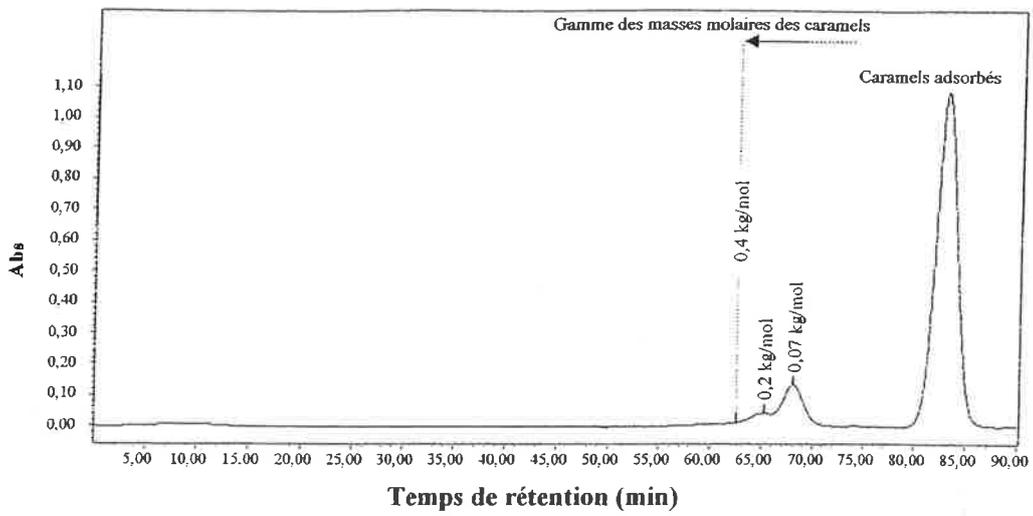
La courbe d'étalonnage obtenue sur le D.B.D. est présentée en **figure III.29**, avec son équation et le coefficient de corrélation. Pour plus de précisions, nous avons représenté l'étalonnage par une équation d'un polynôme du second degré. Les masses molaires données par cette équation d'étalonnage sont évaluées à $\pm 15\%$.

4.2 MASSES MOLAIRES DES COLORANTS DE FABRICATION ET DU SUCRE ROUX

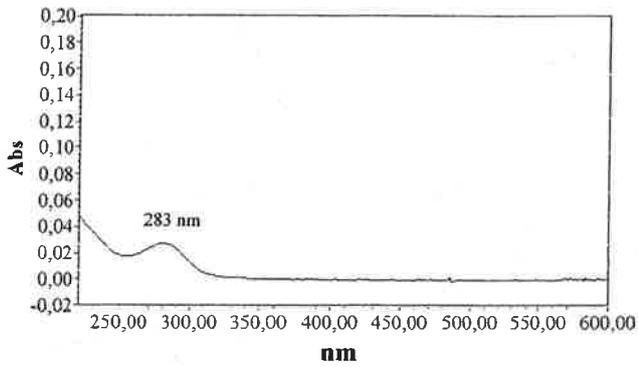
Nous avons injecté, dans la colonne superose 12 HR 12/30, les colorants de fabrication à différentes concentrations, pour qu'ils soient détectés aussi bien dans le visible que dans l'UV. Les différentes dilutions réalisées pour chaque domaine sont regroupées dans le **tableau III.4**. Nous avons également injecté une refonte de sucre roux provenant de la Réunion (lot 15), préparée à 45 g de matière sèche pour 100 g de solution. Cette concentration permet d'avoir des absorbances significatives dans l'UV, mais pas dans le visible. Mais si la refonte de sucre roux est concentrée au-delà de 45 g de matières sèches pour 100g de solution, l'injection est très difficile car la viscosité devient trop importante et cela peut fausser les analyses. Un mélange des trois colorants a également été analysé aux concentrations détectables en UV. Nous discutons tout d'abord les résultats obtenus par détection dans l'UV, suivis par ceux obtenus par détection dans le visible. Nous comparons ensuite nos résultats de masses molaires avec ceux rencontrés dans la littérature.

4.2.1 RESULTATS OBTENUS PAR DETECTION DANS L'UV

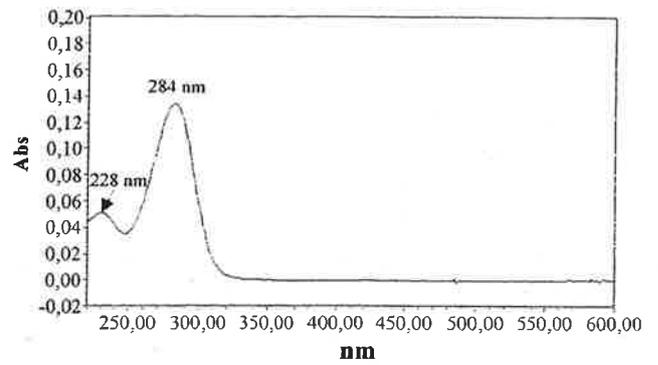
Les **figures III.30, 31, 32, 33 et 35**, présentent respectivement, les chromatogrammes des caramels à 285 nm, des mélanoidines à 300 nm, des PDAH à 265 nm, d'un mélange des trois colorants à 265 nm et du sucre roux à 265 nm. Nous avons mesuré, à l'aide de la courbe



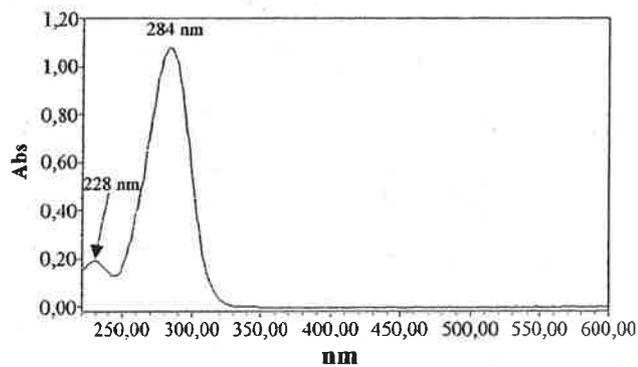
a – Chromatogramme des caramels (à 285 nm)
présentation des masses molaires



b - Spectre des caramels de masse molaire de 0,2 kg/mol



c - Spectre des caramels de masse molaire de 0,07 kg/mol



d - Spectre des caramels adsorbés

Figure III.30 : Chromatogramme des caramels à 285 nm avec présentation des masses molaires et des spectres aux sommets des pics

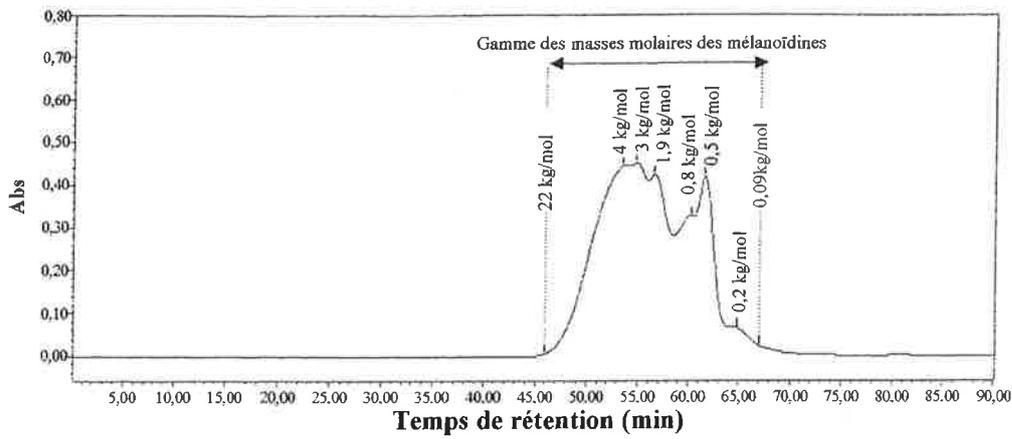
d'étalonnage, les masses molaires de chaque colorant ainsi que celles du mélange des trois et du sucre roux. Nous avons également extrait et présenté les spectres UV-Visible au sommet des pics des chromatogrammes. Les résultats obtenus, pour chaque composé analysé sont discutés dans ce qui suit.

Caramels

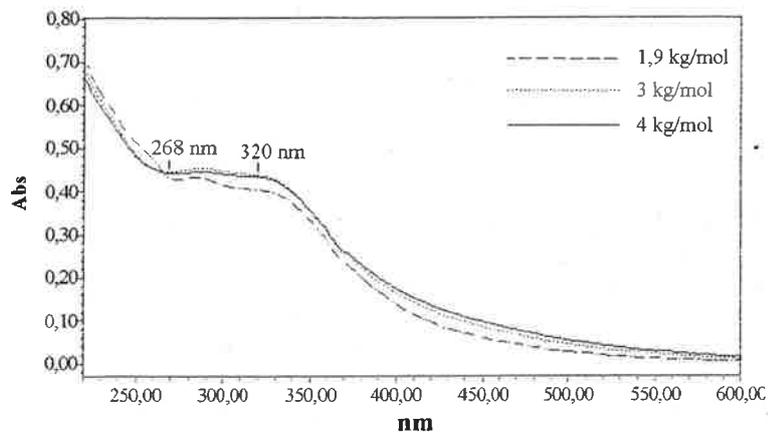
Les caramels que nous avons préparés ont des masses molaires inférieures à 0,4 kg/mol (**figure III.30.a**). On distingue en premier, un très petit pic dont le sommet correspond à une masse molaire de 0,2 kg/mol. Le spectre de ce pic est présenté en **figure III.30.b**. Par comparaison avec le spectre global des caramels (**figure II.8**), il présente un maximum d'absorbance à une longueur d'onde légèrement plus faible (283 nm au lieu de 285 nm), et ne présente pas de pic d'absorbance à 228 nm. On distingue ensuite un deuxième pic plus important dont le sommet correspond à une masse molaire de 0,07 kg/mol, et enfin, le troisième pic des caramels adsorbés. Les spectres respectifs de ces deux derniers pics, présentés respectivement en **figure III.30.c** et **figure III.30.d**, sont pratiquement identiques au spectre général des caramels (**figure II.8**). Ces résultats confirment, en complément des analyses par CLHP et par spectrométrie de masse, que les caramels que nous avons préparés sont des composés de faibles masses molaires (0,4 kg/mol), du même ordre de grandeur que celles des triholosides.

Mélanoïdines

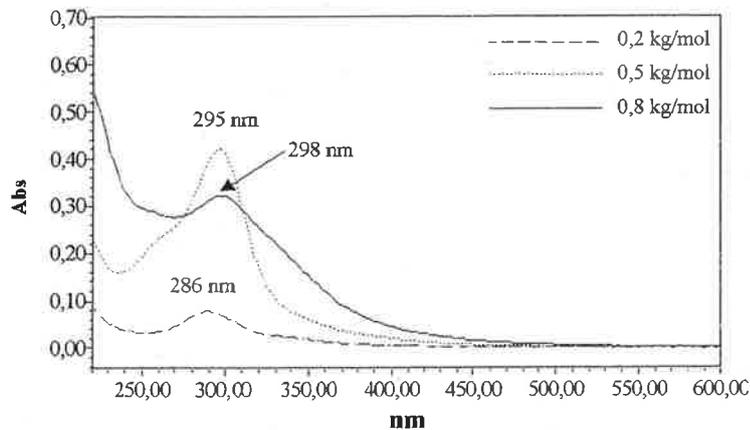
Les mélanoidines que nous avons préparés ont des masses molaires entre 0,09 kg/mol et 22 kg/mol **figure III.31.a**. On peut distinguer, dans le chromatogramme des mélanoidines à 300 nm, six sommets de pics différents. La **figure III.31.b** représente les spectres superposés des trois premiers sommets, correspondant aux masses molaires de 4 kg/mol, 3 kg/mol et 1,9 kg/mol. Ces spectres sont pratiquement identiques. Ils présentent



a – Chromatogramme des mélanoidines (300 nm)
présentation des masses molaires



b - Spectres des masses molaires de 4 kg/mol, de 3 kg/mol et de 1,9 kg/mol



c - Spectres des masses molaires de 0,8 kg/mol, de 0,5 kg/mol et de 0,2 kg/mol

Figure III.31 : Chromatogramme des mélanoidines à 300 nm avec présentation des masses molaires et des spectres aux sommets des pics

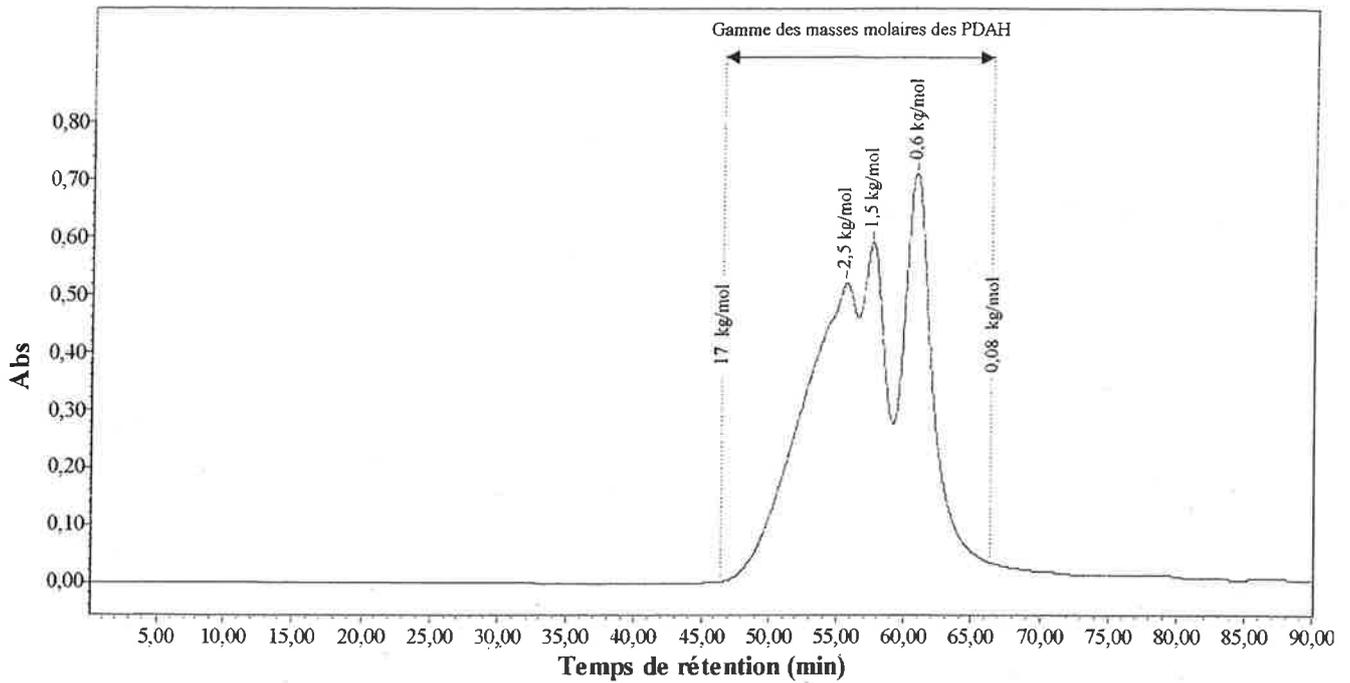
un palier s'étalant de 268 nm à 320 nm. Ce palier est plus prononcé et plus large que celui du spectre global des mélanoidines (**figure II.8**). Les spectres des trois derniers sommets, correspondant aux masses molaires de 0,8 kg/mol, 0,5 kg/mol et 0,2 kg/mol **figure III.31.c**, ne présentent pas de paliers, mais forment chacun un pic d'absorbance bien distingué. Ces pics ont tendance à se décaler vers les hautes longueurs d'ondes avec l'augmentation des masses molaires (286 nm pour 0,2 kg/mol, 295 nm pour 0,5 kg/mol et enfin 298 nm pour 0,8 kg/mol). Ceci est peut-être dû à l'augmentation de la conjugaison des molécules, avec l'augmentation des masses molaires. En effet, la conjugaison induit un effet bathochrome (déplacement du maximum d'absorbance vers des longueurs d'ondes de plus en plus grandes) (Hamon *et al.*, 1990).

Ces résultats montrent que selon leurs masses molaires, les mélanoidines que nous avons formées sont de composition variée. On peut alors distinguer les mélanoidines de hautes masses molaires (entre 1,9 et 4 kg/mol) avec des allures de spectres présentant des paliers, et les mélanoidines de faibles masses molaires (entre 0,2 et 0,8 kg/mol), avec des spectres présentant des pics d'absorbances.

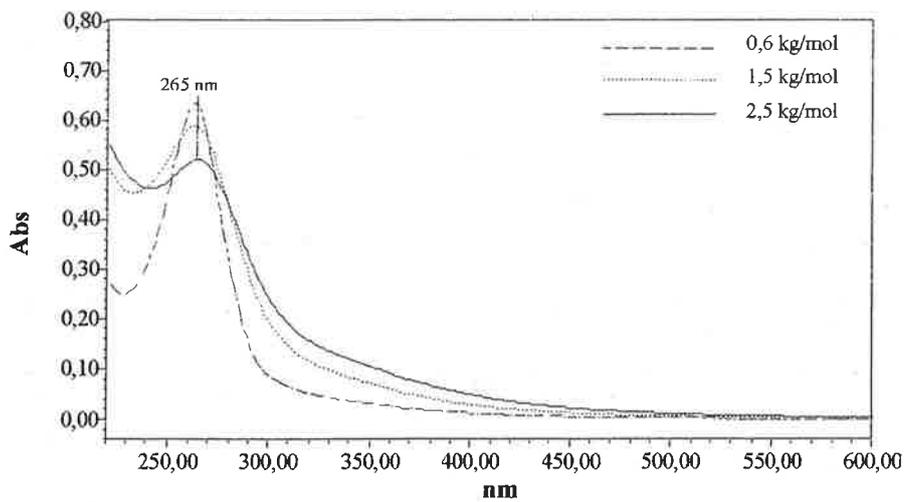
L'allure du spectre du dernier sommet des mélanoidines (sommet des composés de 0,2 kg/mol) (**figure III.31.c**), ressemble beaucoup à celui des caramels correspondant aux mêmes masses molaires (**figure III.30.b**) Ceci confirme probablement, comme apparu d'après la bibliographie (cf. : chapitre I), que ces deux colorants contiennent des composés communs.

PDAH

Les PDAH que nous avons préparés ont des masses molaires entre 0,08 kg/mol et 17 kg/mol **figure III.32.a**. On peut distinguer dans ce chromatogramme trois sommets de pics différents. La **figure III.32.b** représente les spectres de ces trois

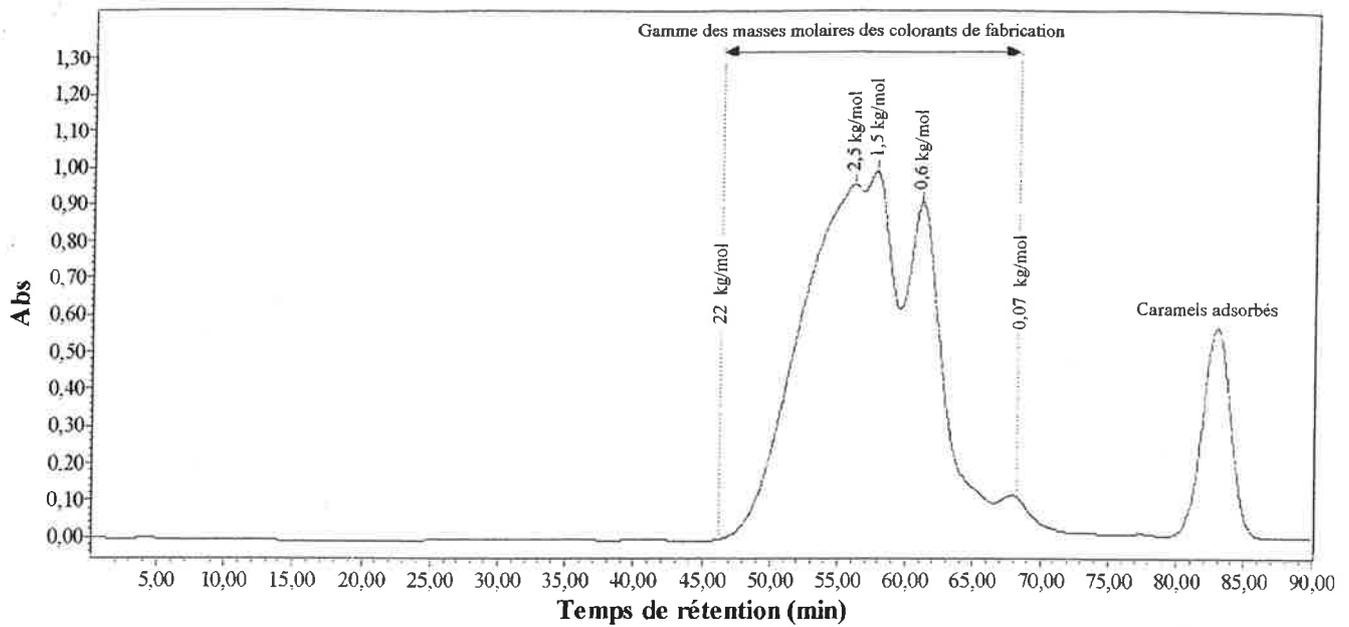


a - Chromatogramme des PDAH (à 265 nm)
Présentation des masses molaires

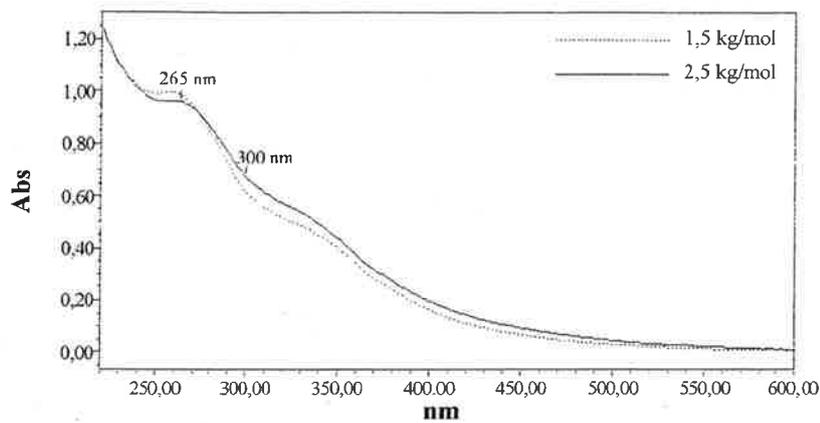


b - Spectres aux sommets des pics (masses molaires de
0,6 kg/mol, de 1,5 kg/mol et de 2,5 kg/mol)

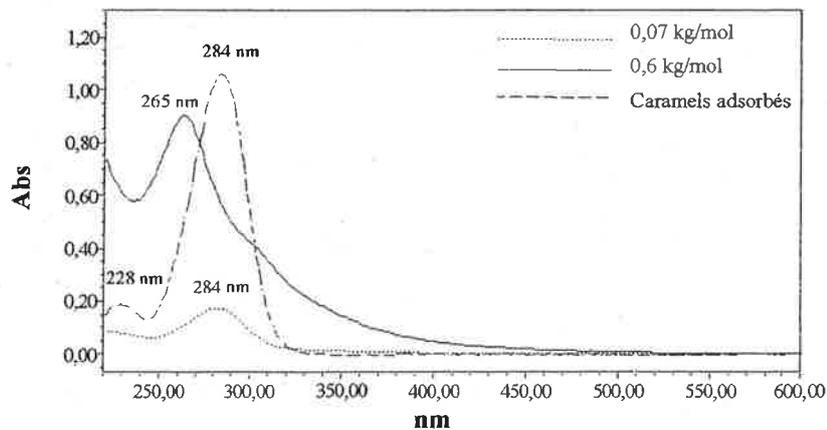
Figure III.32 : Chromatogramme des PDAH à 265 nm avec présentation des masses molaires et des spectres aux sommets des pics



a - Chromatogramme du mélange des 3 colorants
Présentation des masses molaires



b - Spectres des masses molaires de 1,5 kg/mol et de 2,5 kg/mol



c - Spectres des masses molaires de 0,07 kg/mol, de 0,6 kg/mol
et des caramels adsorbés

Figure III.33 : Chromatogramme d'un mélange des 3 colorants à 265 nm avec présentation des masses molaires et des spectres aux sommets des pics

sommets, correspondant aux composés de masses molaires de 2,5 kg/mol, de 1,5 kg/mol et de 0,6 kg/mol. Ces spectres ont pratiquement tous la même allure, présentant un pic d'absorbance maximale vers 265 nm, exactement comme pour le spectre global des PDAH (**figure II.8**).

Mélange des trois colorants

Le mélange des trois colorants englobe, comme prévu, les masses molaires des trois colorants réunis (masses entre 0,07 et 22 kg/mol). Le chromatogramme à 265 nm présente cinq sommets (**figure III.33.a**). Les spectres des deux premiers sommets, correspondant aux masses molaires de 2,5 kg/mol et 1,5 kg/mol, ont les mêmes allures (**figure III.33.b**). Ils présentent deux petits épaulements, le premier vers 300 nm et le second vers 260 nm qui se termine par un léger palier. La présence de ces deux paliers est liée, à notre avis, aux maximums d'absorbance simultanées et décalées des mélanoïdines à 300 nm et des PDAH à 265 nm. Les spectres des trois autres sommets, correspondant aux masses molaires de 0,6 kg/mol, 0,07 kg/mol et au pic adsorbé des caramels, sont présentés en (**figure III.33.c**). Celui à 0,6 kg/mol présente un pic maximum d'absorbance à 265 nm. Il est directement lié à la présence de PDAH dans le mélange. On le reconnaît d'ailleurs très bien, avec la même masse molaire, dans le chromatogramme des PDAH seuls (**figure III.32.b**). Le spectre des composés de masse molaire 0,07 kg/mol correspond à celui des caramels de même masse molaire (**figure III.30.c**). Enfin, le spectre des composés adsorbés correspond bien évidemment à celui des caramels adsorbés (**figure III.30.d**).

Ces résultats montrent qu'une analyse par C.E.S., d'un mélange des trois colorants de fabrication que nous avons préparés, permet de séparer les caramels, des mélanoïdines et des PDAH. Ces deux derniers ont des masses molaires confondues. Il est donc difficile de les séparer par cette méthode. On arrive par extraction et comparaison des spectres, à différents points du chromatogramme d'un mélange, à deviner la présence de tel ou tel colorant, mais on

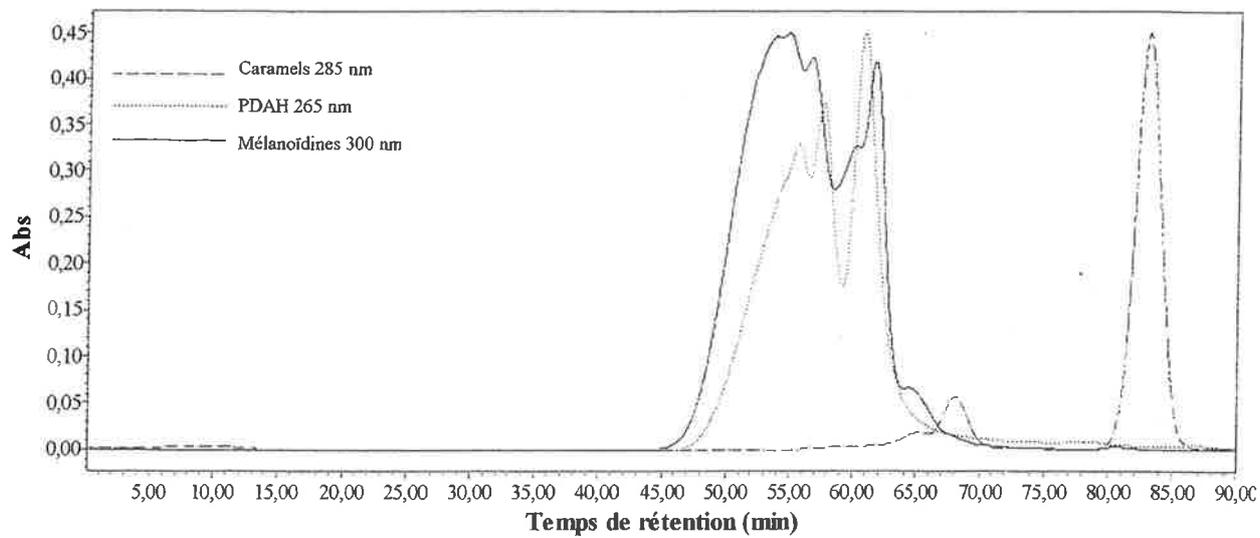


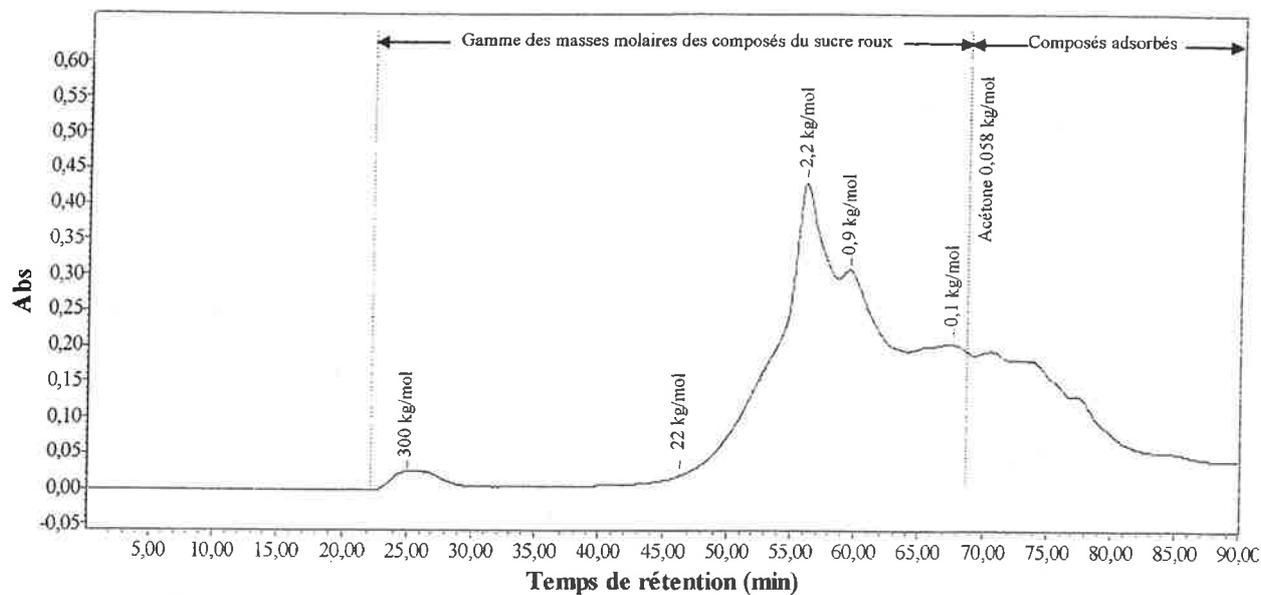
Figure III.34 : Chromatogrammes superposés des trois colorants extraits chacun à son maximum d'absorbance

ne peut pas identifier clairement ces colorants. Afin de mieux illustrer la difficulté de séparation des PDAH et des mélanoïdines, nous avons superposé les chromatogrammes des trois colorants, chacun à son maximum d'absorbance (**figure III.34**). On constate effectivement que même si les mélanoïdines semblent avoir des masses molaires légèrement supérieures aux PDAH, ces deux colorants ont pour une bonne partie de leur composition, des masses molaires communes. Les caramels, par contre, ont des masses molaires plus faibles que les deux autres colorants. Exception faite du petit pic qui est élué en premier, ils sont relativement bien séparés des mélanoïdines et des PDAH.

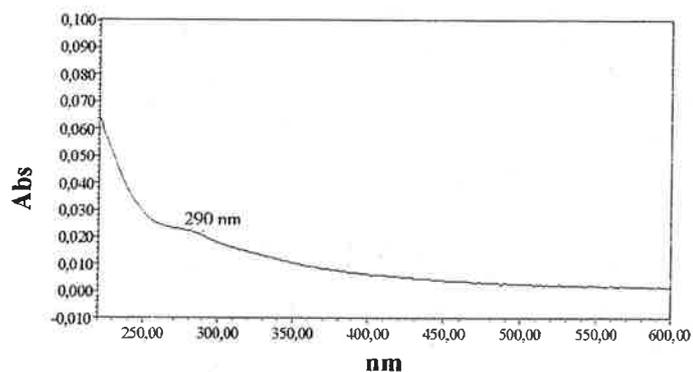
Sucre roux

Puisque nous avons montré aux chapitres I et II que parmi les colorants de fabrication, les PDAH ont le plus de chance de se trouver en sucrerie, nous avons visualisé le chromatogramme du sucre roux à 265 nm (maximum d'absorbance des PDAH). Ce chromatogramme montre que le sucre roux contient des composés de très hautes masses molaires (≥ 300 kg/mol) **figure III.35.a**. Entre 300 kg/mol et 22 kg/mol, aucun composé n'a été détecté dans l'UV. Le sucre roux contient également différents autres composés de masses molaires inférieures ou égales à 22 kg/mol, ce qui correspond parfaitement à la gamme de masses molaires des mélanoïdines et des PDAH que nous avons analysés. Certains composés du sucre roux sont élués au-delà du volume total de la colonne. Ces derniers sont donc adsorbés par le gel superose 12. Parmi ces composés adsorbés, on ne reconnaît pas spécifiquement le pic des caramels adsorbés car nous n'avons pas observé de maximum d'absorbance à 285 nm et nous n'avons pas reconnu l'allure du spectre des caramels.

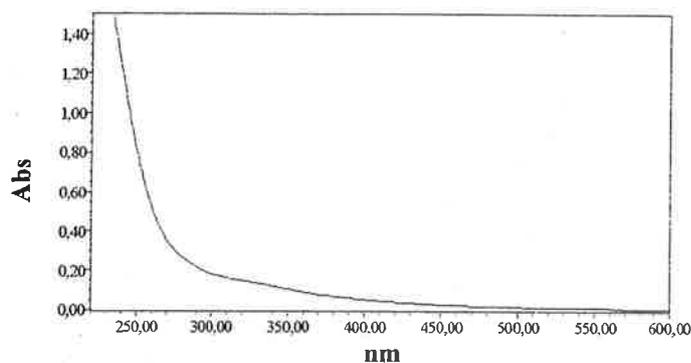
Nous avons présenté en **figure III.35.b, c, d et e**, les spectres respectifs des sommets correspondant à 300 kg/mol, à 2,2 kg/mol, à 0,9 kg/mol et à 0,1 kg/mol. On constate que les spectres des composés de masses molaires de 300 kg/mol, de 0,9 kg/mol et de 0,1 kg/mol (**figure III.35.b, d et e**), semblent plus proches de l'allure des mélanoïdines que de celle des



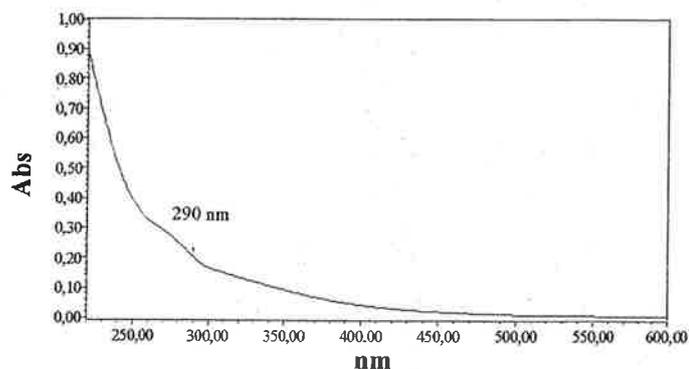
a - Chromatogramme du sucre roux à 265 nm
Présentation des masses molaires



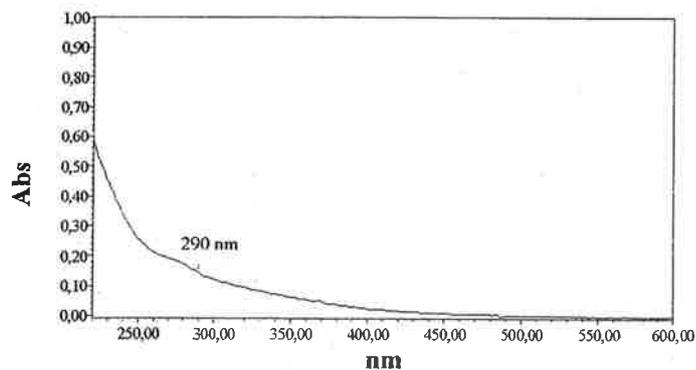
b - Spectre des masses molaires de 300 kg/mol



c - Spectre des masses molaires de 2,2 kg/mol



d - Spectre des masses molaires de 0,9 kg/mol



e - Spectre des masses molaires de 0,1 kg/mol

Figure III.35 : Chromatogramme du sucre roux à 265 nm avec présentation des masses molaires et des spectres aux sommets des pics

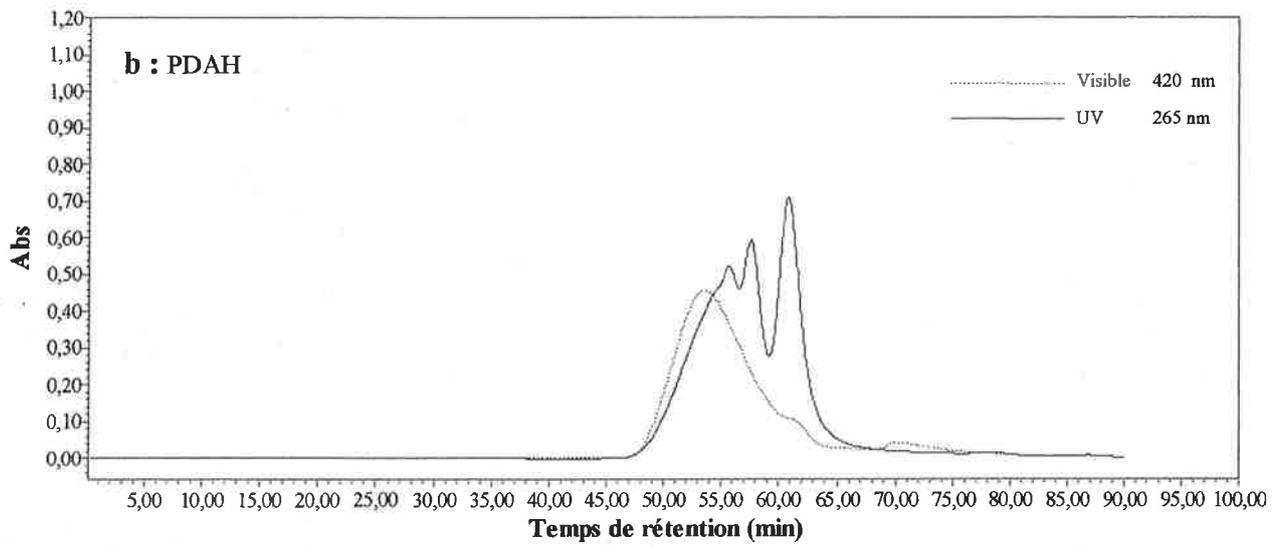
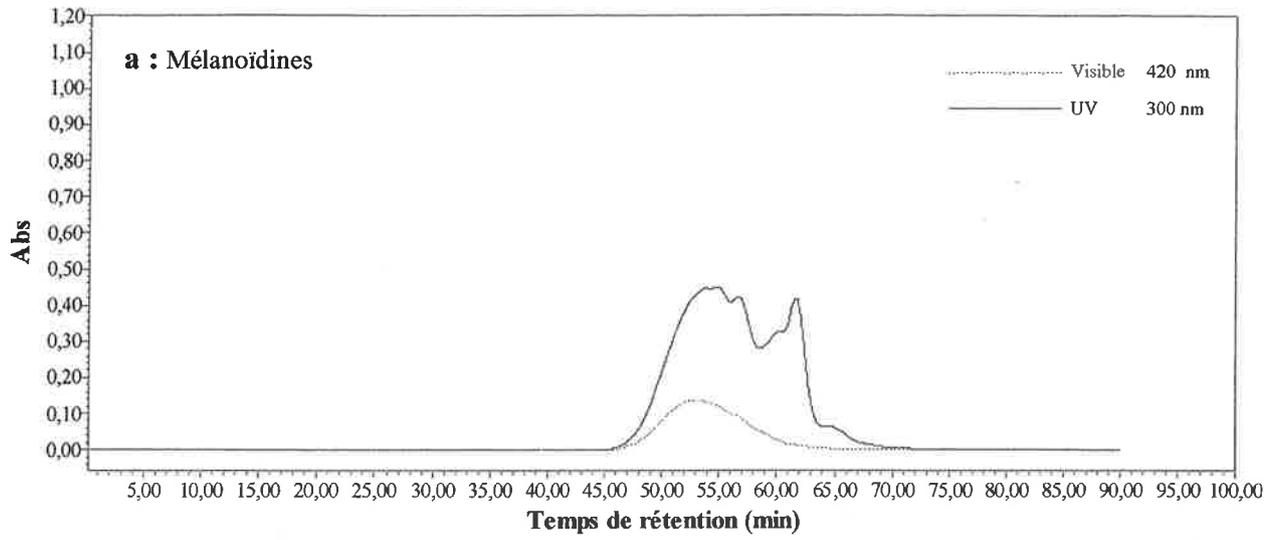


Figure III.36 : Comparaison des chromatogrammes des colorants (mélanoïdines et PDAH) en détection UV et visible

PDAH et des caramels. En effet, ils ne présentent pas de pics d'absorbance spécifiques mais ont plutôt tendance à former un épaulement vers les 290 nm. Le double épaulement observé précédemment (**figure III.33.b**) dans les spectres du mélange des trois colorants est absent. Quant au spectre correspondant aux masses molaires de 2,2 kg/mol (**figure III.35.c**), il ne présente pas de spécificité et ne donne aucune information.

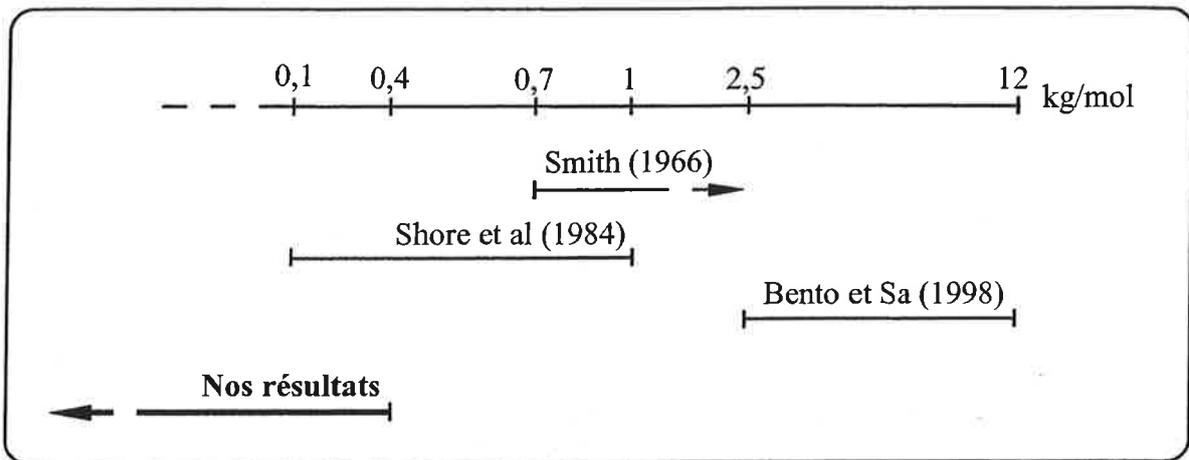
Les composés de masses molaires supérieures ou égales à 300 kg/mol rencontrés dans le sucre roux n'apparaissent pas lors de l'injection des trois colorants de fabrication individuellement. Ces composés sont probablement des complexes formés par les colorants et d'autres macromolécules comme les polysaccharides (Godshall *et al.*, 1987 ; Bento et Sa 1998).

4.2.2 RESULTATS OBTENUS PAR DETECTION DANS LE VISIBLE

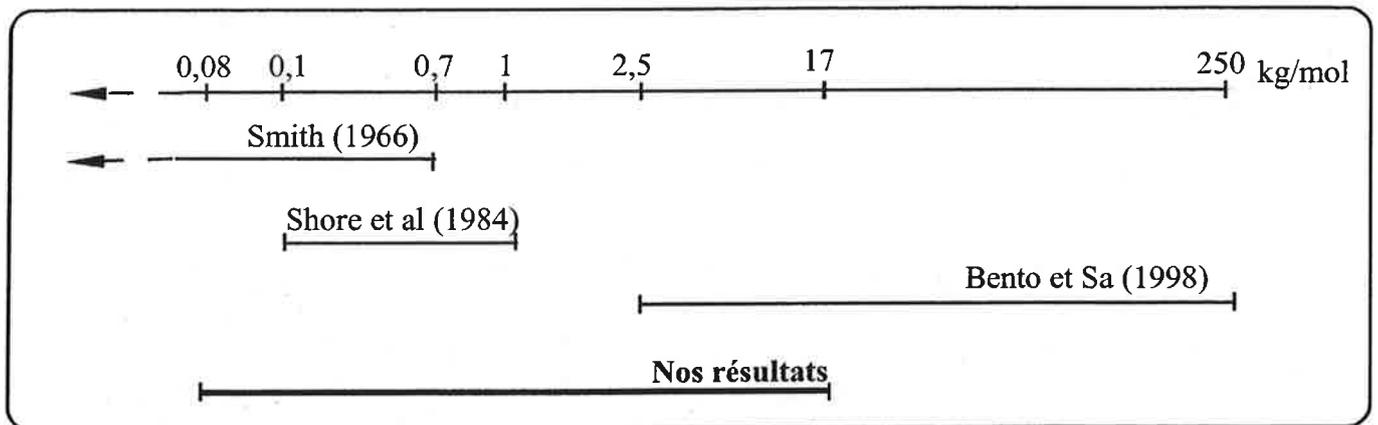
Sachant que l'absorbance dans l'UV est davantage liée à la nature chimique d'un composé qu'à son intensité de coloration, nous avons également déterminé les masses molaires des colorants de fabrication par détection dans le visible. Les caramels tels que nous les avons préparés, n'étaient pas assez concentrés, pour être détectés dans le visible. La **figure III.36** représente, pour chaque colorant, les chromatogrammes superposés dans le visible (à 420 nm) et dans l'UV (maximum d'absorbances du colorant en question).

Pour les mélanoïdines (**figure III.36.a**) et les PDAH (**figure III.36.b**), on constate que les plus hautes masses molaires ont la plus forte absorbance dans le visible. Ceci est logique, puisqu'on a plus de doubles liaisons conjuguées dans les colorants de haute masse molaire que dans les colorants de faible masse molaire. Or l'absorbance dans le visible se fait plutôt quand il y a beaucoup de doubles liaisons conjuguées.

Caramels



PDAH



Mélanoïdines

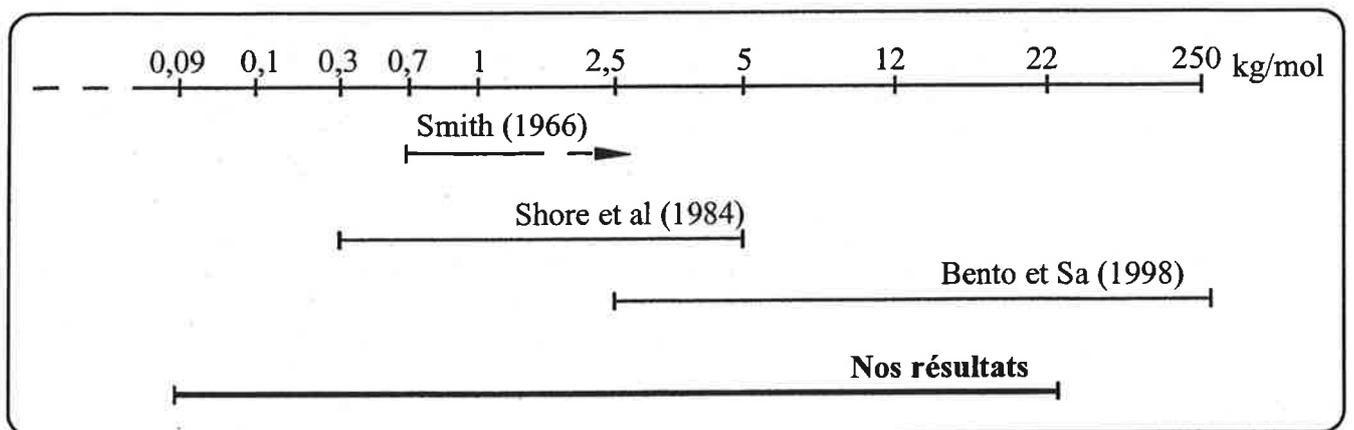


Figure III.37 : Comparaison des masses molaires des colorants de fabrication que nous avons obtenue avec celles rencontrées dans la littérature

4.2.3 COMPARAISON DES MASSES MOLAIRES QUE NOUS AVONS OBTENUES AVEC CELLES RENCONTREES DANS LA LITTERATURE

Comparés aux mélanoidines et aux PDAH, les caramels que nous avons préparés sont des composés de faibles masses molaires, inférieures à 0,4 kg/mol. Les mélanoidines et les PDAH que nous avons préparés ont des masses molaires très proches (0,09 kg/mol à 22 kg/mol pour les premiers contre 0,08 kg/mol à 17 kg/mol pour les seconds). Ces résultats ne correspondent pas tout à fait aux résultats rencontrés dans la littérature. Afin de mieux comparer les résultats de masses molaires que nous avons trouvés avec ceux rencontrés dans la littérature, nous avons construit en **figure III.37**, un diagramme comparatif pour les trois colorants. Concernant les caramels, les masses molaires que nous avons mesurées sont les plus petites. C'est probablement dû à notre méthode de préparation de ces composés qui est surtout basée sur les conditions de sucrerie et qui n'est pas forcément favorable à la formation des caramels. Pour les mélanoidines, nous avons trouvé des masses molaires comparables à celles trouvées par tous les autres auteurs. Bento et Sa (1998) trouvent, cependant que les masses molaires de ces mélanoidines peuvent atteindre des valeurs beaucoup plus élevées que celles que nous avons trouvées. En ce qui concerne les PDAH, nous avons également trouvé des masses molaires communes avec les autres auteurs. Cependant, Bento et Sa (1998) trouvent que ces colorants peuvent avoir des masses molaires plus élevées que les nôtres, alors que Smith (1966) trouve qu'elles sont au contraire plus faibles. Ces différences de masses molaires des colorants s'expliquent : d'une part, par le fait que les étalons diffèrent d'un auteur à un autre. Même si nous avons utilisé les mêmes étalons et le même gel que Bento et Sa (1998), nous n'avons pas utilisé la même phase éluante, ce qui peut modifier bien des choses.

D'autre part, le choix de la méthode de préparation des colorants est primordial. En effet, si les conditions ne sont pas suffisantes pour que les colorants puissent se polymériser, les masses molaires ne sont pas très élevées.

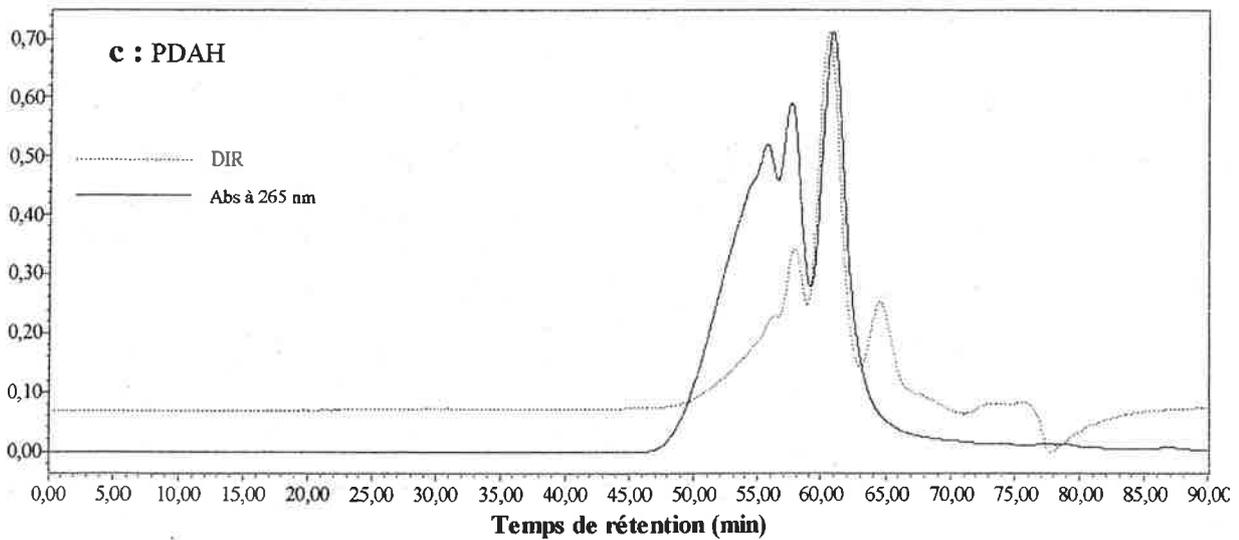
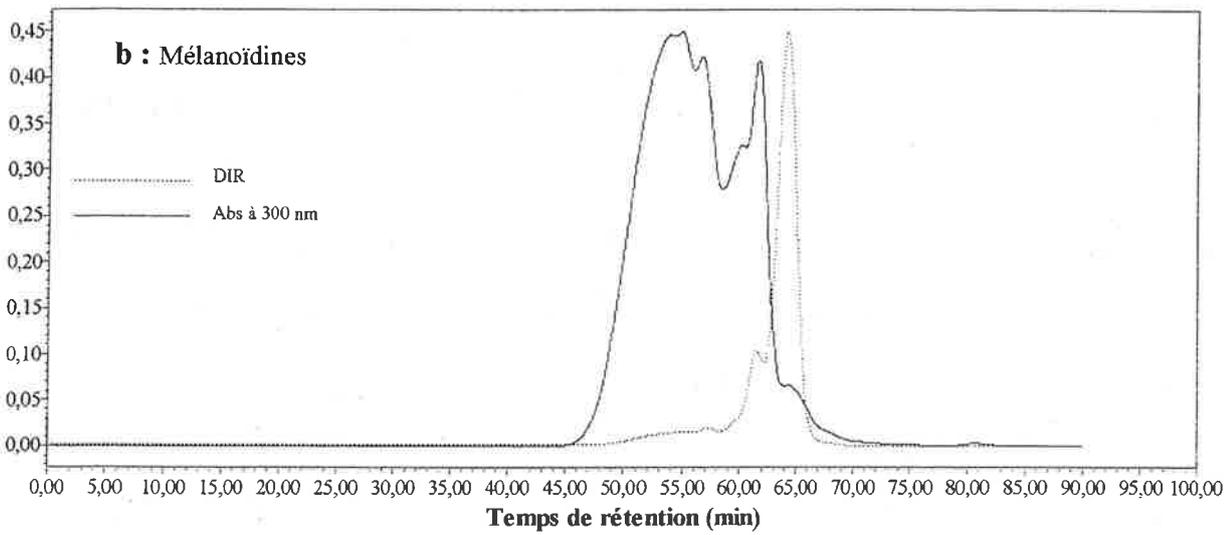
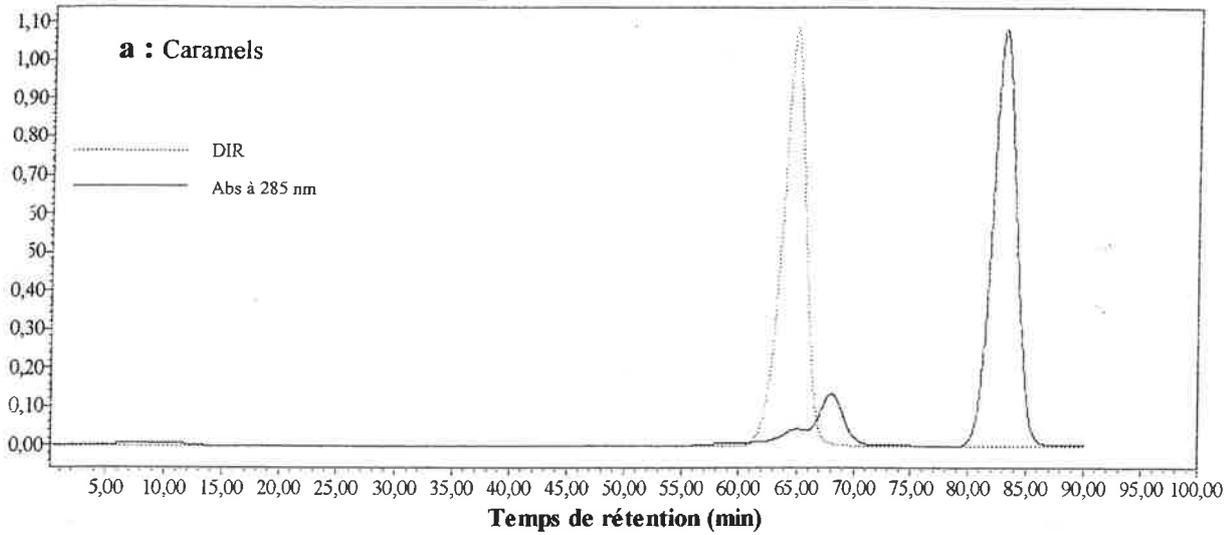


Figure III.38 : Comparaison de la détection des colorants par absorbance et par réfractométrie. Chromatogrammes à échelle normée

4.2.4 LES COLORANTS CONTIENNENT-ILS UNE GRANDE PROPORTION DE COMPOSES DE HAUTES MASSES MOLAIRES ?

Le D.B.D. permet de mesurer l'absorbance des composés à différentes longueurs d'onde des domaines UV et Visible. Le réfractomètre mesure indirectement une quantité de matière sèche qui correspond à une concentration. Nous avons voulu voir, pour les colorants de fabrication préparés et analysés, quelles sont les masses molaires qui prédominent au niveau concentration. Pour cela, nous avons superposé pour chaque colorant, le chromatogramme détecté en UV à son maximum d'absorbance, avec celui détecté au réfractomètre (**figure III.38**). L'absorbance et l'indice de réfraction n'étant pas du même ordre de grandeur, les chromatogrammes ont été normés selon l'axe des ordonnées, afin de pouvoir les comparer. Il faut considérer dans cette comparaison qu'il y a un temps de retard de 0,5 min entre les deux détecteurs.

Pour les caramels (**figure III.38.a**), nous constatons que les composés majoritaires en réfractométrie sont les plus gros (0,2 kg/mol), alors que leur intensité d'absorbance est très faible. Pour les composés de 0,07 kg/mol et les composés adsorbés, nous n'avons pratiquement pas détecté de matières sèches pour des intensités d'absorbance plus importantes, en particulier pour le pic des composés adsorbés.

Concernant les mélanoïdines (**figure III.38.b**) et les PDAH (**figure III.38.c**), on constate que contrairement aux caramels, ce sont les composés de plus faibles masses molaires qui sont majoritaires. Les colorants que nous avons préparés n'ont donc pas eu le temps de se polymériser, et la proportion de faibles masses molaires y est prédominante.

Ces résultats montrent que le réfractomètre n'est pas très sensible pour détecter des composés très peu concentrés. Ils montrent aussi que la mesure de l'absorbance pour un mélange de composés n'est pas quantitative mais seulement qualitative, ce qui veut dire qu'un composé ayant une forte intensité d'absorbance n'est pas forcément majoritaire dans une solution. Cette

forte intensité d'absorbance peut n'être due, qu'à son coefficient spécifique d'absorbance molaire élevé.

5. CONCLUSION

La mise au point de la chromatographie d'exclusion stérique s'est avérée plus compliquée que prévu. En effet, après avoir choisi et monté l'ensemble des éléments de l'analyse, nous avons été confrontés à des phénomènes d'interactions entre la matrice du gel et les colorants de fabrication. Ces interactions ne seraient apparemment ni spécifiquement ioniques ni spécifiquement hydrophobes. Elles seraient dues à des interactions d'affinités spécifiques entre les composés des colorants, et des groupements, probablement des sulfates, contenus dans le gel superose 12. En utilisant le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M comme phase éluante, nous avons réussi à annuler les interactions entre les colorants et le gel, sauf pour le cas des caramels. Nous avons pour cela étudié l'influence de la concentration et de la température sur les temps de rétention de ces colorants. Etant donné la persistance du problème d'interactions entre les caramels et le gel, nous avons employé d'autres méthodes d'analyse afin de vérifier si les composés adsorbés n'avaient pas des faibles masses molaires. Nous avons alors montré que les caramels sont des composés de faibles masses molaires proches de la structure des triholosides. Ces résultats ont été obtenus par analyse en spectrométrie de masse et confirmés par analyse en CLHP. Nous avons donc décidé de nous affranchir des composés adsorbés sachant que ces derniers ont des faibles masses molaires. Enfin, nous avons pu mesurer les masses molaires des différents colorants et les résultats obtenus ont abouti à plusieurs conclusions.

Les caramels que nous avons préparés sont des composés de faibles masses molaires. Les mélanoidines et les PDAH ont des masses molaires plus élevées et très proches. Contrairement aux caramels qui sont bien séparés des autres, les mélanoidines et les PDAH ne sont pas bien séparés par C.E.S.. Même par extraction et comparaison des spectres, on arrive à

deviner la présence de certains colorants, mais il est impossible de les identifier clairement dans un mélange.

Contrairement aux caramels et aux PDAH, nous avons constaté que la composition des mélanoidines varie avec leur masse molaire. Nous avons également mis en évidence, par comparaison des spectres, la présence possible de composés communs entre les mélanoidines et les caramels.

Le sucre roux (lot 15) que nous avons analysé contient des composés de très hautes masses molaires (≥ 300 kg/mol), probablement des complexes formés par des colorants et des macromolécules comme les polysaccharides. Ce sucre contient également des composés qui coïncident très bien avec la gamme de masses molaires des colorants de fabrication. Entre les grosses masses molaires et les masses molaires des colorants, rien n'est détecté. Plusieurs spectres du sucre roux ont été visualisés à différentes masses molaires. Même si ces spectres se rapprochent plus de ceux des mélanoidines que de ceux des caramels et des PDAH, il est difficile, vu la complexité du sucre roux, de les exploiter tel quel, pour identifier les colorants. Une analyse par ACP serait peut-être plus intéressante pour différencier les spectres obtenus. On a également constaté que ce sont les plus hautes masses molaires des mélanoidines et des PDAH qui ont la plus forte absorbance dans le visible.

La détection dans l'UV-Visible n'étant pas toujours quantitative, nous avons utilisé le réfractomètre pour déterminer les masses molaires des composés prédominants des colorants. Nous avons trouvé que, pour les caramels, ce sont plutôt les composés de plus hautes masses molaires qui prédominent. En revanche, ce sont les composés de plus faibles masses molaires des mélanoidines et des PDAH qui prédominent. Certains composés ayant une forte absorbance dans l'UV n'étaient pas détectables au réfractomètre. Nous en avons déduit que pour faire une bonne analyse quantitative, il faut s'équiper d'un détecteur plus sensible, comme le détecteur à diffusion de lumière.

Puisque la méthode de C.E.S. est maintenant opérationnelle pour l'analyse des masses molaires des colorants, il est possible d'évaluer leur rétention par filtration tangentielle. C'est ce que nous allons présenter dans le chapitre suivant.

Chapitre IV

UTILISATION DE LA C.E.S. POUR CARACTERISER L'EFFICACITE DE LA RETENTION DES COLORANTS DE SUCRERIE PAR FILTRATION TANGENTIELLE

| | |
|--|------------|
| 1. LA FILTRATION TANGENTIELLE | 104 |
| 1.1 Définition et principe..... | 104 |
| 1.2 Critères d'évaluation..... | 105 |
| 1.3 Membranes | 106 |
| 1.3.1 Nature des membranes..... | 106 |
| 1.3.2 Géométrie des membranes..... | 107 |
| 1.3.3 Différentes techniques membranaires..... | 107 |
| 2. FILTRATION DES COLORANTS ET D'UNE REFONTE DE SUCRE ROUX À L'ECHELLE DU LABORATOIRE | 108 |
| 2.1 Matériel utilisé..... | 109 |
| 2.1.1 Description de la cellule à agitation magnétique | 109 |
| 2.1.2 Membranes utilisées | 109 |
| 2.1.3 Mode opératoire d'une filtration | 110 |
| 2.1.4 Nettoyage des membranes | 110 |
| 2.2 Analyse par C.E.S. des produits de filtration | 111 |
| 2.2.1 Filtration des colorants | 111 |
| 2.2.2 Filtration de la refonte de sucre roux..... | 112 |
| 2.2.2.1 <i>Analyse des chromatogrammes</i> | <i>112</i> |
| 2.2.2.2 <i>Proposition d'un mode d'évaluation de la sélectivité de la membrane.....</i> | <i>114</i> |
| 3. FILTRATION À L'ECHELLE DU PILOTE..... | 115 |
| 3.1 Réalisation des essais..... | 115 |
| 3.1.1 Description du pilote | 115 |
| 3.1.2 Membranes étudiées | 117 |
| 3.1.3 Conduite des essais..... | 118 |
| 3.1.4 Critères d'évaluation..... | 119 |
| 3.2 Résultats..... | 120 |
| 3.2.1 Evolution des densités de flux de filtrat..... | 120 |
| 3.2.2 Taux de clarification et de décoloration | 122 |
| 3.2.3 Analyse des échantillons par C.E.S. | 122 |
| 4. CONCLUSION | 123 |

D'après les résultats de plusieurs études décrites au chapitre I, les colorants de hautes masses molaires sont ceux qui se retrouvent le plus dans les cristaux. Ces colorants peuvent ne pas être très gros mais liés à des polysaccharides, ce qui laisse supposer qu'ils ont des masses molaires élevées. L'élimination de ces colorants par filtration tangentielle pourrait être intéressante. Les colorants que nous avons préparés au laboratoire, analysés par C.E.S, n'ont pas des masses molaires très élevées (≤ 22 kg/mol). Cependant, le sucre roux présentait des composés de masse ≥ 300 kg/mol. Dans le but de déterminer la rétention des colorants et des composés de hautes masses molaires du sucre roux, nous les avons filtrés avec des membranes de différents seuils de coupure. Nous avons ensuite évalué la rétention de ces composés par analyse en C.E.S.

Dans ce chapitre, le principe de la filtration tangentielle est tout d'abord rappelé. Ensuite, les différents essais de filtration réalisés sur les colorants et le sucre roux, à l'échelle du pilote et à l'échelle du laboratoire sont décrits ainsi que l'analyse de leurs produits par C.E.S.

1. LA FILTRATION TANGENTIELLE

1.1 DEFINITION ET PRINCIPE

La filtration tangentielle est une technique séparative plus récente que la filtration frontale. Dans la filtration frontale, les constituants retenus s'accumulent en amont et dans la masse du filtre. Ils finissent donc par le colmater entièrement. Ces filtres doivent être changés périodiquement et ils ne servent en général qu'une seule fois. Par contre, en filtration tangentielle, la solution à traiter circule parallèlement à la membrane. Ainsi l'accumulation de matières en surface de la membrane est limitée par d'importantes contraintes de cisaillement à la paroi. Le colmatage est donc fortement réduit. Néanmoins, pour la plupart des utilisations, l'installation doit être arrêtée pour un nettoyage chimique, au bout d'un certain temps de filtration.

Dans les deux cas, le principal paramètre est le gradient de pression transmembranaire (P_{tm}) qui permet le transfert de matière. Pour la filtration tangentielle, le second paramètre important est le débit de circulation (D_c) qui agit sur le balayage de la surface membranaire. L'intérêt de la filtration tangentielle par rapport à la filtration frontale est de filtrer pendant des périodes plus longues et avec de meilleurs flux.

1.2 CRITERES D'EVALUATION

Le résultat de la filtration tangentielle est évalué par deux critères :

- La sélectivité de la filtration tangentielle est évaluée par la comparaison entre le rétentat et le filtrat selon un ou plusieurs critères. Par exemple, elle correspond à la capacité de la membrane à retenir le plus de composants présents dans le rétentat. Si on veut clarifier un produit, on considère la rétention de la matière responsable du trouble.
- La performance d'une installation de filtration tangentielle à l'échelle industrielle représente la quantité de produit traité par la membrane pendant un temps de cycle donné et pour des conditions opératoires fixées. La notion de cycle de fonctionnement comprend la durée de filtration et la séquence de nettoyage. Les performances sont essentiellement caractérisées par les densités de flux de filtrat (ou densités de perméabilité) obtenues. Plus les débits de traitement sont élevés, plus le procédé est rentable (Decloux *et al.*, 2000). Il est également important de connaître l'intensité du colmatage. Celui-ci est caractérisé par la résistance hydraulique totale donnée par la loi de Darcy :

$$J_f = \frac{P_{tm}}{\mu_f \cdot R_t} \quad (IV.1)$$

- J_f : densité de flux de filtrat (m/s)
- P_{tm} : pression transmembranaire (Pa)
- μ_f : viscosité dynamique du filtrat (Pa.s)
- R_t : résistance hydraulique totale (m^{-1})

La vitesse d'évolution du colmatage est donnée par les pentes de la courbe d'évolution de la résistance totale au cours du temps.

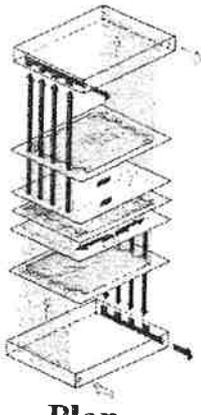
1.3 MEMBRANES

Le principal élément d'une unité de filtration tangentielle est la membrane de filtration. Les membranes ne sont pas toutes de même nature, de même géométrie et ont des seuils de coupure différents.

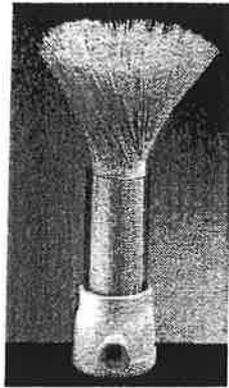
1.3.1 NATURE DES MEMBRANES

On distingue deux classes principales de membranes (Punidades *et al.*, 1990 ; Piron 1996) : les membranes minérales et les membranes organiques.

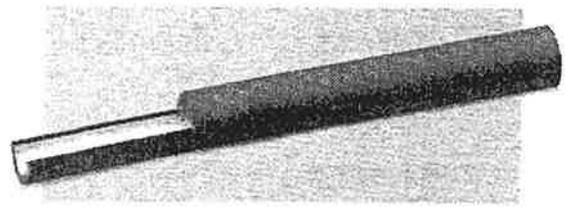
- **Les membranes minérales**, constituées d'un support assurant la résistance mécanique (carbone, alumine, métal) sur lequel sont disposées les couches filtrantes (oxyde métallique, verre, carbone, zirconium, alumine, silice ou inox), présentent de bonnes tenues mécaniques, thermiques et chimiques. En effet, elles peuvent être stérilisées à la vapeur, supportent des pH extrêmes, des attaques chimiques importantes et des pressions à l'éclatement de plusieurs dizaines de bar. Leurs inconvénients sont des procédés de fabrication lourds, des coûts élevés et des rapports (surface sur volume) faibles. Leur durée de vie peut être de plusieurs années et leur nettoyage chimique est facile.
- **Les membranes organiques**, principalement à base de matériel cellulosique (acétate, propionate, ester, nitrate de cellulose) ou de polymères (polysulfones, polyamides fluorés, nylon, polyfluorure de vinylidène, polysulfones) sont sensibles aux pH extrêmes (utilisables entre pH 3 et 9), aux oxydants et à la température. Cependant, l'amélioration de ces membranes est en perpétuelle évolution et elles sont de plus en plus résistantes chimiquement et thermiquement.



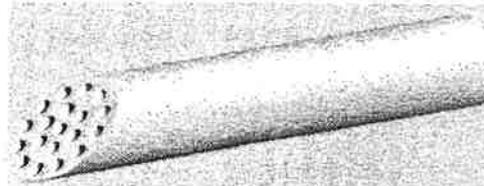
Plan
(organique et minéral)



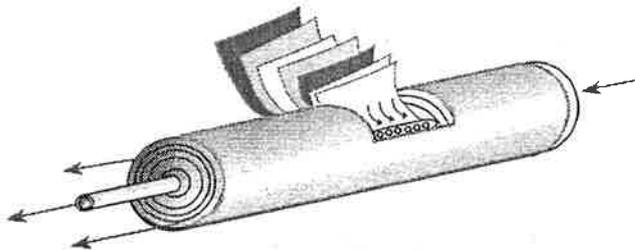
Fibres creuses
(organique)



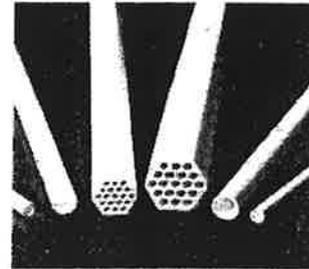
Carbosep-Orelis
(carbone / oxyde zirconium)



Kerasep-Orelis
(alumine / oxyde zirconium)



Spiralé
(organique)



Membralox-Exekia
(alumine / alumine)
(alumine / oxyde zirconium)

Tubulaires
(organique et minérale)

Figure IV.1 : Les différents types de modules

1.3.2 GEOMETRIE DES MEMBRANES

Il existe différentes géométries pour les membranes (**figure IV.1**) :

- Pour les **modules tubulaires**, la partie filtrante de la membrane est déposée à l'intérieur ou à l'extérieur d'un tube, ou à l'intérieur d'un élément multicanal macroporeux assurant la rigidité mécanique de l'ensemble. Les tubes ou éléments multicanaux peuvent être montés en parallèle à l'intérieur d'un même carter pour augmenter la surface de l'installation.
- Dans les **modules plans**, la disposition reprend la technologie du filtre-pressé : les membranes ont la forme de feuillets dont l'empilement permet une très grande compacité.
- Les **modules spiralés** peuvent être assimilés à des modules plans enroulés autour d'un support recueillant le filtrat. Cette géométrie permet d'augmenter la surface de la membrane dans un carter de type tubulaire.
- Dans les **modules fibres creuses**, les membranes se présentent sous la forme de capillaires de quelques dizaines de microns de diamètre à quelques dixièmes de millimètres. La solution circule le plus souvent à l'intérieur mais parfois à l'extérieur pour certains dispositifs d'osmose inverse ou pour des commodités de nettoyage.

1.3.3 DIFFERENTES TECHNIQUES MEMBRANAIRES

Il existe plusieurs types de filtrations tangentielles caractérisés par la taille des molécules retenues par la membrane (**figure IV.2**) (Decloux et Dornier 1993 ; Bouroche et Le Bars 1994 ; Raman *et al.*, 1994).

Plusieurs notions peuvent être utilisées pour caractériser les membranes :

- La **taille des pores** s'exprime en unité de longueur (μm).
- Le **seuil de coupure** d'une membrane est le paramètre désignant la masse molaire à partir de laquelle la majorité des particules ou des molécules (en général entre 95 et 98 %) est efficacement retenue. Il s'exprime en unité de masse molaire (g/mol, anciennement Dalton).

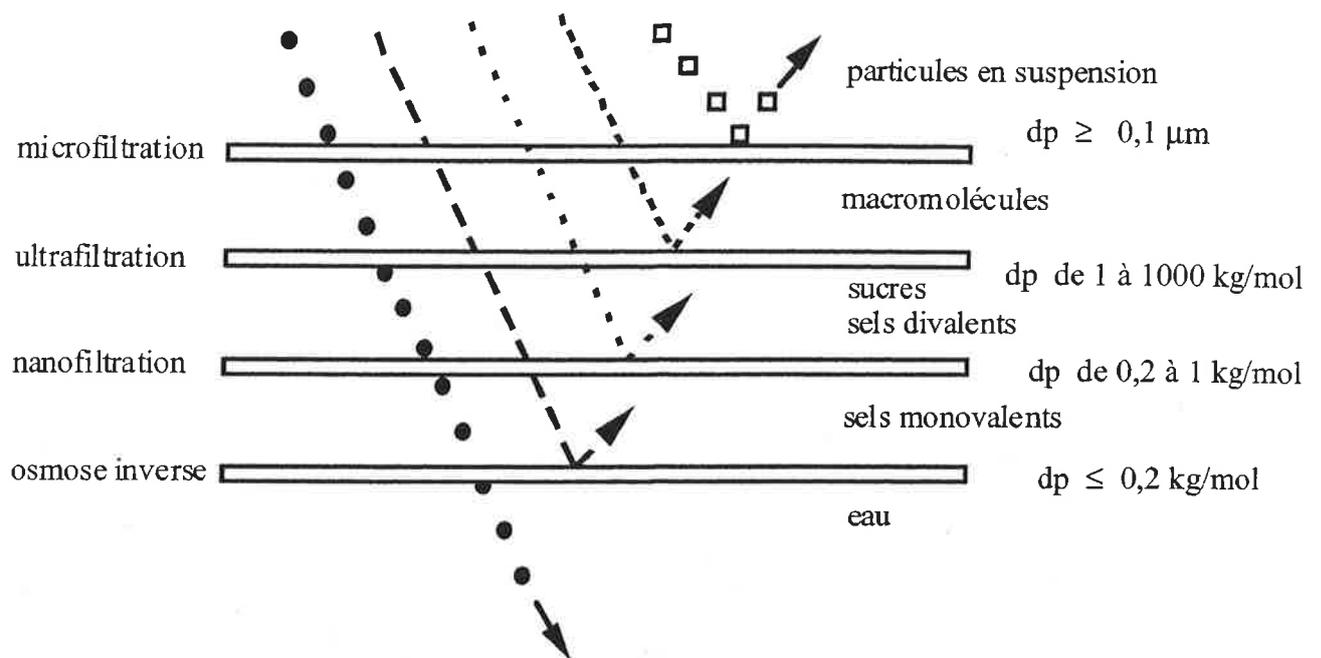


Figure IV.2 : Classification des différents types de filtration

(Raman, 1994)

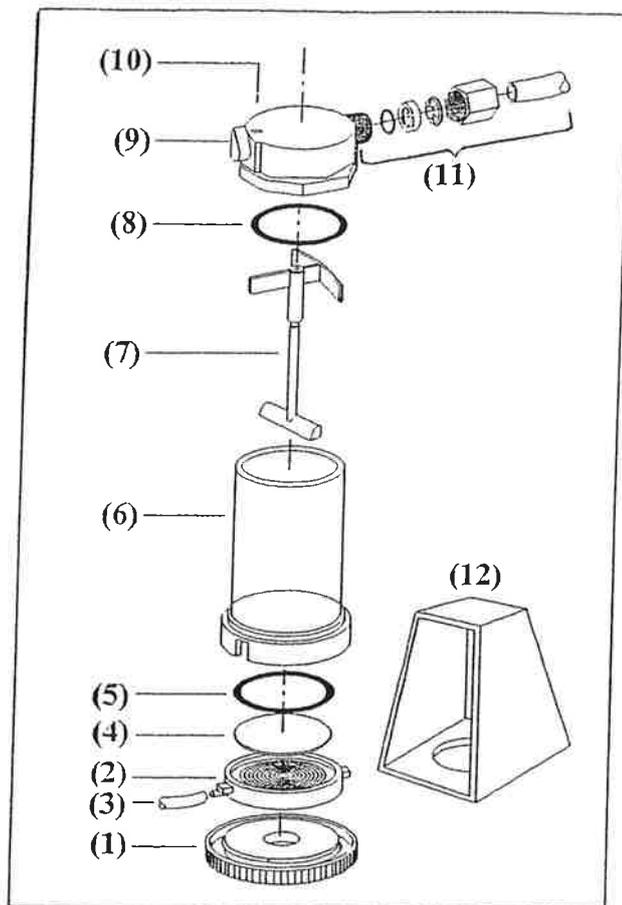
- Par analogie avec le seuil de coupure, le **pouvoir d'arrêt absolu** (P.A.A.) a également été défini. Il représente le diamètre de la plus grosse particule sphérique, indéformable, capable de traverser la membrane dans des conditions normalisées. Quand les pores sont petits, on utilise plutôt l'unité de masse molaire, car la membrane sépare alors des molécules (Punidades 1990 ; Decloux et Dornier 1993).

Pour l'osmose inverse, la nanofiltration et l'ultrafiltration, on raisonne en termes de seuil de coupure, alors qu'en microfiltration, on raisonne plutôt en termes de taille des pores. Ainsi :

- L'**osmose inverse** concerne les solutions de composés ioniques ou moléculaires de faible masse, inférieure à 0,2 kg/mol (Broughton *et al.*, 1995). La pression osmotique n'est pas négligeable, le transport convectif du solvant se fait plutôt par un mécanisme de diffusion que par une filtration à l'échelle moléculaire.
- La **nanofiltration** concerne les solutions dont les molécules à retenir ont une taille de l'ordre du nanomètre. Elle permet le fractionnement ou la concentration de petites molécules (acides aminés, peptides, sels) dont la masse molaire est généralement comprise entre 0,2 et 1 kg/mol.
- L'**ultrafiltration** concerne les solutions de composés ioniques ou moléculaires de masse molaire élevée, typiquement entre 1 et 1000 kg/mol.
- Dans le cas de la **microfiltration**, les constituants retenus sont des particules dont la taille varie de 0,1 μm à 10 μm .

2. FILTRATION DES COLORANTS ET D'UNE REFONTE DE SUCRE ROUX A L'ECHELLE DU LABORATOIRE

Nous avons tenté d'évaluer la rétention des colorants par filtration tangentielle à l'échelle du laboratoire avec des membranes de différents seuils de coupure. Nous avons pris pour cela les colorants modèles, mais également une refonte de sucre roux. Les différents filtrats et rétentats obtenus ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique et les chromatogrammes



- (1) Base
- (2) Support de membrane
- (3) Tuyau d'évacuation de filtrat
- (4) Membrane
- (5) Joint d'étanchéité
- (6) Corps de la cellule
- (7) Assemblage d'agitation magnétique
- (8) Joint d'étanchéité
- (9) Vanne de fermeture pour la mise en pression
- (10) Couvercle de la cellule
- (11) Assemblage de connexion à l'air comprimé pour la mise en pression
- (12) Habitable de la cellule

Figure IV.3 : La cellule à agitation magnétique et ses constituants (Millipore)

obtenus ont été comparés et commentés.

2.1 MATERIEL UTILISE

Les filtrations réalisées à l'échelle du laboratoire ont été effectuées avec une cellule à agitation magnétique. La cellule et les membranes utilisées, ainsi que le mode opératoire d'une filtration, sont décrits ci-dessous.

2.1.1 DESCRIPTION DE LA CELLULE A AGITATION MAGNETIQUE

La cellule à agitation magnétique est une cellule « Millipore type 8200 » (**figure IV.3**). Elle est constituée d'une base (1) et d'un support de membrane (2) qui est muni d'un tuyau d'évacuation de filtrat (3). La membrane (4) est placée dans le support de membrane (2) en dessous d'un joint d'étanchéité (5). Le corps de la cellule (6) est vissé sur l'ensemble. L'assemblage d'agitation magnétique (7) est introduit dans le corps de la cellule de manière à ce que le barreau d'agitation soit placé à ras de la membrane. La cellule est fermée par un couvercle (10) qui est muni d'un joint d'étanchéité (8) et relié à un robinet d'arrivée d'air comprimé par un assemblage de connexion à l'air comprimé (11). Ce couvercle est également muni d'une petite vanne (9) qui sert à fermer hermétiquement la cellule pour la mise sous pression. Lorsqu'elle est sous pression, la cellule est placée dans un habitacle (12) qui retient le couvercle afin de maintenir la cellule fermée.

2.1.2 MEMBRANES UTILISEES

Ce sont des membranes organiques Millipore en polyéthersulfone, recyclables, de diamètre 63,5 mm. Notre objectif étant d'évaluer la rétention des colorants ainsi que celle des grosses molécules de plus de 300 kg/mol rencontrées dans le sucre roux, des membranes



Figure IV.4 : Réalisation d'une filtration avec la cellule à agitation magnétique

d'ultrafiltration ont été choisies avec les seuils de coupure suivants :

- 500 kg/mol de type PBVK
- 100 kg/mol de type PBHK
- 10 kg/mol de type PBGC
- 5 kg/mol de type PBCC

2.1.3 MODE OPERATOIRE D'UNE FILTRATION

L'ultrafiltration, a été réalisée avec la cellule à agitation magnétique munie de la membrane choisie propre et rincée ainsi que du barreau magnétique placé à ras de la membrane. La cellule a été remplie avec la solution à filtrer puis placée dans son habitacle qui maintient l'ensemble. Le tout est posé sur une plaque à agitation magnétique (**figure IV.4**).

Toutes les filtrations ont été réalisées à température ambiante et à 300 tr/min de vitesse d'agitation. Les filtrations avec les membranes de 500 et 100 kg/mol ont été réalisées à une pression de 1 bar tandis que celles avec les membranes de 10 et 5 kg/mol ont été effectuées à 3 et 4 bar, respectivement. Nous avons filtré à chaque fois environ 50 mL de solution.

Avant filtration, les colorants ont été dilués exactement de la même manière que lors des analyses par chromatographie d'exclusion stérique, afin de pouvoir comparer les résultats. Les caramels ont donc été dilués à 1 mL dans 25 mL, les mélanoïdines à 1 mL dans 50 mL et les PDAH à 3 mL dans 50 mL. Le sucre roux a été dilué à 45 g/100 g de solution.

2.1.4 NETTOYAGE DES MEMBRANES

Le nettoyage des membranes Millipore se fait avec une solution à 0,1 M de soude (NaOH), contenant 100 ppm d'hypochlorite de soude (NaOCl appelé eau de javel) et à température ambiante. Chaque membrane doit être nettoyée après utilisation. Dans un premier temps, il faut filtrer 50 mL de la solution de nettoyage pour que celle-ci traverse la membrane. Ensuite

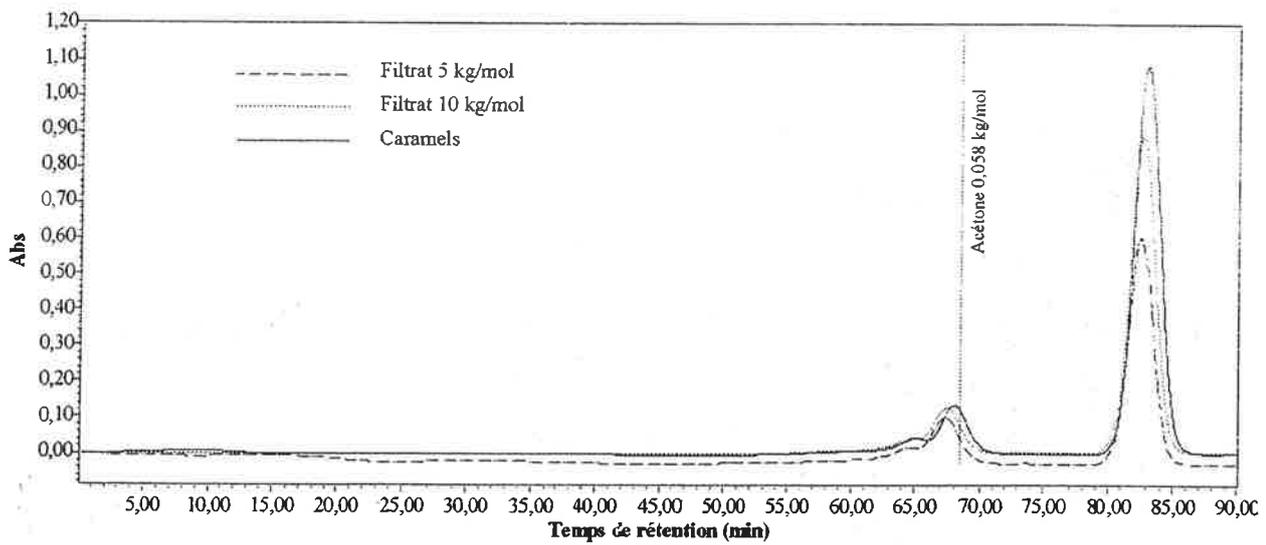
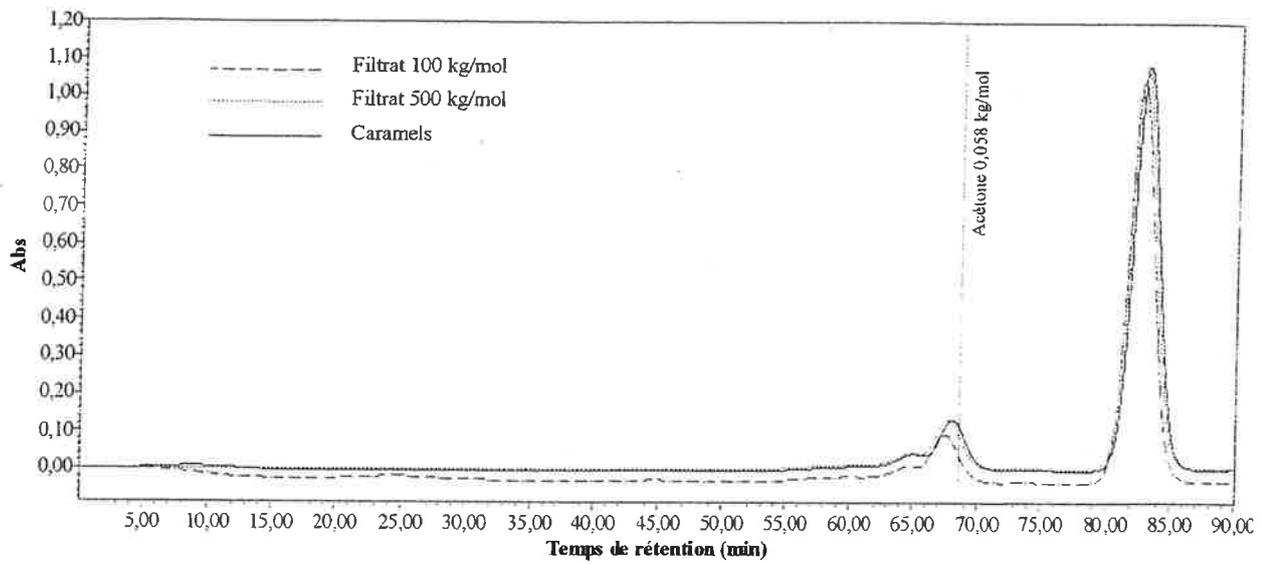


Figure IV.5 : Chromatogrammes (à 285 nm) des caramels et de leurs produits de filtration avec des membranes de 500, 100, 10 et 5 kg/mol

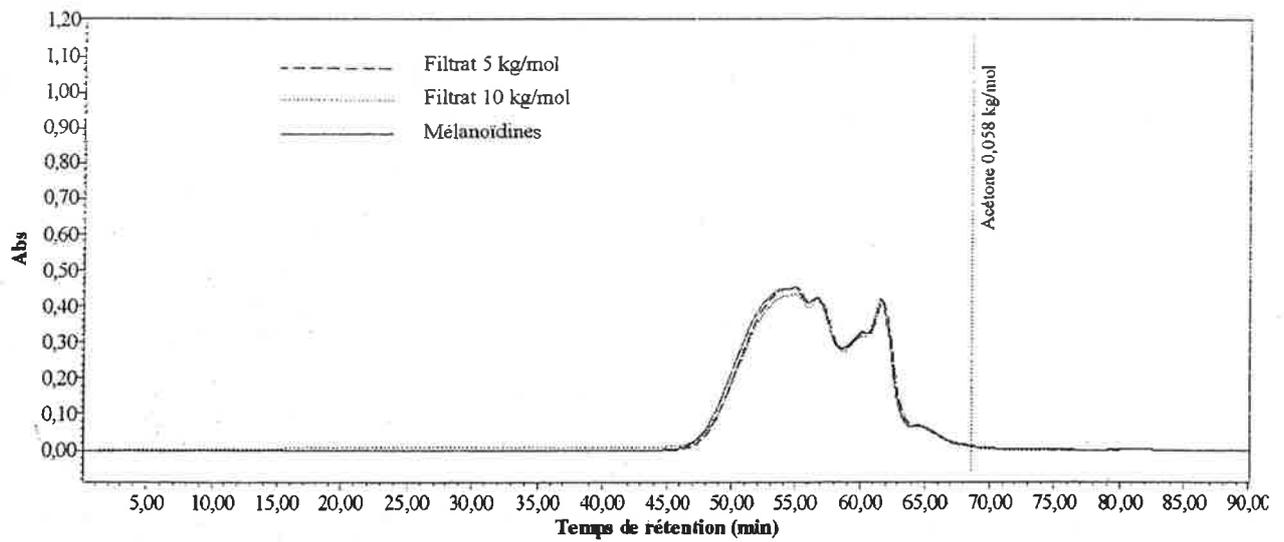
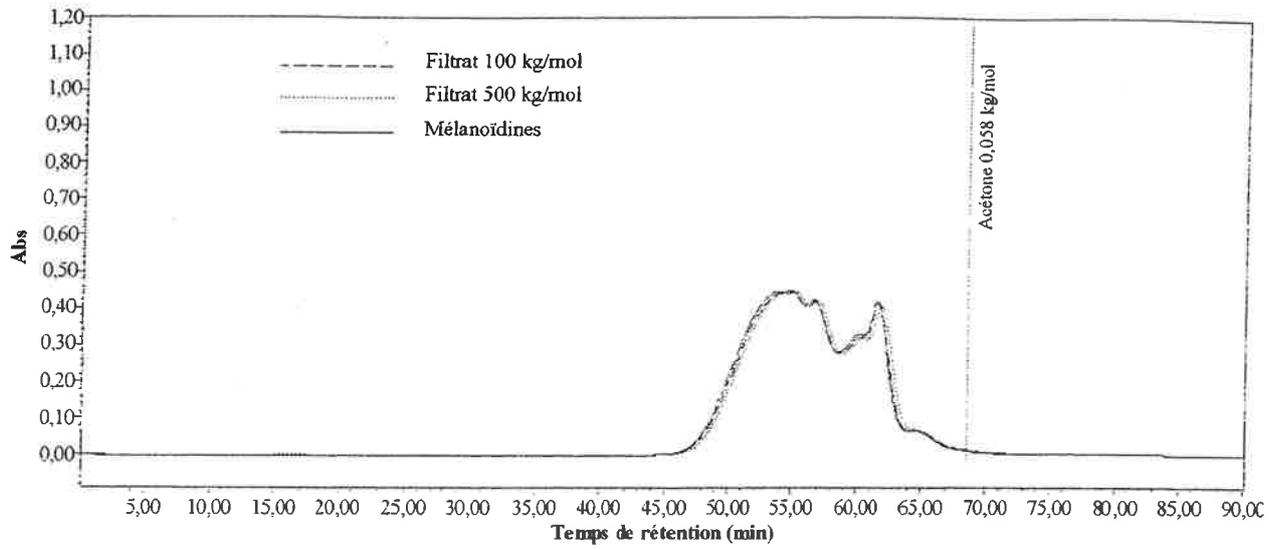


Figure IV.6 : Chromatogrammes (à 300 nm) des mélanoïdines et de leurs produits de filtration avec des membranes de 500, 100, 10 et 5 kg/mol

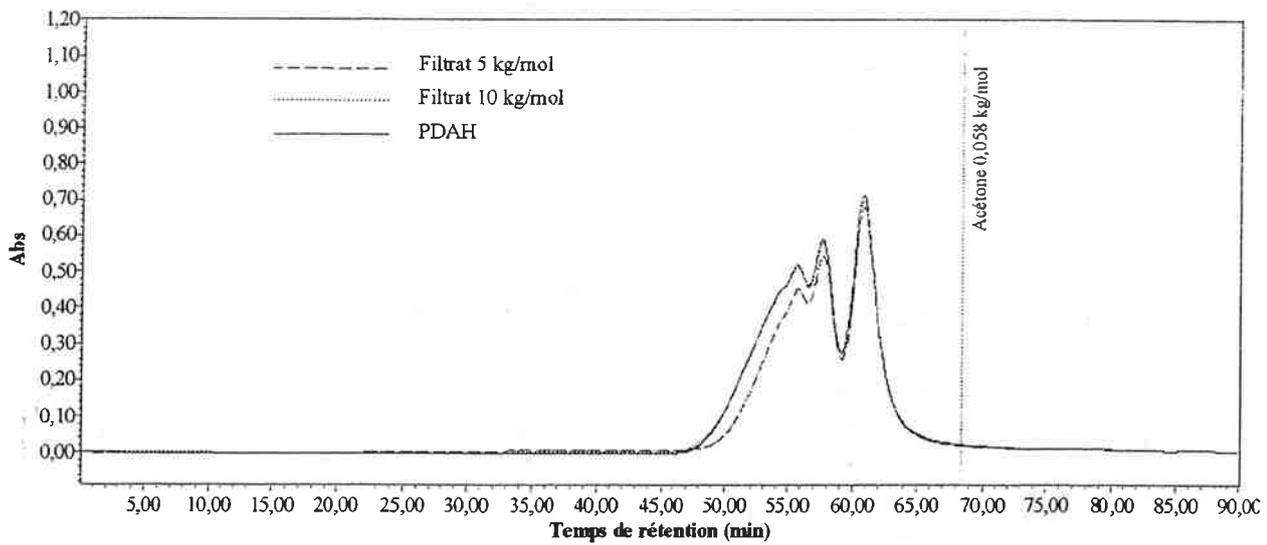
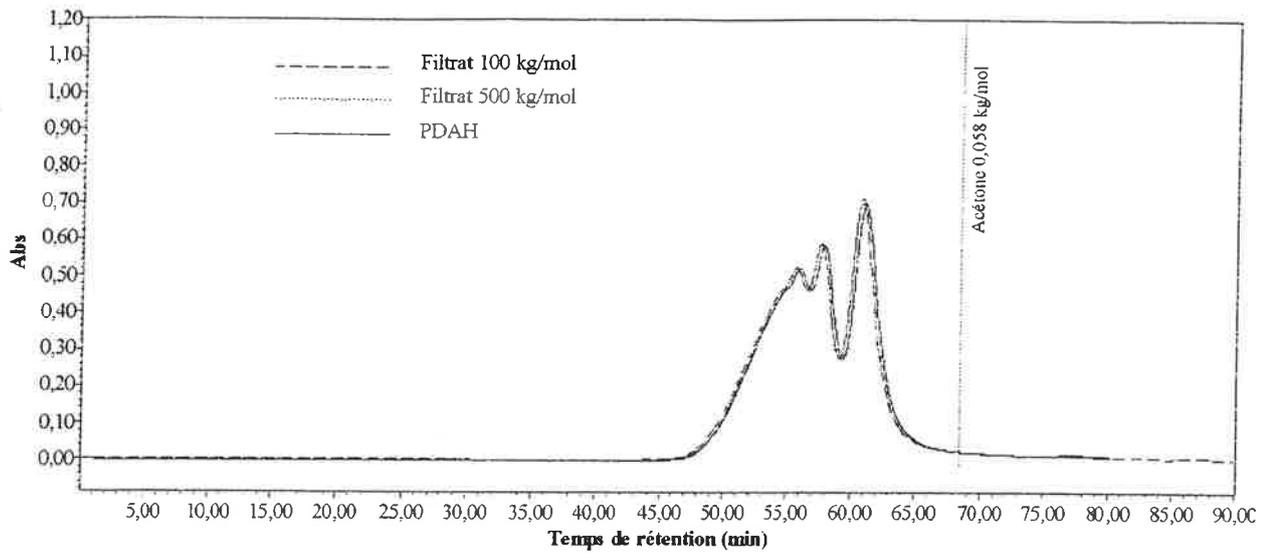


Figure IV.7 : Chromatogrammes (à 265 nm) des PDAH et de leurs produits de filtration avec des membranes de 500, 100, 10 et 5 kg/mol

la membrane est immergée dans la solution de nettoyage pendant 30 min. Enfin, la membrane est rincée abondamment à l'eau par immersion et par filtration. Après rinçage, l'efficacité du nettoyage est évaluée par comparaison du spectre UV de l'eau ultra pure avant et après filtration. Le nettoyage est réalisé dans les mêmes conditions de pression et de vitesse d'agitation qu'une filtration.

2.2 ANALYSE PAR C.E.S. DES PRODUITS DE FILTRATION

Les analyses par C.E.S. ont été réalisées dans les mêmes conditions que celles mises au point au chapitre III. La phase éluante est constituée de tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M. Le débit d'analyse est de 0,3 mL/min et le volume d'injection de 200 μ L. La plage de rétention exploitable se situe entre 26,8 min (bleu dextran) et 68,63 min (acétone)

2.2.1 FILTRATION DES COLORANTS

Nous avons tout d'abord analysé les filtrats des colorants en comparant les chromatogrammes avec ceux de ces mêmes colorants non filtrés, analysés à même dilution et dans des conditions identiques (**figures IV.5, 6 et 7**). On constate que :

- Les caramels (**figure IV.5**) ne sont pas du tout retenus par les membranes de 500 kg/mol et de 100 kg/mol. Par contre, avec les membranes de 10 et 5 kg/mol, le pic de caramels adsorbés décroît ce qui signifie que les composés qui le constituent sont retenus par ces membranes.
- Les mélanoidines (**figure IV.6**) qui ont, d'après nos résultats précédents, des masses molaires (entre 0,09 kg/mol et 22 kg/mol), ne sont retenues par aucune des membranes.
- Les PDAH, de masses molaires (entre 0,08 kg/mol et 17 kg/mol) (**figure IV.7**) ne sont pas non plus retenus par les membranes de 500, 100 et 10 kg/mol mais sont partiellement retenus par la membrane de 5 kg/mol Cette rétention concerne surtout les masses molaires supérieures ou égales à 2,5 kg/mol.

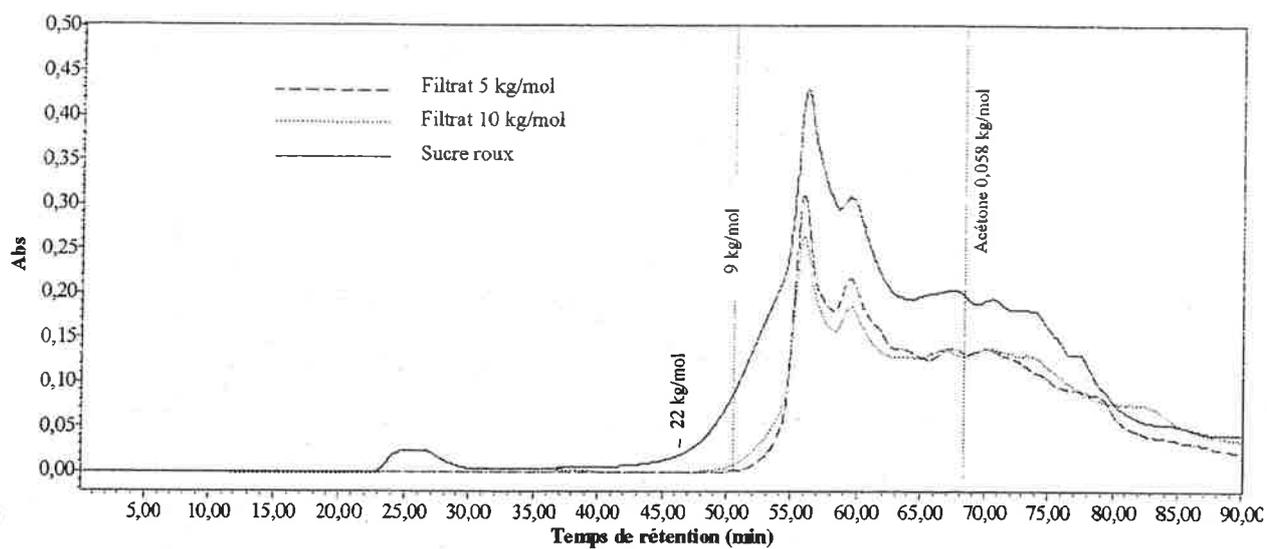
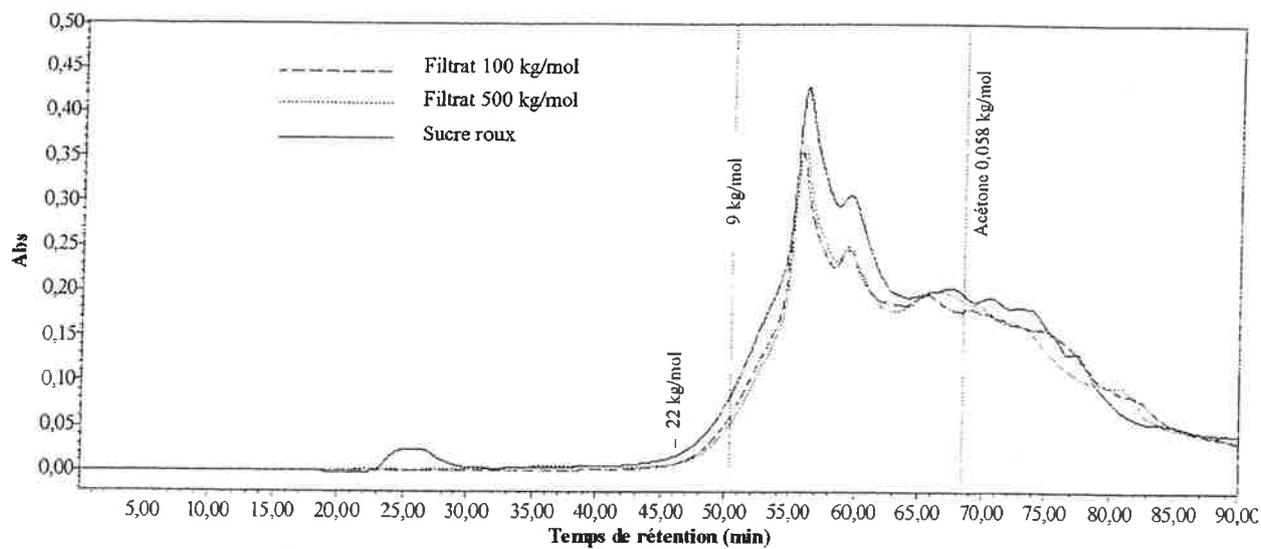


Figure IV.8 : Chromatogrammes (à 265 nm) du sucre roux et de ses produits de filtration avec des membranes de 500, 100, 10 et 5 kg/mol

Ces résultats sont surprenants puisque nous avons montré, par différentes méthodes qui se recoupent bien, que les composés adsorbés des caramels étaient de faibles masses molaires. De plus, vu la faible intensité de coloration des caramels formés, il est peu probable que ces composés soient de plus haute masse molaire que les mélanoidines et les PDAH beaucoup plus colorés. Il est donc possible que ces composés présentent également des interactions avec les membranes de filtration comme c'est le cas pour le gel superose 12. En effet, les membranes, constituées de polyéthersulfone, contiennent du soufre ce qui est également le cas du gel superose 12 (groupements sulfates). Si ces interactions ne sont pas perçues avec les membranes de 500 et 100 kg/mol, c'est peut-être parce que les porosités sont très élevées pour ces composés et que leur contact avec la membrane est moins important. Par contre, nous n'avons pas trouvé d'explication pour le cas de la rétention partielle des PDAH avec la membrane de 5 kg/mol, alors qu'il n'y a pas de rétention des mélanoidines.

2.2.2 FILTRATION DE LA REFONTE DE SUCRE ROUX

Les filtrats obtenus par filtration avec la cellule à agitation magnétique de la refonte de sucre roux (lot 15 provenant de la réunion) à 45 gMS/100 g ont également été analysés par C.E.S. Les chromatogrammes obtenus sont comparés à ceux du sucre roux, non filtré, analysé à même dilution et dans des conditions identiques.

2.2.2.1 Analyse des chromatogrammes

Comme pour l'analyse par C.E.S. du sucre roux, nous avons présenté les chromatogrammes superposés du sucre roux et de ses produits de filtration à 265 nm (longueur d'onde d'absorbance maximale des PDAH).

La **figure IV.8** montre que les composés du sucre roux de masses molaires supérieures ou

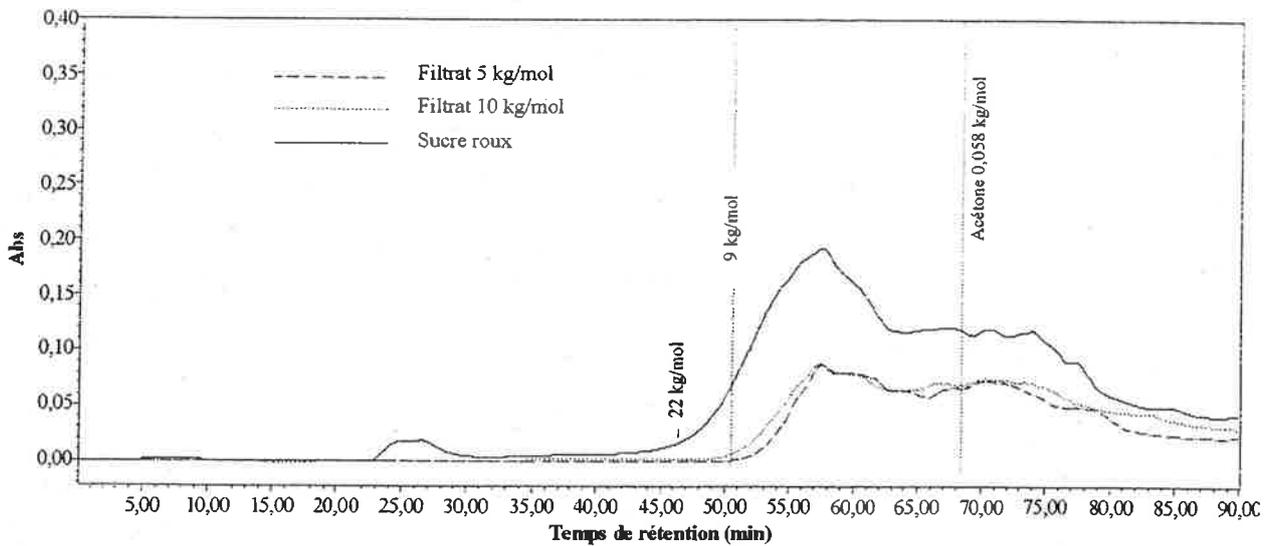
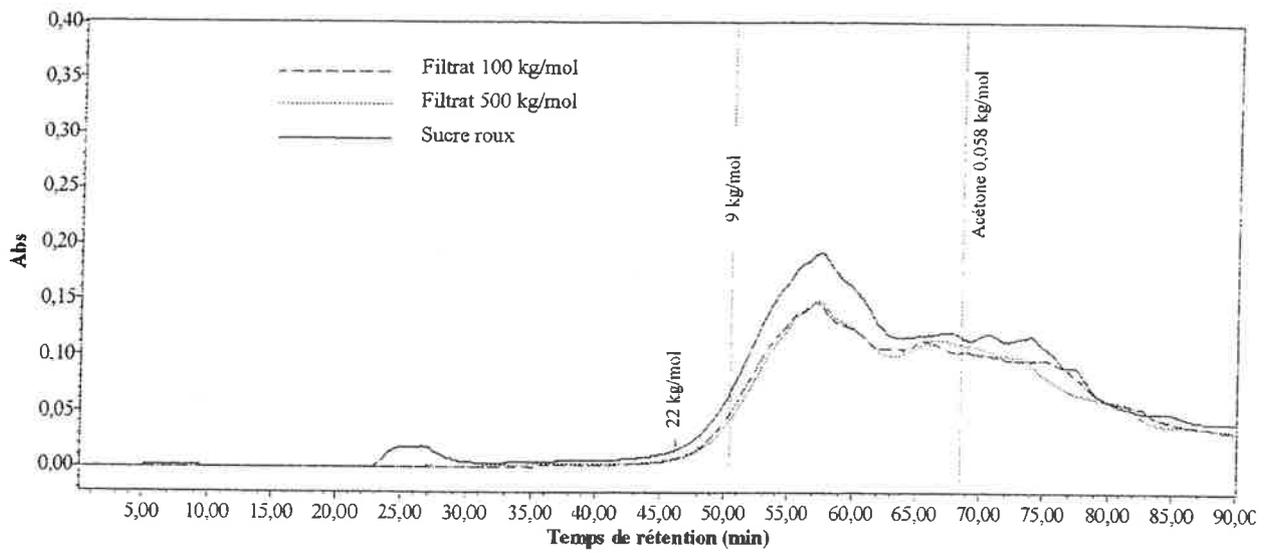


Figure IV.9 : Chromatogrammes (à 300 nm) du sucre roux et de ses produits de filtration avec des membranes de 500, 100, 10 et 5 kg/mol

égales à 300 kg/mol sont retenus à 100 % par toutes les membranes d'ultrafiltration testées. Malgré des masses molaires inférieures à 22 kg/mol (cf. chap III), on constate que des composés du sucre roux sont retenus par les membranes de 500 et 100 kg/mol. Ceci est lié soit à des interactions des composés du sucre roux avec les membranes, ou à une mauvaise estimation des seuils de coupure des membranes, qui seraient plus petits que ceux annoncés par les fournisseurs de membranes.

Le maximum d'absorbance des mélanoidines, colorants également suspectés présents dans le sucre roux, est à 300 nm. Nous avons donc visualisé les chromatogrammes du sucre roux et de ses filtrats à 300 nm. La comparaison à 420 nm n'a pas été possible car il nous aurait fallu traiter une refonte de sucre roux plus concentrée. Ceci aurait entraîné une augmentation trop importante de la viscosité (due à la présence de saccharose) pour l'analyse. Pour avoir une comparaison à 420 nm, il faudrait pouvoir éliminer le saccharose sans éliminer les colorants.

La **figures IV.9** représente les chromatogrammes du sucre roux et de ses filtrats à 300 nm. Ces chromatogrammes présentent les mêmes résultats que ceux obtenus 260 nm. En effet, les composés du sucre roux de masses molaires supérieures ou égales à 300 kg/mol sont retenus à 100 % par toutes les membranes d'ultrafiltration testées. Les composés du sucre roux de masses molaires inférieures à 22 kg/mol sont retenus par les membranes de 500 et 100 kg/mol.

Nous constatons par ces filtrations que, pour les deux longueurs d'onde étudiées (**figure IV.8** et **figures IV.9**), la rétention des composés avec les membranes de 500 et 100 kg/mol est quantitative. En effet, l'intensité d'absorbance des filtrats est plus faible que celle du sucre roux pour toutes les masses molaires entre 22 kg/mol et 0,058 kg/mol (acétone), et pas spécialement pour les masses molaires élevées. Cependant, avec les membranes de 10 et 5 kg/mol, on constate une rétention qualitative en plus de la rétention quantitative qui est toujours présente. On s'aperçoit qu'effectivement, les composés de masses molaires entre

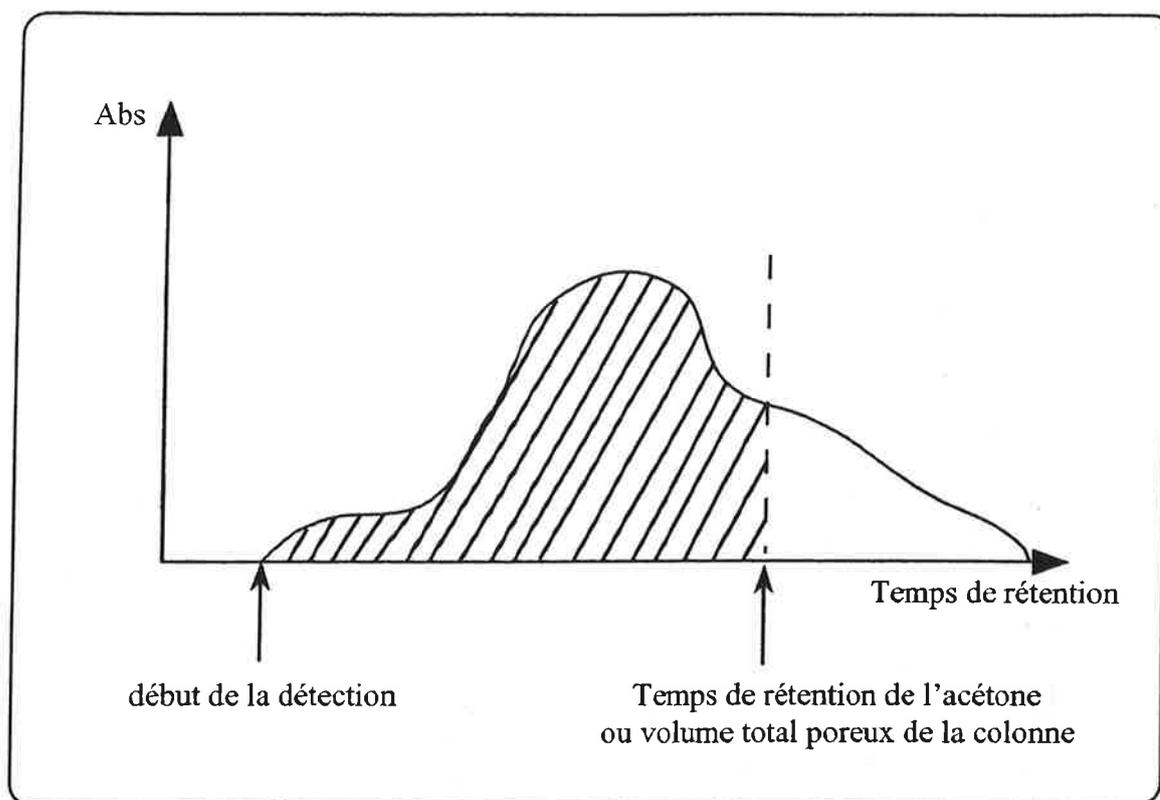


Figure IV.10 : Délimitation des surfaces pour évaluer le taux de rétention en C.E.S

Tableau IV.1 : Taux de rétention des composés du sucre roux par filtration avec la cellule à agitation magnétique

| Membranes | Taux de rétention (265 nm) | Taux de rétention (300 nm) |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 500 kg/mol | 17% | 20% |
| 100 kg/mol | 15% | 17% |
| 10 kg/mol | 48% | 61% |
| 5 kg/mol | 43% | 62% |

22 kg/mol et 9 kg/mol, sont absents des filtrats.

2.2.2.2 Proposition d'un mode d'évaluation de la sélectivité de la membrane

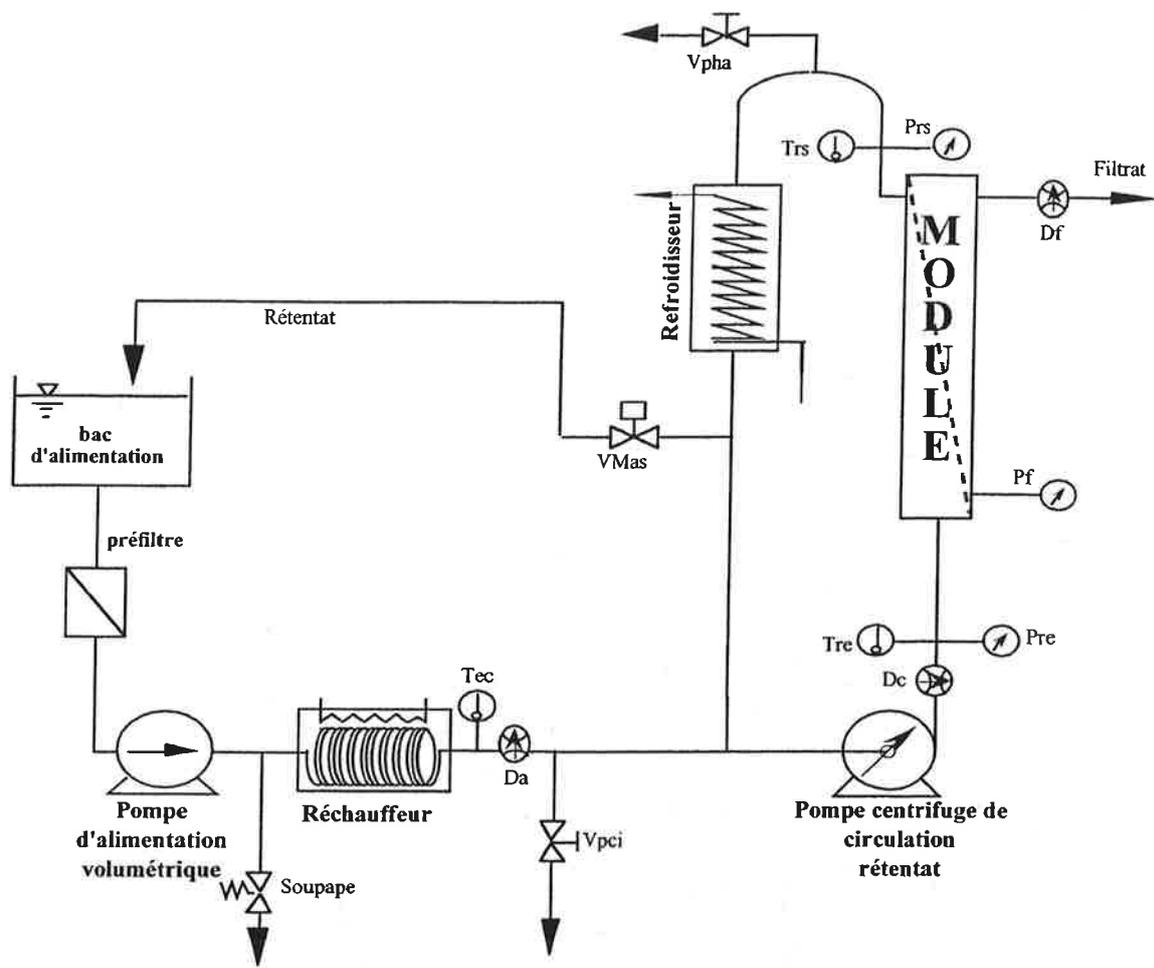
Nous avons pensé que le calcul d'un taux de rétention à 265 nm et à 300 nm apporterait des informations intéressantes. Le saccharose n'interfère pas dans ce calcul car il n'absorbe pas à ces longueurs d'onde (265 nm et 300 nm). Nous avons choisi le terme : **taux de rétention** des composés qui absorbent à 265 nm ou à 300 nm car des composés qui absorbent à ces longueurs d'onde peuvent être retenus, sans que ce soit forcément des colorants. Nous avons donc défini à 265 nm et à 300 nm, un **taux de rétention (Trét)** comme suit :

$$\text{Trét} = \left(1 - \frac{S_f}{S_i}\right) \cdot 100 \quad (\%) \quad (\text{IV.2})$$

- S_f : surface délimitée par la courbe du chromatogramme du filtrat, la ligne de base, le début de la détection des composés de ce filtrat et le temps de rétention de l'acétone
- S_i : surface délimitée par la courbe du chromatogramme du sucre roux, la ligne de base, le début de la détection des composés du sucre roux et le temps de rétention de l'acétone

Ce calcul n'est effectué que sur la plage de validité de la C.E.S. (**figure IV.10**).

Les résultats obtenus en taux de rétention des composés du sucre roux en filtration avec cellule à agitation magnétique sont regroupés dans le **tableau IV.1**. Quelle que soit la longueur d'onde considérée (265 nm ou 300 nm), aucune différence de taux de rétention n'est observée entre les membranes de 500 kg/mol et 100 kg/mol ni entre celles de 10 kg/mol et 5 kg/mol. Par contre, une différence de rétention notable est observée entre ces deux classes de seuils de coupure. C'est en dessous de 100 kg/mol qu'il commence à y avoir des rétentions significatives des composés du sucre roux, au niveau quantitatif et qualitatif (**figure IV.8 et 9**). Par ailleurs, on constate que pour les membranes de 10 kg/mol et 5 kg/mol, les taux de rétention à 300 nm sont nettement plus élevés qu'à 265 nm. Ceci indique que les composés qui absorbent à 300 nm sont mieux retenus par ces membranes que ceux qui



Da : débitmètre d'alimentation
Dc : débitmètre de circulation
Df : débitmètre de filtrat

VMas : vanne Masoneilan (électropneumatique à ouverture variable)
Vpci : vanne purge de circulation
Vpha : vanne purge haute

Pf : manomètre filtrat
Pre : manomètre rétentat entrée
Prs : manomètre rétentat sortie

Tec : température sortie d'échangeur
Tre : température rétentat entrée
Trs : température rétentat sortie

Figure IV.11 : Représentation schématique du pilote de filtration tangentielle ENSIA

absorbent à 265 nm. Ce résultat montre que le taux de rétention à une seule longueur d'onde pour un mélange de composés n'est pas représentatif de la rétention totale.

3. FILTRATION A L'ECHELLE DU PILOTE

Les filtrations à l'échelle du pilote ont été réalisées avec le pilote de filtration tangentielle de l'ENSIA.

3.1 REALISATION DES ESSAIS

3.1.1 DESCRIPTION DU PILOTE

Le pilote de filtration tangentielle de l'ENSIA (**figure IV.11**) permet la filtration avec des membranes de tailles variables (Punidadas 1990 ; Dornier 1994 ; Decloux 1996). Il est constitué de plusieurs éléments.

Le pilote possède deux pompes. La première sert à alimenter le pilote. C'est une pompe volumétrique Moineau (PCM 0.7/I12) dont le débit varie de 0 à 400 L/h. La deuxième est une pompe centrifuge Pierre Guérin (C218) à garniture double dont le débit peut varier entre 0 et 10 m³/h sous 4 bar. Elle impose une vitesse dans la boucle de filtration côté rétentat. Chaque pompe est couplée à un variateur de fréquence permettant d'agir en manuel ou en automatique.

Un premier échangeur (réchauffeur), sous forme de serpentin plongé dans un bac rempli d'eau, maintient la température par des résistances électriques de 9 kW. Un deuxième échangeur de chaleur (refroidisseur ou réchauffeur) à tubes concentriques permet d'affiner le maintien de la température de la solution dans la boucle de filtration.

Le pilote possède trois capteurs de pression relative qui donnent les pressions en entrée et en sortie du rétentat (Pre et Prs) ainsi que celle, en sortie du filtrat (Pf). A partir de ces pressions, on calcule la pression transmembranaires (Ptm) comme suit :

$$P_{tm} = \frac{P_{re} + P_{rs}}{2} - P_f \quad (IV.3)$$

Un débitmètre dans la boucle de circulation du rétentat permet d'avoir le débit de circulation (Dc) (m³/h). Un autre débitmètre est placé à la sortie du filtrat et permet d'avoir le débit (Df). Il permet de calculer la densité de perméation ou densité de flux de filtrat (Jf) :

$$J_f = \frac{D_f}{A} \quad (IV.4)$$

- Jf : densité de flux de filtrat (L.h⁻¹.m⁻²)
- Df : est le débit du filtrat (L/h)
- A : surface membranaire (m²)

Des capteurs de température sont placés afin de suivre la température au niveau du réchauffeur (Tec) et les températures en entrée et en sortie de module côté rétentat (Tre et Trs).

Le tout est supervisé par un microprocesseur (micromac 5000 Analog Device) et un ordinateur (DELL Pentium 100t) qui gèrent tous les signaux envoyés par les capteurs et les pompes. Un programme de supervision interagit avec le pilote et enregistre les données toutes les 10 secondes. Un tableau permet de voir à l'écran les paramètres nécessaires. L'utilisation du pilote en mode automatique est très pratique et permet une meilleure régulation des paramètres. Des consignes peuvent être imposées : soit des voltages aux pompes, soit des valeurs pour le débit de circulation, la densité de flux, les pressions et les températures, et c'est alors une régulation programmée qui s'effectue.

Tableau IV.2 : Types, seuils de coupure et surfaces filtrantes des membranes organiques spirales utilisées pour la filtration du sucre roux à l'échelle pilote

| Référence de la membrane | Seuil de coupure * | Surface filtrante (m²) |
|-----------------------------------|---------------------------|--|
| Desal JX 2540C-47D | 0,3 µm | 1,4 |
| Celgarde Alting (spaceurs larges) | 150 kg/mol | 1,4 |
| Celgarde P150F | 150 kg/mol | 1,6 |
| Celgarde PES 050H | 50 kg/mol | 1,6 |
| Celgarde WX PO20F-2440 | 20 kg/mol | 1,6 |

* Valeurs fournies par le fabricant

3.1.2 MEMBRANES ETUDIÉES

Les membranes utilisées sont des membranes organiques spiralées de chez Desal et Celgarde. Contrairement à la plupart des membranes de ce type, ces dernières sont annoncées résistantes à haute température (80°C) et aux pH acides et basiques. Elles ont été utilisées afin d'évaluer la possibilité de leur utilisation pour clarifier du sucre roux. Pour cela, il fallait tout d'abord étudier en recyclage total à l'échelle du pilote, la faisabilité en termes de clarification, de décoloration et de flux de filtrat. Pour juger si une installation de filtration est rentable, il faut raisonner sur une quantité de produit filtré pour un temps de production donné. Ce temps de production additionné au temps de nettoyage de la membrane représente le cycle de fonctionnement de l'installation. D'après nos partenaires industriels, sur la base de leur expérience en filtration du sucre roux avec des membranes minérales, un flux minimal de 25 à 40 L.h⁻¹m⁻² pendant 24 h doit être maintenu.

Les références des membranes utilisées ainsi que leurs seuils de coupure et leurs surfaces membranaires sont regroupés dans le **tableau IV.2**. Afin de trouver un compromis acceptable entre la rétention et la densité de flux de filtrat, nous avons testé des membranes et de seuils de coupure élevés (150 kg/mol et 0,3 µm) et de faibles seuils de coupure (20 et 50 kg/mol). Les deux membranes de 150 kg/mol diffèrent par la taille des « spaceurs » qui permettent de définir l'espace côté rétentat (espace qui existe entre deux spirales successives et qui représente la section de passage du côté du rétentat). La membrane 150 kg/mol Alting présente un espace côté rétentat plus important que la Celgarde 150 kg/mol, d'où une surface membranaire plus faible pour un même encombrement.

Du fait de leur nature organique, ces membranes nécessitent un conditionnement particulier. En effet, elles doivent toujours être conservées sous eau pour des arrêts de courte durée, et être conditionnées dans du bisulfite de sodium Na₂S₂O₅ à 5 g/L avec filtration (15 min en circulation totale) pour un arrêt au-delà d'une semaine.

3.1.3 CONDUITE DES ESSAIS

La réalisation d'un essai de filtration comprend toujours une étape de préparation de la solution à traiter, de conditionnement du pilote, l'essai de filtration et le nettoyage de la membrane.

- **Préparation du sucre roux** : Nous avons préparé 40 kg de refonte de sucre roux à 45 g MS pour 100 g de solution, avec de l'eau chaude du robinet pour une meilleure dissolution. La solution préparée a été ensuite tamisée avec des tamis de 170 μm et 80 μm respectivement, puis versée dans la cuve d'alimentation du pilote.
- **Conditionnement du pilote** : La phase de conditionnement comprend la mise sous tension de tout le circuit de contrôle-commande la veille de l'essai et le remplissage méthodique du pilote pour chasser tout l'air qui pourrait être piégé dans les circuits. Enfin, dans le circuit rétentat, l'eau est remplacée par la solution de sucre roux qui est chauffée jusqu'à la température de consigne (ici 80°C) par recyclage vers le bac.
- **Réalisation de l'essai proprement dit** : Pour tous les essais présentés ici, nous avons décidé :
 - d'être à recyclage total
 - de fixer le débit de circulation afin d'être à la perte de charge maximale autorisée dans la membrane (1 bar)
 - de fixer des paliers de pression transmembranaire en suivant l'évolution de la densité de flux de filtrat au cours du temps

Le compteur d'enregistrement est remis à zéro au démarrage de la filtration. Durant tout l'essai, les paramètres (températures, pressions et débits) sont transmis et enregistrés. Des échantillons de rétentat et de filtrat sont régulièrement (toutes les 30 min) prélevés pour analyse.

Tableau IV.3 : Conditions opératoires réalisées avec les différentes membranes organiques en filtration à l'échelle du pilote

| Membranes | Conditions opératoires testées | Durée de l'essai (recyclage total) |
|---|--|---|
| 0,3 μm | Perte de charge = 1 bar Ptm de 0,5 à 2,5 bar (par paliers de 0,5 bar/h) | 5 h |
| Alting 50 kg/mol « spaceurs larges » | Perte de charge = 1 bar Ptm de 0,5 à 2,5 bar (par paliers de 0,5 bar/h) | 5 h |
| 150 kg/mol | Perte de charge = 1 bar Ptm de 1 à 3 bar (par paliers de 0,5 bar/h) | 5 h |
| 50 kg/mol | Perte de charge = 1 bar Ptm de 1 à 3 bar (par paliers de 0,5 bar/h) puis 4 bar | 6 h |
| 20 kg/mol | Perte de charge = 1 bar Ptm de 1 à 3,5 bar (par paliers de 0,5 bar/h) | 6 h |

- **Arrêt de l'essai et exploitation des résultats** : L'essai terminé, l'enregistrement est arrêté. Les résultats sont analysés à l'aide du programme d'exploitation à partir des données enregistrées.
- **Nettoyage de la membrane** : Il est indispensable après chaque essai de nettoyer la membrane. Les phases de nettoyage ont été réalisées à pression transmembranaire constante (entre 0,3 et 0,5 bar) et à débit de circulation constant (entre 0,6 et 0,7 m³/h). La principale procédure de nettoyage réalisée est la suivante :
 - Phase I : Recyclage total d'une solution de soude (pH≈11,5) et d'Ultraclean II (Henkel France) (0,5 % v/v), pendant 30 min à 60°C.
 - Phase II : Recyclage total à 60°C d'une solution de soude (pH≈11,5) et de chlore (200 mg/L). Durant cette phase, 9 mL de la solution dans la cuve sont prélevés toutes les 10 min, . On y ajoute 5 gouttes d'acide phosphorique à 60 %, 5 gouttes d'iodure de potassium à 10 % et 5 gouttes de solution d'amidon à 10 % pour déterminer la concentration en chlore actif par un titrage avec une solution de thiosulfate de sodium à N/20. Une goutte correspond à 10 mg/L de chlore actif. En fonction du résultat, la quantité d'eau de Javel est ajoutée pour garder une concentration de 200 ppm. Cette phase est terminée lorsque la consommation en chlore est stabilisée.
- **Conditions opératoires** : Nous avons regroupé dans le **tableau IV.3**, les conditions opératoires (pression transmembranaire et perte de charge) appliquées avec chacune des membranes testées.

3.1.4 CRITERES D'EVALUATION

Nous avons mesuré, sur les échantillons prélevés, la turbidité par néphélométrie. Cette mesure est réalisée à l'aide d'un turbidimètre (Hach 2100AN), polyvalent et équipé de filtres de différentes longueurs d'onde. La méthode de mesure repose sur l'effet Tyndall selon lequel un liquide trouble traversé par un faisceau lumineux s'éclaire vivement du fait de la diffusion latérale de la lumière par les particules en suspension (Hach 1993). Elle consiste donc, grâce à

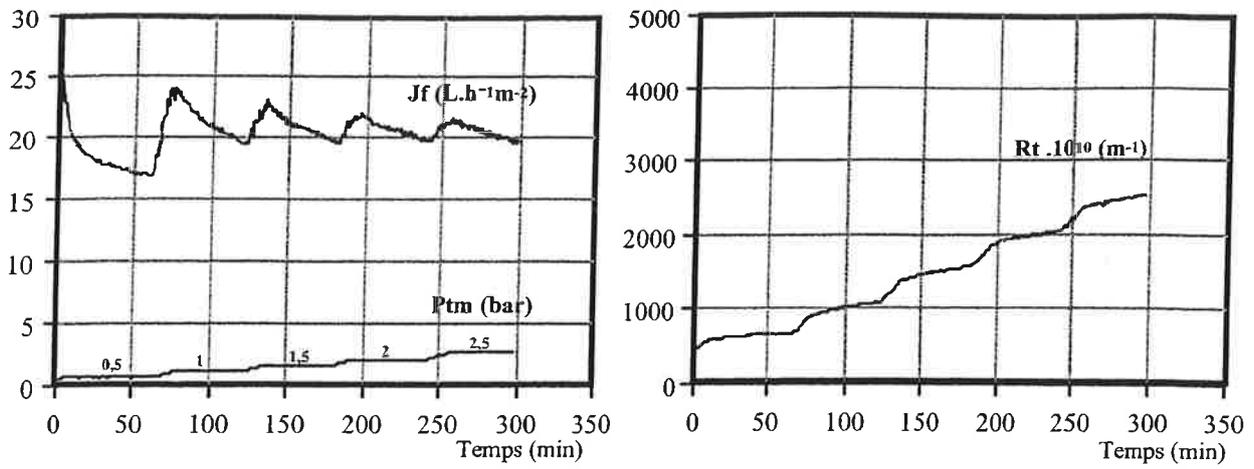


Figure IV.12 : Evolution du flux, de la Ptm et de la résistance totale au cours du temps en filtration de la refonte du sucre roux avec la membrane de 0,3 μ m

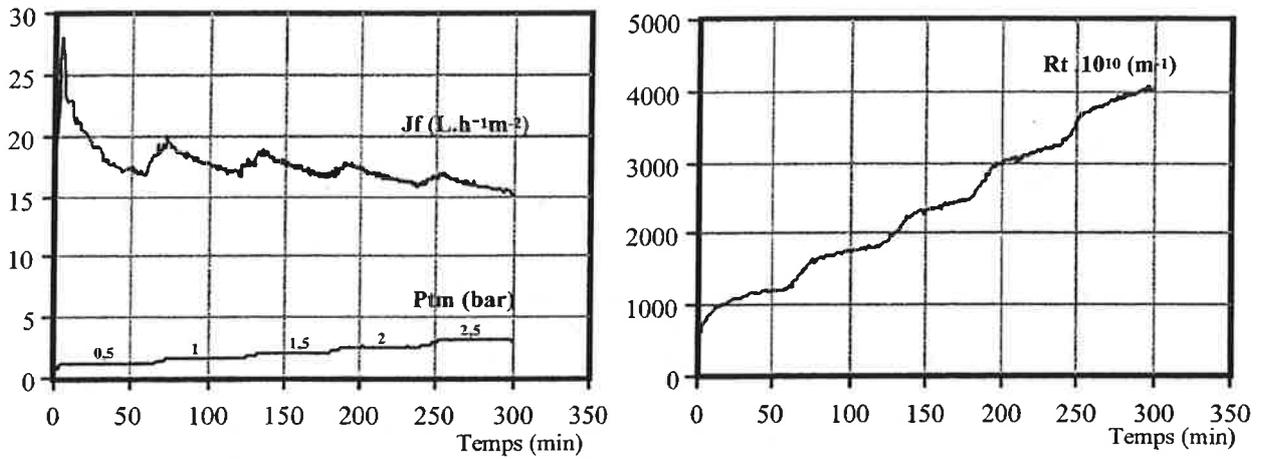


Figure IV.13 : Evolution du flux, de la Ptm et de la résistance totale au cours du temps en filtration de la refonte du sucre roux avec la membrane de 150 kg/mol (spacers larges)

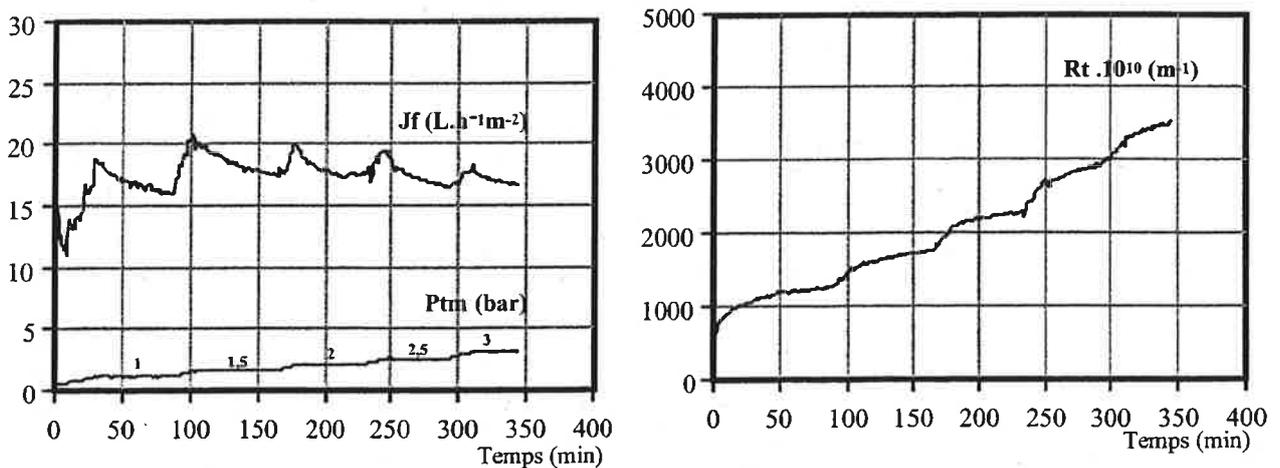


Figure IV.14 : Evolution du flux, de la Ptm et de la résistance totale au cours du temps avec la membrane de 150 kg/mol

un ensemble de miroirs détecteurs de lumière, à mesurer la quantité de lumière dispersée et transmise. En mode ratio, la turbidité exprimée en UNT (Unité Néphélométrique de Turbidité) correspond au rapport de la lumière dispersée sur la lumière transmise. De la mesure de turbidité, nous avons déduit le **taux de clarification (Tcla)** :

$$Tcla = \left(1 - \frac{TUf}{TUi}\right) \cdot 100 \quad (\%) \quad (IV.5)$$

- TUf qui correspond à la turbidité du filtrat (UNT)
- TUi qui correspond à la turbidité de la solution initiale (UNT).

Nous avons également mesuré la coloration globale selon la méthode ICUMSA (cf. : § 2.2.1 chapitre I), ce qui nous a permis de déduire le **taux de décoloration (Tdécol)** des membranes. Ce taux est calculé comme suit :

$$Tdécol = \left(1 - \frac{COLf}{COLi}\right) \cdot 100 \quad (\%) \quad (IV.6)$$

- COLf : coloration du filtrat
- COLi : coloration de la solution initiale

3.2 RESULTATS

3.2.1 EVOLUTION DES DENSITES DE FLUX DE FILTRAT

Nous avons présenté dans les **figures IV.12, 13, 14, 15 et 16** l'évolution des densités de flux de filtrat, des pressions transmembranaires et des résistances hydrauliques totales au cours du temps pour les essais avec les membranes de 0,3 μm , Alting 150 kg/mol (spacers larges), 150 kg/mol, 50kg/mol et 20 kg/mol respectivement. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Avec la membrane de 0,3 μm (**figure IV.12**) et les deux membranes de 150 kg/mol (**figure IV.13 et 14**), l'augmentation de la pression transmembranaire n'apporte pas de gain en flux. En effet, en prenant pour exemple la membrane de 0,3 μm (**figure IV.12**), le flux atteint à 1 bar de P_{tm} est de 24 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ alors qu'il n'est que de 22 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ par passage

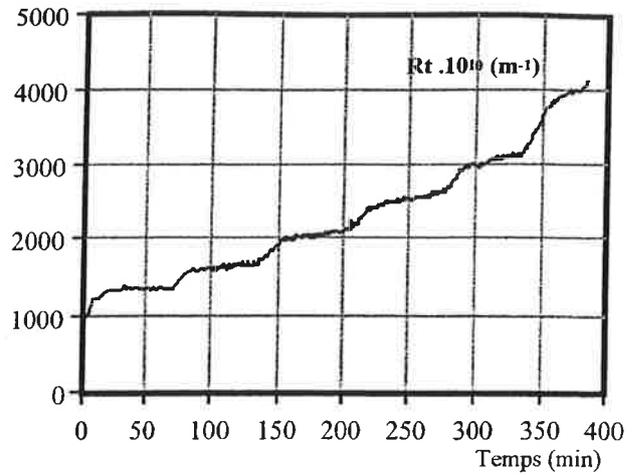
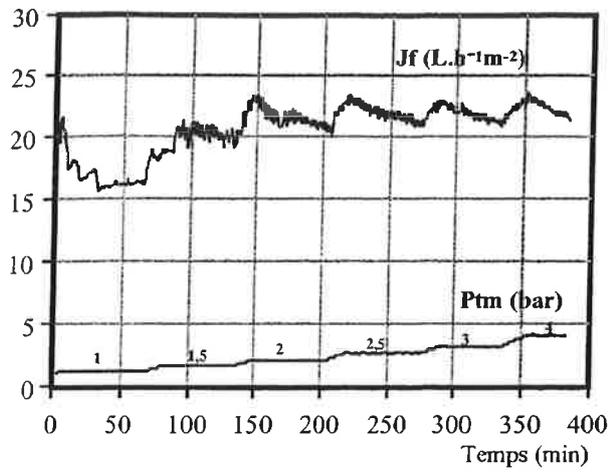


Figure IV.15 : Evolution du flux, de la P_{tm} et de la résistance totale au cours du temps avec la membrane de 50 kg/mol

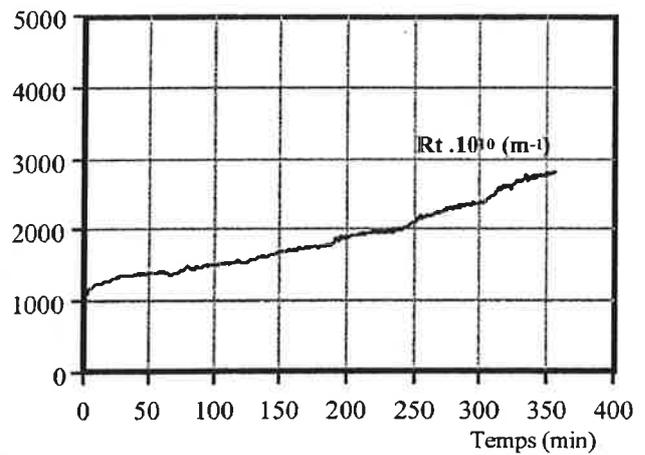
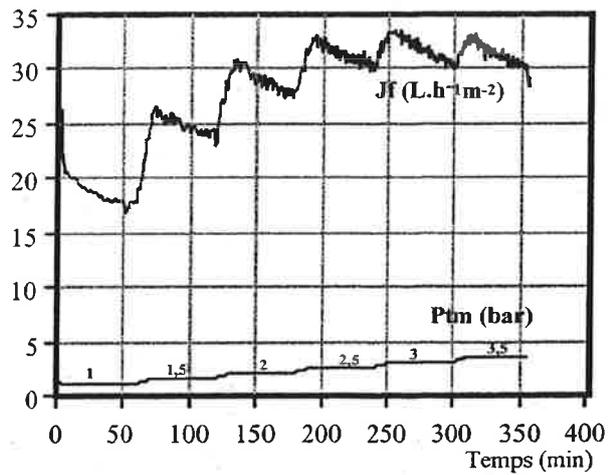


Figure IV.16 : Evolution du flux, de la P_{tm} et de la résistance totale au cours du temps avec la membrane de 20 kg/mol

- à 1,5 bar. La chute du flux est plus importante durant le palier de P_{tm} que son augmentation lorsque celle-ci passe d'un palier à un autre. Ceci est dû à un colmatage rapide et important qui se traduit par une forte augmentation de la résistance hydraulique totale. Par conséquent, une augmentation linéaire de la P_{tm} au cours d'un essai ne permettrait même pas de maintenir un flux de $15 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ sur 24 h.
- Avec la membrane de 50 kg/mol (**figure IV.15**), une augmentation de la P_{tm} a permis de maintenir un flux de $20 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$, mais nous avons atteint pour cela 4 bar de P_{tm} en à peine 5 h d'essai. Sachant qu'en ultrafiltration, la P_{tm} ne dépasse généralement pas des valeurs supérieures à 6 bar, il est clair que ce flux ne peut être maintenu 24 h. De plus, la pente de chute du flux s'accroît de palier en palier. D'ailleurs en fin d'essai, on obtient une pente importante d'augmentation de la résistance hydraulique totale. Même si cette membrane se colmate moins que les précédentes, elle ne permettra pas de réaliser les objectifs de maintenir un flux de 25 à $40 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ pendant 24 h
 - Avec la membrane de 20 kg/mol (**figure IV.16**), une augmentation de la P_{tm} en début d'essai a permis de gagner légèrement en flux (entre 1,5 et 2 bar, de même qu'entre 2 et 2,5 bar). A partir de là, une augmentation de la P_{tm} ne permet plus d'augmenter le flux mais seulement de le maintenir vers les $30 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$. Comme pour le cas de la membrane de 50 kg/mol , il est évident qu'un colmatage important se met en place. Cette membrane, comme les précédentes, ne permettra donc pas de réaliser les objectifs qui sont de maintenir un flux de 25 à $40 \text{ L.h}^{-1}\text{m}^{-2}$ pendant 24 h.

En conclusion, il apparaît que ces membranes ne sont pas économiquement rentable pour la filtration du sucre roux à une échelle industrielle. Il apparaît d'après ces résultats qu'en filtration d'une refonte de sucre roux, la membrane de 20 kg/mol se colmate moins qu'une membrane de 50 kg/mol qui à son tour se colmate moins que des membranes de 150 kg/mol ou de $0,3 \mu\text{m}$. Ceci est probablement dû au fait que les membranes plus larges ($0,3 \mu\text{m}$, 150 kg/mol et 50 kg/mol) laissent certaines molécules pénétrer dans les pores et les colmater. Pour la membrane de 20 kg/mol , il semble plutôt y avoir un colmatage superficiel.

Tableau IV.4 : Taux de décoloration et de clarification obtenus par filtration tangentielle d'une refonte de sucre roux (45 g de matière sèche pour 100 g de solution ; 80°C) avec les membranes spiralées organiques

| Membranes | Tcla (%) | Tdécol (%) |
|-------------------|----------|---|
| 0,3 μm | 99 | 20 % en début d'essai 48 % en fin d'essai moyenne = 34% |
| Alting 150 kg/mol | 99 | 17 |
| 150 kg/mol | 99 | 12 |
| 50 kg/mol | 99 | 29 |
| 20 kg/mol | 99 | 57 |

3.2.2 TAUX DE CLARIFICATION ET DE DECOLORATION

Dans le **tableau IV.4**, nous avons regroupé les taux moyens de clarification et de décoloration. Ces derniers ont été obtenus par calcul de la moyenne des taux de clarification et de décoloration des différents échantillons prélevés.

La première constatation que l'on peut faire est que les membranes organiques spiralées que nous avons utilisées éliminent bien le trouble, puisqu'elles clarifient le sucre roux à 99 %. Ce résultat est cohérent car le trouble est censé être constitué de particules, or celles-ci sont très bien éliminées par ultrafiltration.

Les taux de décoloration moyens observés augmentent avec la diminution des seuils de coupure (12 à 17 % pour les membranes de 150 kg/mol, 29 % pour la membrane de 50 kg/mol et 57% pour la membrane de 20 kg/mol) ce qui confirme que, plus la membrane est serrée, mieux elle décolore. On observe cependant que le taux de décoloration de la membrane de 0,3 μm est élevé par rapport à sa porosité, en particulier en fin d'essai. Ceci confirme que cette membrane présente un colmatage interne qui fait lui-même office de filtre. Cette rétention n'est pas forcément bénéfique puisqu'elle se traduit par une baisse considérable de la densité de flux de filtrat due au colmatage.

3.2.3 ANALYSE DES ECHANTILLONS PAR C.E.S.

Nous avons également analysé par C.E.S les produits de filtration à l'échelle du pilote. L'allure des chromatogrammes du sucre roux à 265 nm et à 300 nm sont semblables à ceux obtenus pour les filtrations sur cellule à agitation magnétique. Nous n'avons donc pas présenté ici ces chromatogrammes mais avons préféré évaluer un **taux de rétention** qui illustre mieux la différence de sélectivité entre les membranes. Ce taux de rétention est calculé par

Tableau IV.5 : Taux de rétention des composés du sucre roux par filtration sur membranes à l'échelle pilote

| Membranes | Taux de rétention (265 nm) | Taux de rétention (300 nm) | Taux de décoloration (420 nm ICUMSA) |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| 0,3µm | 30% | 38% | 20-48 % |
| 150 kg/mol Alting (spacers larges) | 20% | 29% | 17 % |
| 150 kg/mol | 29% | 33% | 12 % |
| 50 kg/mol | 25% | 32% | 29 % |
| 20 kg/mol | 34% | 49% | 57 % |

l'équation IV.2, en prenant l'échantillon de filtrat en fin d'essai et l'échantillon de rétentat initial.

Les résultats des taux de rétention obtenus à 265 nm et à 300 nm avec les différentes membranes testées sont regroupés dans le **tableau IV.5**. On constate qu'il n'y a pas de différence notable, quelle que soit la membrane, entre les taux de rétention à 300 nm et à 265 nm, contrairement à ce que nous avons précédemment observé avec les membranes de 5 et 10 kg/mol (cellule à agitation magnétique).

Si on compare les taux de rétention évalués par C.E.S., avec les taux de décoloration évalués par la méthode ICUMSA, on constate que dans les deux cas, c'est la membrane de 20 kg/mol, donc la plus serrée, qui retient le mieux les impuretés et colorants du sucre roux. Elle est suivie de près par la membrane de 0,3 μm (en fin d'essai) malgré sa porosité élevée, pour des raisons déjà évoquées plus haut.

4. CONCLUSION

Ces résultats mettent en évidence quelques informations intéressantes. D'après les filtrations des colorants avec une cellule à agitation magnétique, il apparaît que ce n'est pas parce qu'un composé a une masse molaire supérieure au seuil de coupure d'une membrane qu'il est forcément retenu par celle-ci. D'un autre côté, un composé plus petit que le seuil de coupure d'une membrane peut être retenu par celle-ci. Ces résultats qui confirment ceux de Vercellotti *et al.*, (1998), ne sont pas uniquement dus à des interactions entre composés de faibles masses molaires et macromolécule. En effet, des interactions avec la membrane peuvent entrer en jeu ainsi qu'une évaluation non précise des porosités des membranes. Il est donc déconseillé, à notre avis, d'évaluer des masses molaires des composés par rapport à leur rétention avec des membranes de seuil de coupure connu.

Nous avons également montré, par une évaluation de la rétention à différentes longueurs d'ondes de l'UV, que le taux de rétention à une seule longueur d'onde pour un mélange de composés n'est pas représentatif de la rétention totale.

D'après nos résultats, pour avoir un bon taux de rétention des impuretés du sucre roux par filtration tangentielle, il faut utiliser des membranes de faibles seuils de coupure entre 10 kg/mol et 50 kg/mol. En effet, une membrane plus large de microfiltration (0,3 μm par exemple) se colmaterait vite par un colmatage interne des pores. Une membrane plus serrée (5 kg/mol par exemple) n'apporte pas une meilleure rétention qu'une membrane de 10 kg/mol.

Ces résultats confirment ceux de Kishihara *et al.*, (1981). En effet, ces derniers indiquent que les seuils de coupure les plus intéressants, en ultrafiltration du jus de canne avec des membranes organiques, se situent entre 10 et 30 kg/mol.

Les membranes que nous avons utilisées à l'échelle du pilote ne sont pas économiquement rentables puisque les flux obtenus ne sont pas assez élevés. La membrane de 20 kg/mol présente cependant de meilleurs résultats que les quatre autres tant au niveau sélectivité qu'au niveau performance.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En sucrerie, un des principaux critères de qualité est la qualité des cristaux de sucre et en particulier sa coloration. Les procédés de sucrerie visent donc à limiter la formation des colorants et réduire leur inclusion dans les cristaux. Depuis de nombreuses années, des études sont menées à l'ENSIA sur l'intérêt de la filtration tangentielle en sucrerie en vue notamment de séparer les colorants. Les résultats ne sont toutefois pas à la hauteur des attentes aussi bien en terme qualitatif (taux de décoloration) qu'en terme quantitatif (flux de perméation). Notre travail s'inscrit dans ce contexte et vise à mieux comprendre la nature des colorants, leur formation et leurs caractéristiques.

La synthèse bibliographique que nous avons menée au début de ce travail a permis de mettre en évidence que les colorants de fabrication sont plus à craindre que les colorants naturels. En effet, les colorants de fabrication proviennent essentiellement de la dégradation du saccharose. Ce dernier étant présent dans toutes les étapes de sucrerie, il suffit que les conditions soient favorables pour qu'il se dégrade et que des colorants de fabrication se forment et se multiplient. Ils se retrouvent ensuite dans les sirops et gênent la cristallisation. Il n'est pas aisé de distinguer les différents colorants de fabrication car ils ont souvent entre eux les mêmes précurseurs, ce qui implique qu'ils peuvent se former simultanément. Les produits formés sont nombreux, pas assez connus et dépendent beaucoup des précurseurs également nombreux. Nous avons ainsi montré que la formation des caramels n'est probable qu'en évaporation, alors que la formation des mélanoidines et des PDAH a lieu durant pratiquement toutes les étapes de la sucrerie avec une plus grande intensité en épuration calco-carbonique.

Nous avons donc choisi de reconstituer les colorants de fabrication les plus gênants (mélanoidines, caramels et PDAH) afin de suivre tout d'abord leur formation. Nous avons choisi de mettre en œuvre un réacteur à pression atmosphérique avec reflux total d'une capacité de 1 litre. Pour tous les colorants nous avons maintenu un temps de réaction

de 3 heures. Les analyses spectrométriques réalisées sur les colorants ont montré la très bonne reproductibilité de leur fabrication. Nous avons ainsi pu montrer que la formation des caramels est nettement moins probable que celle des mélanoidines et des PDAH où la coloration apparaît en moins de 15 minutes.

Les spectres visible des colorants de fabrication ont des allures quasiment identiques alors que ceux de l'UV s'entrecroisent et les allures diffèrent d'un colorant à un autre. L'idée d'exploiter les spectres UV pour différencier ces colorants paraît donc intéressante. La méthode ACP que nous avons proposée présente les mêmes avantages que celle de Bento (1995) mais permet en plus une meilleure distinction entre les colorants car elle tient compte des absorbances à toutes les longueurs d'onde de manière équivalente. Nous avons pu constater par la méthode ACP que la composition du sucre roux est très proche de celle des PDAH et nous avons confirmé ce résultat par une méthode statistique différente mais complémentaire qui est la méthode de Ward de classification hiérarchique. L'ensemble de ces résultats ainsi que l'analyse bibliographique nous permettent de considérer que les PDAH ont le plus de chance de se former en sucrerie. Les mélanoidines les suivent de près à condition qu'il y ait assez d'acides aminés et de composés azotés. Quant à la formation des caramels, elle n'est pas impossible, mais reste peu probable.

La mise au point de la chromatographie d'exclusion stérique (C.E.S.) s'est avérée plus compliquée que prévu. En effet, après avoir choisi et monté l'ensemble des éléments de l'analyse (gel superose 12, éluant Tris + NaCl 0,02 M, débit de 0,3 mL/min, 200 µL de volume d'injection, détecteurs spectrométrique à barrettes de diodes et réfractomètre différentiel, temps de détection de 75 min, volume mort évalué par du blue dextran et volume total poreux par l'acétone, étalonnage avec des dextrans), nous avons été confrontés à des phénomènes d'interactions entre le gel et les colorants de fabrication. Ces interactions ne seraient apparemment ni spécifiquement ioniques ni spécifiquement hydrophobes. Elles seraient dues à des interactions d'affinités spécifiques entre les composés des colorants et des

groupements, probablement des sulfates, contenus dans le gel superose 12. En utilisant le tétraméthylammonium chlorure à 0,1 M comme phase éluante, nous avons réussi à annuler les interactions entre les colorants et le gel, sauf pour le cas des caramels. En récoltant le pic de caramels présentant des interactions et en l'analysant par spectrométrie de masse et chromatographie liquide de haute performance, nous avons montré que ces caramels sont des composés de faibles masses molaires proches de la structure des diholosides. Au cours des analyses par spectrométrie de masse des caramels, nous avons été surpris de ne pas retrouver le spectre de masse de l'hydroxyméthyl-furfural pourtant produit majeur dans les produits de caramélisation. *Il serait donc intéressant d'essayer de comprendre par la suite de quoi sont constitués les caramels préparés selon notre méthode. Pour cela, il faudrait probablement faire des prélèvements d'échantillons de caramels en cours de réaction à intervalles réguliers puis de faire des analyses de spectrométrie de masse pour essayer de détecter l'hydroxyméthyl-furfural. Nous pensons en fait par rapport aux étapes de formation des caramels, que l'hydroxyméthyl-furfural n'est peut être pas stable et qu'il se polymérise ou se dissocie en acides. Par des prélèvements réguliers, il serait possible de vérifier cette hypothèse. Cependant, il faudrait auparavant être sûr de l'utilité de cette étude en démontrant que des composés des caramels se retrouvent en effet dans le cristal de saccharose.*

Les composés adsorbés sur le gel superose 12 ayant été identifiés comme de petites molécules et l'inexistence de phénomènes d'interactions dans la gamme de fractionnement du gel ayant été vérifié, nous avons décidé de nous affranchir de ce problème et de mesurer les masses molaires des différents colorants en utilisant le nouvel éluant.

Les caramels que nous avons préparés sont des composés de faibles masses molaires (inférieurs à 0,4 kg/mol) nettement plus faibles que ceux annoncés dans la littérature. Les mélanoidines et les PDAH ont des masses molaires plus élevées et très proches (0,08 à 17 kg/mol et 0,09 à 22 kg/mol respectivement). Contrairement aux caramels qui sont bien séparés des autres, les mélanoidines et les PDAH ne sont pas bien séparés par C.E.S..

Même si par extraction et comparaison des spectres, on arrive à deviner la présence de certains colorants, il est impossible de les identifier clairement dans un mélange. Contrairement aux caramels et aux PDAH, nous avons constaté que les spectres des mélanoidines, donc leur composition, varie d'une masse molaire à une autre. Nous avons également mis en évidence, par comparaison des spectres, la présence possible de composés communs entre les mélanoidines et les caramels.

Le sucre roux (lot 15) que nous avons analysé contient des composés de très hautes masses molaires (≥ 300 kg/mol), probablement des complexes formés par des colorants et des macromolécules comme les polysaccharides. Ce sucre contient également des composés qui coïncident très bien avec la gamme de masses molaires des colorants de fabrication. Entre les grosses masses molaires (300 kg/mol) et les masses molaires des colorants, rien n'est détecté. *Puisque les composés du sucre roux coïncident très bien avec la gamme de masses molaires des mélanoidines et des PDAH que nous avons préparés, il serait intéressant d'évaluer la répartition des masses molaires de ces colorants entre le cristal et l'eau mère. Pour cela, il suffit de cristalliser du saccharose pur mélangé aux colorants individuellement. Une analyse par C.E.S. permettra alors de savoir si ces colorants se retrouvent dans les cristaux. Elle permettra aussi de savoir si ce sont plutôt les faibles masses molaires ou les grosses masses molaires qui sont concernées. Il est également possible par la suite de déterminer l'influence de certaines macromolécules telles que les polysaccharides sur l'occlusion des mélanoidines et des PDAH dans les cristaux de saccharose.*

Plusieurs spectres du sucre roux ont été extraits à différentes masses molaires. Même si ces spectres se rapprochent plus de ceux des mélanoidines que de ceux des caramels et des PDAH, il est difficile, vu la complexité du sucre roux, de les exploiter tel quel, pour identifier les colorants. *Une analyse par ACP des spectres, aux différentes masses molaires des colorants et du sucre roux, serait peut-être plus intéressante pour savoir lesquels de ces composés sont similaires. Elle pourrait éventuellement aider à mieux exploiter les spectres du*

sucre roux qui sont peu explicites. Enfin, elle pourrait éventuellement confirmer la présence soupçonnée de composés communs entre les caramels et les mélanoidines.

En analysant simultanément les détections par les barrettes de diodes et le réfractomètre différentiel, nous avons trouvé que, pour les caramels, ce sont plutôt les composés de plus hautes masses molaires qui prédominent. En revanche, pour les mélanoidines et les PDAH, ce sont les composés de plus faibles masses molaires qui prédominent. Certains composés ayant une forte absorbance dans l'UV n'étaient pas détectables au réfractomètre. *Nous en avons déduit que pour faire une bonne analyse quantitative, il faut s'équiper d'un détecteur plus sensible, comme le détecteur ELS (Evaporative Light Scattering) décrit au chapitre I.*

D'après les filtrations des colorants avec une cellule à agitation magnétique, nous avons également montré, par une évaluation de la rétention à différentes longueurs d'ondes de l'UV, que le taux de rétention, évalué à une seule longueur d'onde, pour un mélange de composés n'est pas représentatif de la rétention totale. Il apparaît aussi que ce n'est pas parce qu'un composé a une masse molaire supérieure au seuil de coupure d'une membrane qu'il est forcément retenu par celle-ci. D'un autre côté, un composé plus petit que le seuil de coupure d'une membrane peut être retenu par celle-ci. En effet, nous avons constaté une rétention des caramels sur des membranes de 5 kg/mol et 10 kg/mol, alors que des analyses de spectrométrie de masse et de chromatographie d'exclusion stérique avaient montré qu'ils avaient de faibles masses molaires. Nous avons alors pensé à des interactions entre la membrane (polyéthersulfone) et les caramels. *Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de filtrer ces mêmes caramels avec des membranes de même seuil de coupure mais de natures chimiques différentes.*

D'après nos résultats, pour avoir un bon taux de rétention des impuretés du sucre roux par filtration tangentielle, il faudrait utiliser des membranes de faibles seuils de coupure entre 10 kg/mol et 50 kg/mol. En effet, une membrane plus large de microfiltration (0,3 µm par

exemple) colmaterait vite par un colmatage interne des pores. Une membrane plus serrée (5 kg/mol par exemple) n'apporte pas une meilleure rétention qu'une membrane de 10 kg/mol. Ces résultats confirment ceux de Kishihara *et al.*, (1981). En effet, ces derniers indiquent que les seuils de coupure les plus intéressants, en ultrafiltration du jus de canne avec des membranes organiques, se situent entre 10 et 30 kg/mol.

Les membranes que nous avons utilisées à l'échelle du pilote ne sont pas économiquement rentables puisque les flux obtenus ne sont pas assez élevés. La membrane de 20 kg/mol présente cependant de meilleurs résultats que les autres tant au niveau sélectivité qu'au niveau performances. Il est donc important de s'intéresser à ce seuil de coupure pour des améliorations futures des membranes.

Enfin, il serait intéressant de pouvoir coupler l'ensemble de ce travail avec la prise en compte des polysaccharides qui interviennent également dans les étapes de cristallisation et de filtration tangentielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adrian J.** (1993). Le rôle des facteurs technologiques sur les réactions de brunissement non enzymatique. *Ind. Alim. Agric.*, 24, 308-312.
- Adrian J.** (1997). L'introduction du sucre de betterave en France. *Ind. Alim. Agric.*, 114, 446-453.
- Ahari D., Genotelle J.** (1961). La coloration en sucrerie : perfectionnements apportés à sa mesure. *Ind. Alim. Agric.*, 742-747.
- Arnaud P.** (1979). Cours de chimie organique. 506 p, Paris.
- Bento L.S.M.** (1992). Organic and Inorganic compounds influence on the sugar colorant - ion-exchange resin inter-action. *Sugar Industry technologists, Inc*, 201-220.
- Bento L.S.M.** (1995). Application of UV spectrophotometry to study sugar colourants throughout the refining process. *Sugar industry technologists*, (paper n°683),
- Bento L.S.M.** (1996). Regeneration of decolourization ion-exchange resins - a new approach. *Internet*, 690,
- Bento L.S.M., Sa S.** (1998). Study of HMW compounds in sugar liquors from carbonatation and ion-exchange resins using GPC chromatography with an evaporative light scattering detector. *Sugar Proc. Res.Conf.*, 233-247.
- Botter R., Bouchoux G.** (1995). Spectrométrie de masse. P2615. *Techniques de l'ingénieur : Analyse et caractérisation*, 1-39.
- Bouroche A., Le Bars M.** (1994). *Techniques de séparation par membranes*. 3-62 p, Paris.
- Bouroche J.M., Saporta G.** (1992). *L'analyse des données*. 127 p, Presse universitaire de France, France.
- Broughton N.W., Dalton C.C., C J.G., Williams E.L.** (1995). Adding value to beet pulp. *Int. Sugar J.*, 97, 57-60 et 94-95.
- Catherine M.** (1999). Qualités de la matière première et technologies pour élaborer des boissons à base de canne à sucre. Thèse Université de Technologie de Compiègne, France.

- Caude M., Jardy A.** (1994). Chromatographie en phase liquide. Théories et méthodes de séparation. P1455. Techniques de l'ingénieur : Analyse et caractérisation, 2-44.
- Caude M., Jardy A.** (1995). Chromatographie en phase liquide. Appareillage et applications. P1456. Techniques de l'ingénieur : Analyses et caractérisation., 1-15.
- Cedus** (1998). Techniques de l'industrie sucrière. Documentation pédagogique.
- Cheftel J.C., Cheftel H.** (1980). Brunissement enzymatique et brunissement non enzymatique. In: Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, 333-363, Lavoisier Techniques et Documentation-Ingénieurs Praticiens, Paris.
- Chen J.C.P.** (1985). Cane Sugar Handbook 11th edition. 1134 p, Wiley-Interscience, New York.
- Chen J.C.P., Chou C.C.** (1993). Cane sugar handbook. 1090 p, John WILEY & Sons, New York.
- Chenou C.** (1993). Cinétique et modélisation de l'adsorption de la serum albumine bovine en chromatographie d'échange d'ion. Thèse Institut polytechnique de Lorraine, France.
- Chichester C.O.** (1972). The chemistry of plant pigments. 218 p, Academic press, New York-London.
- Cloizeaux J., Jannink G.** (1987). Les polymères en solution : leur modélisation et leur structure. 845 p, Les éditions de physique, France.
- Cookson D., Parker K.J., Williams J.C.** (1971). Properties of sugar colorants removable by ion-exchange resins. 103-113.
- Cosmeur A.** (1999) Contribution à l'étude de la cristallisation du saccharose en présence d'impuretés issues de sirop industriel stocké, en vue d'optimiser la qualité des cristaux. Rapport d'ingénieur C.N.A.M., Reims, France.
- Cottier L., Descotes G., Neyret C., Nigay H.** (1989). Pyrolyse de sucres. Analyse des vapeurs de caramels industriels. Ind. Alim. Agric., 567-570.
- Daufin G., Rene F., Aimar P.** (1998). Les séparations par membrane dans les procédés de l'industrie alimentaire. 592 p, Lavoisier, Paris.

- De Bruijn J.M., Kieboom A.P.G., Van Bekkum H., Van Der Poel P.W.** (1986). Reactions of monosaccharides in aqueous alkaline solutions. *Sugar Technol. Rev.*, 21-52.
- Decloux M.** (1996) Habilitation à diriger des recherches. Institut National Polytechnique de Toulouse,
- Decloux M., Dornier M.** (1993) Microfiltration tangentielle sur membrane en céramique. Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy,
- Decloux M., Punidadas P., Trystram G.** (1989). Purification de solutions sucrées par microfiltration tangentielle sur membrane minérale. *ICIM* 1, 487-491.
- Decloux M., Tatoud L., Dornier M.** (2000). Essais de faisabilité en filtration tangentielle : proposition d'une méthode pour dimensionner une unité industrielle. *Ind. Alim. Agric.*, 117,
- Determann H.** (1969). Chromatographie sur gel. Filtration, perméation, tamisage moléculaire (Manuel de laboratoire). 193 p, Paris.
- Dornier M.** (1994). Développement d'outils pour l'optimisation des conditions hydrodynamiques en filtration tangentielle. Thèse Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy,
- Dufresnoy X.** (1978). Les caramels. *Bios*, 9, 19-25.
- Duval C., Duval R.** (1978). Dictionnaire de la chimie et de ses applications 3ème édition. 1087 p, Technique et documentation, Paris.
- Eggleston G.** (1998). Changes in chemistry across evaporators. *Int. Sugar J.*, 100, 49-52 + 92-95.
- Fontana P.** (1989). Prove su impianto pilota di microfiltrazione di sciroppi di raffineria. *L'industria Saccarifera Italiana*, 82, 96-98.
- Godshall M.A.** (1997). Color analysis. *Sugar Industry Technologists*, 8-28.
- Godshall M.A., Clarke M.A., Dooley C.D., Roberts E.J.** (1987). Large colorant and polysaccharide molecules in raw cane sugars. *Sugar Industry Technologists'Annual Meeting*, 1-19.

- Greenshields R.N., Macgillivray A.W.** (1972). Caramel-Part1 : The browning reactions. *Process Biochem.*, 11-16.
- Hach** (1993) Turbidimètre de laboratoire. Modèle 2100AN, mode d'emploi. Hach Company,
- Hamon M., Pellerin F., Guernet M., Mahuzier G.** (1990). Spectrométrie dans l'ultraviolet et le visible. In: *Chimie analytique : méthodes spectrales et analyse organique*. 2ème édition, 109-135, Lavoisier, Paris.
- Hirano M., Miura M., Gomyo T.** (1996). A tentative measurement of brown pigments in various processed foods. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 877-879.
- Hodge J.E.** (1953). Dehydrated foods. *J. Agric. Food Chem.*, 1, 928-943.
- Icumsa** (1994). International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. *Methods Book*, p, ICUMSA, Publications Department, Colney, Norwich (England).
- Janson J.** (1967). Adsorption phenomena on sephadex. *J. chrom.*, 28, 12-20.
- Kelly F.H.C., Brown D.W.** (1978). Thermal decomposition and color formation in aqueous sucrose solutions. *Sugar Technol. Rev.*, 6, 1-48.
- Keramat J., Nursten H.E.** (1994). The relationship between the coloured compounds present in the pressed liquor of cane sugar manufacture and those formed in the Maillard reactions, in alkaline degradation of sugars, and in caramelisation. *Food Chem.*, 51, 417-420.
- Kishihara S., Fujii S., Komoto M.** (1981). Ultrafiltration of cane juice. Influence of flux and quality of permeate. *Int. Sugar J.*, 83, 35-39.
- Kroh L.** (1994). Caramelisation in food and beverages. *Food Chem.*, 51, 373-379.
- Lesec J.** (1994). Chromatographie par perméation de gel. *Chromatographie d'exclusion stérique*. P 1465. *Techniques de l'ingénieur : Analyse et caractérisation*, 1-11.
- Mauch W.** (1971). The chemical properties of sucrose. *Sugar Technol. Rev.*, 1, 239-290.
- Meginnis R.A.** (1982). *Beet sugar technology* 3rd Edition. 855 p, Beet sugar development foundation, Denver USA.
- Moll N.** (1993). Schéma de principe des réactions de brunissement non enzymatique. *Ind. Alim. Agric.*, 110, 301-307.

- Nigay H.** (1993). Les réactions de Maillard et de caramélisation : caramel aromatique - caramel colorant. Aspects scientifiques et réglementaires. *Ind. Alim. Agric.*, 110, 313-315.
- Parker K.J., Williams J.C.** (1968). The isolation and properties of sugar colorants. Research centre, Tate and Lyle Ltd, 117-127.
- Patel M.N.** (1991). The potential application of membrane processes in the cane sugar industry. *Proceedings of the South African Sugar Technologists' association*, 161-168.
- Paton N.H.** (1992). Sugar cane phenolics and first expressed juice colour. Part 1: Determination of chlorogenic acid and other phenolics in sugar cane by HPLC. *Int. Sugar J.*, 94, 99-108.
- Paton N.H., Duong M.** (1992). Sugar cane phenolics and first expressed juice colour Part 3: Role of chlorogenic acid and flavonoids in enzymic browning of cane juice. *Int. Sugar J.*, 94, 170-176.
- Pharmacia** (1979) Filtration sur gel. Théorie et pratique. Document technique. Pharmacia Fine Chemicals., Suède.
- Pieck R.** (1963). Le problème de la formation de la coloration en sucrerie. *Commission Internationale Technique de Sucrierie. 12ème Assemblée Générale*, 17-20 Juin, 41-53.
- Piron E.** (1996). Microfiltration tangentielle de fluides biologiques. Modélisation physique et utilisation des réseaux de neurones. Thèse Institut National Agronomique Paris-Grignon - INRA,
- Punidades P.** (1990). Microfiltration tangentielle sur membrane minérale de produits sucrés. Thèse Ecole Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, Massy,
- Punidades P., Decloux M., Trystram G.** (1990). Microfiltration tangentielle sur membrane minérale en céramique : Application au traitement du sucre roux. *Ind. Alim. Agric.*, 107, 615-623.
- Raman L.P., Cheryan M., Rajagopalan N.** (1994). Consider nanofiltration for membrane separations. *Chem. Eng. Progress*, March 1994, 68-74.

- Ribereau-Gayon P.** (1968). Les différentes familles de composés phénoliques largement répandus. In: Les composés phénoliques des végétaux, 7-16, 172-175, 182-183., Dunod, Paris.
- Rosset R., Caude M., Jardy A.** (1991). Chromatographie en phase liquide et supercritique. 920 p, Masson, Paris Milan Barcelone Bonn.
- Rouessac F., Rouessac A.** (1998). Analyse chimique-Méthodes et techniques instrumentales modernes. 4ème édition. 403 p, DUNOD, Paris.
- Saporta G.** (1990). Probabilité, analyses de données et statistiques. 493 p, Technip, Paris.
- Shore M., Broughton N.W., Dutton J.V., Sissons A.** (1984). Factors affecting white sugar colour. Sugar Technol. Rev., 12, 1-99.
- Smith N.H.** (1966). Fractionation of sugar colorants with molecular sieves. Sugar Proc. Res.Conf., 84-102.
- Smith P., Paton N.H.** (1985). Sugarcane flavonoids. Sugar Technol. Rev., 12, 117-142.
- Strazielle C.** (1984). Méthodes de caractérisation par la détermination des masses moléculaires. P595. Techniques de l'ingénieur : Analyse et caractérisation, 17-21.
- Thornton J.** (1990). Caramel colours - a brief review. Food Sci. Technol. Today, (1), 9-11.
- Trichard J.M., Tatoud L., Decloux M.** (1998). Influence du mode de conduite sur les performances de la microfiltration tangentielle de refontes de sucre roux. Ind. Alim. Agric., 115, 21-29.
- Van Der Poel P., Schiweck H., Schwartz T.** (1998). Sugar technology. Beet and Cane sugar Manufacture. 1120 p, Lavoisier librairie, Paris.
- Vane G.W.** (1977). The application of membrane processes in the sugar industry. La sucrerie belge, 96, 277-282.
- Vercellotti J., Clarke M., Blanco R., Patout W., Florence R.** (1998). Chemistry of membrane separation processes in sugar industry applications. part I : composition of membrane fouling materials, part II : treatment to remove membrane fouling materials. Sugar Industry technologist annual meeting (SIT98), 49-78.

Williams J. (1974). Chemical and physical properties of coloured degradation products of sugars. Proceedings 15. International society of sugar cane technologists, 1403-1411.

RESUME

En sucrerie, un des principaux critères de qualité est la faible coloration des cristaux de sucre. Il s'avère que les colorants de hautes masses molaires adhèrent plus facilement aux cristaux. L'utilisation de la filtration tangentielle est donc intéressante pour éliminer ces colorants. La caractérisation du procédé étant insuffisante nous avons mis au point une méthode de chromatographie d'exclusion stérique (C.E.S.) pour évaluer la rétention par membranes. Le suivi de la formation des colorants dans un réacteur ainsi que des calculs statistiques (ACP et méthode de Ward) sur leurs spectres UV, montrent que les PDAH ont le plus de chance de se former en sucrerie. Les mélanoidines les suivent de près alors que la formation des caramels reste peu probable. La mise au point de la C.E.S. s'est avérée difficile suite à des phénomènes d'interactions. L'analyse des colorants et d'une refonte de sucre roux par C.E.S montre que les caramels sont des composés de plus faibles masses molaires ($\leq 0,4$ kg/mol) que les mélanoidines et les PDAH qui ont des masses molaires proches (0,08 à 22 kg/mol). En plus de composés de très hautes masses molaires, le sucre roux contient des composés de masses molaires correspondant à la gamme de masses des colorants de fabrication en sucrerie. L'analyse des filtrats des colorants et d'une refonte de sucre roux par C.E.S. confirme que la filtration tangentielle n'est pas un simple tamisage. L'évaluation d'un taux de rétention à 265 nm et à 300 nm montre qu'il n'est pas suffisant d'évaluer un taux de rétention à une seule longueur d'onde. Un bon taux de rétention des impuretés du sucre roux est obtenu avec des membranes de porosité allant de 10 kg/mol à 50 kg/mol.

Mots clés : colorants - sucrerie - filtration tangentielle - chromatographie d'exclusion stérique - masses molaires - sucre roux

ABSTRACT

In sugar industry, one of the main quality criteria is the low sugar crystal coloration. It turns out that when colorants have a high molar mass, their adherence to the sugar crystal is more important. The removal of these colorants by crossflow filtration may be interesting, but the evaluation of this process efficiency is insufficient. We then installed and adjusted the method of size exclusion chromatography (S.E.C.) to measure the molar mass of sugar colorants and to understand more what is really removed by membranes. By following the kinetics of colorants formation into a reactor and by statistical calculations (PCA and Ward's method) on their UV spectra, we found that HADP forms most in sugar industry. Melanoïdins follows them closely while the formation of caramels remains little probable. The adjustment of the S.E.C. method turned out difficult because of the interaction phenomena. Size exclusion chromatography of colorants and raw sugar remelt shows that caramels are compounds of low molar mass ($\leq 0,4$ kg/mol) compared to melanoïdins and HADP which have the same molar mass (0,08 kg/mol to 22 kg/mol). Besides compounds of very high molar mass, the raw sugar contains compounds with molar mass similar to those of the colorants analyzed. Analyses of colorants and raw sugar remelt filtrates by S.E.C. shows that much attention must be paid to that the retention of the molecules in crossflow filtration is not directly related to the pores size. An assessment of retention ratio in 265 nm and 300 nm shows that the assessment of retention ratio, only in a single wavelength, is not representative of the total real retention. Membranes of 10 kg/mol to 50 kg/mol give a best retention ratio of raw sugar impurities.

Key words : colorants - sugar industry - crossflow filtration - size exclusion chromatography - molar masses raw sugar