



**HAL**  
open science

# Etude du fractionnement de graines entières oléo-protéagineuses pour l'obtention de fractions multifonctionnelles de type "émulsions actives" dans le domaine de la formulation cosmétique

Alice Magimel

## ► To cite this version:

Alice Magimel. Etude du fractionnement de graines entières oléo-protéagineuses pour l'obtention de fractions multifonctionnelles de type "émulsions actives" dans le domaine de la formulation cosmétique. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2016. Français. NNT : 2016INPT0097 . tel-04635717

**HAL Id: tel-04635717**

**<https://theses.hal.science/tel-04635717v1>**

Submitted on 4 Jul 2024

**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.



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

**Discipline ou spécialité :**

Sciences des Agroressources

---

**Présentée et soutenue par :**

Mme ALICE MAGIMEL

le jeudi 10 novembre 2016

**Titre :**

Étude du fractionnement de graines entières oléo-protéagineuses pour l'obtention de fractions multifonctionnelles de type "émulsions actives" dans le domaine de la formulation cosmétique

---

**École doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. GERARD VILAREM

MME CHRISTINE RAYNAUD

**Rapporteurs :**

M. FARID CHEMAT, UNIVERSITE D'AVIGNON

M. RIMANTAS VENSUKTONIS, UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE KAUNAS

**Membre(s) du jury :**

M. ZEPHIRIN MOULOUNGUI, INP TOULOUSE, Président

M. MAGALI MARTIN-BIRAN, CEREVAA, Membre

Mme CHRISTINE RAYNAUD, INP TOULOUSE, Membre

M. NICOLAS FABRE, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

## Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Etat de l'art</b> .....	<b>15</b>
<b>I.1 Emulsions et émulsifiants</b> .....	<b>15</b>
I.1.1 Introduction.....	15
I.1.2 Définition d'une émulsion.....	16
I.1.3 Les émulsifiants.....	18
I.1.4 Polymères et molécules naturelles aux propriétés émulsifiantes.....	24
I.1.5 Emulsions stabilisées par des particules solides.....	33
I.1.6 Applications industrielles de nouveaux émulsifiants : exemples de brevets .....	34
I.1.7 Caractérisations et des émulsions et de leur stabilité .....	37
<b>I.2 Choix des matières premières et leurs utilisations dans la formulation cosmétique</b> <b>47</b>	
I.2.1 Les graines, des ressources disponibles, de compositions variées.....	47
I.2.2 Avantages de l'utilisation de graines pour des formulations cosmétique .....	71
<b>I.3 Procédés de fractionnement des graines oléoprotéagineuses</b> .....	<b>75</b>
I.3.1 Procédés d'obtention des huiles végétales .....	76
I.3.2 Procédés d'extraction aqueuse en batchs.....	80
I.3.3 Fractionnement des graines oléo-protéagineuses en extrudeur bi-vis .....	82
<b>I.4 Conclusion</b> .....	<b>89</b>
<b>II. Caractérisations physico-chimiques des graines utilisées et propriétés fonctionnelles de certaines fractions</b> .....	<b>95</b>
<b>II.1 Matières premières employées</b> .....	<b>95</b>
<b>II.2 Caractérisation des matières premières</b> .....	<b>97</b>
II.2.1 Composition des matières végétales .....	97
II.2.2 Affinité des matières premières pour l'eau.....	101
II.2.3 Extraction de l'huile par pressage des graines en monovis .....	102
II.2.4 Caractérisation des huiles végétales.....	103
II.2.5 Composition des fractions protéiques des différentes graines .....	104
II.2.6 Caractérisation des activités biologiques .....	108
<b>II.3 Propriétés fonctionnelles des fractions protéiques</b> .....	<b>108</b>
II.3.1 Extraction des fractions protéiques.....	108
II.3.2 Caractérisation intrinsèque des fractions protéiques.....	109
II.3.3 Propriétés moussantes des fractions protéiques.....	110
II.3.4 Propriétés émulsifiantes des fractions protéiques.....	111
II.3.5 Caractérisation de la morphologie des systèmes eau-huile-protéines .....	112
<b>II.4 Fractionnement aqueux de graines</b> .....	<b>116</b>
II.4.1 Procédé de fractionnement des graines de lin entières.....	117
II.4.2 Fractionnement aqueux des graines broyées .....	123
<b>II.5 Conclusion</b> .....	<b>126</b>
<b>III. Fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis</b> .....	<b>131</b>
<b>III.1 Introduction</b> .....	<b>131</b>
<b>III.2 Généralités sur le fractionnement aqueux des graines oléo-protéagineuses en extrudeur bivis</b> .....	<b>132</b>
III.2.1 Principes généraux du fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis.....	132
III.2.2 Schéma général de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis et post-traitements.....	133
III.2.3 Description mathématique des données acquises suite au fractionnement .....	137
<b>III.3 Fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis</b> .....	<b>139</b>

III.3.1	Etude des conditions opératoires du fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis.....	139
III.3.2	Evaluation du procédé de fractionnement et caractérisation chimique des fractions produites.....	150
III.3.3	Faisabilité du pressage des graines de colza en extrudeur bi-vis .....	160
III.3.4	Reproductibilité du procédé de fractionnement aqueux des graines de colza..	161
III.3.5	Conclusion.....	161
<b>III.4</b>	<b>Extension du procédé de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis aux graines de chanvre, cynara et pastel.....</b>	<b>162</b>
III.4.1	Etude de l'extension des conditions opératoires de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis en fonction de la matière première .....	162
III.4.2	Comparaison du procédé de fractionnement aqueux pour quatre graines oléoprotéagineuses.....	164
III.4.3	Comparaison des procédés de fractionnement aqueux en réacteur batch agité et en extrudeur bi-vis.....	170
<b>III.5</b>	<b>Fractionnement simultané de graines oléo-protéagineuses : étude de la co-extrusion .....</b>	<b>172</b>
III.5.1	Objectifs et choix des mélanges de graines.....	172
III.5.2	Influence de la co-extrusion sur le procédé de fractionnement et sur la composition des fractions obtenues.....	173
III.5.3	Evaluation analytique de la sélectivité d'extraction pour les différents couples de graines	180
III.5.4	Activité antioxydante des fractions produites .....	182
III.5.5	Conclusion et avantages des co-extrusions .....	184
<b>III.6</b>	<b>Enrichissement des émulsions de graines oléo-protéagineuses par incorporation d'un composé actif lors du procédé de fractionnement en extrusion bi-vis : cas des mucilages de lin .....</b>	<b>185</b>
III.6.1	Etude de la stabilisation <i>ex-situ</i> des émulsions de graines de colza par le mucilage de lin	186
III.6.2	Etude de faisabilité de l'incorporation des mucilages de lin lors du fractionnement aqueux des graines en extrudeur bi-vis .....	187
III.6.3	Fractionnement des graines en extrudeur bi-vis en présence de mucilages de lin	189
III.6.4	Conclusion et avantages de l'incorporation de mucilages.....	195
<b>III.7</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>196</b>
<b>IV.</b>	<b>Caractérisations physico-chimiques des émulsions et applications dans des formulations cosmétiques.....</b>	<b>202</b>
<b>IV.1</b>	<b>Introduction et contexte.....</b>	<b>202</b>
<b>IV.2</b>	<b>Caractérisation des émulsions.....</b>	<b>202</b>
IV.2.1	Composition des émulsions sans ajout de mucilages.....	203
IV.2.2	Composition des émulsions avec ajout de mucilages.....	206
IV.2.3	Etude des émulsions par microscopie optique .....	213
IV.2.4	Analyse des émulsions par calorimétrie différentielle à balayage .....	217
IV.2.5	Caractérisation des émulsions par RMN à bas champs .....	226
<b>IV.3</b>	<b>Formulations à partir des émulsions .....</b>	<b>229</b>
IV.3.1	Formulations à partir des émulsions 1.....	230
IV.3.2	Formulations à partir des émulsions 2.....	230
<b>IV.4</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>232</b>
	<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>236</b>
	<b>Partie expérimentale .....</b>	<b>242</b>
<b>P.E.1</b>	<b>Caractérisation des matières premières employées .....</b>	<b>242</b>
P.E.1.1	Teneur en eau et en matières volatiles.....	242

P.E.1.2	Teneur en matières minérales .....	242
P.E.1.3	Teneur en matières organiques.....	243
P.E.1.4	Teneur en lipides des solides .....	243
P.E.1.5	Teneur en lipides des phases hydrophobes .....	243
P.E.1.6	Dosage des lipides dans les mucilages par une méthode colorimétrique .....	244
P.E.1.7	Obtention des huiles végétales .....	245
P.E.1.8	Composition des huiles .....	245
P.E.1.9	Détermination des teneurs en fibres.....	246
P.E.1.10	Détermination de la teneur en composés hydrosolubles.....	248
P.E.1.11	Détermination de la teneur en protéines.....	249
P.E.1.12	Classification d'Osborne.....	250
P.E.1.13	Détermination de la composition en acides aminés.....	251
P.E.1.14	Calcul du taux de gonflement des matières premières .....	251
P.E.1.15	Détermination des activités antioxydantes des graines .....	252
P.E.1.16	Détermination de la teneur en sucres totaux par la méthode du phénol sulfurique .....	253
P.E.1.17	Dosage des sucres totaux par HPIC .....	253
<b>P.E.2</b>	<b>Protocoles de fractionnement aqueux des graines : réacteurs fermés .....</b>	<b>254</b>
P.E.2.1	Obtention des mucilages de Lin.....	254
P.E.2.2	Fractionnement aqueux de graines en batches.....	256
<b>P.E.3</b>	<b>Mise en œuvre de l'extrudeur bi-vis Clextral BC 21 .....</b>	<b>256</b>
P.E.3.1	Description de l'extrudeur.....	256
P.E.3.2	Description des périphériques de l'extrudeur BC 21 .....	256
P.E.3.3	Mise en œuvre de l'extrudeur BC 21 pour le fractionnement aqueux de graines entières	258
P.E.3.4	Détermination de la distribution des temps de séjour .....	258
<b>P.E.4</b>	<b>Caractérisation des émulsions.....</b>	<b>261</b>
P.E.4.1	Microscopie optique.....	261
P.E.4.2	Analyse enthalpique différentielle .....	261
P.E.4.3	Conductimétrie.....	261
<b>P.E.5</b>	<b>Travaux sur les fractions protéiques.....</b>	<b>262</b>
<b>Annexes.....</b>		<b>266</b>
<b>A.1</b>	<b>Schémas de fractionnement des graines en presse monovis.....</b>	<b>266</b>
<b>A.2</b>	<b>Diagrammes ternaires tracés avec les pseudos-isolâts protéiques des graines</b>	<b>269</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>		<b>274</b>
<b>Table des figures.....</b>		<b>286</b>
<b>Table des tableaux .....</b>		<b>289</b>



## Remerciements

Ces travaux de thèse ont été effectués au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle de Toulouse, dans le cadre d'un financement CIFRE avec la société Sirius SAS (Cambounet sur le Sor, 81).

En premier lieu, j'aimerais adresser mes remerciements à Messieurs Carlos Vaca-Garcia et Gérard Vilarem, directeurs successifs du laboratoire, pour m'avoir accueillie en stage(s) puis en thèse. Merci de toujours tout mettre en œuvre pour que les travaux de recherche se passent dans les meilleures conditions possibles. Carlos, merci également pour vos conseils avisés lors des séminaires de laboratoire.

Je remercie messieurs Farid Chemat et Rimantas Venskutonis de m'avoir fait l'honneur d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci pour l'intérêt que vous avez porté sur ces travaux et merci aussi pour les discussions qui ont suivi, et qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit. Madame Magali Martin-Biran, merci pour votre disponibilité et votre gentillesse lors de notre collaboration, et merci aussi d'avoir fait le déplacement pour ma soutenance de thèse. Monsieur Nicolas Fabre, merci pour vos remarques sur la partie « botanique », et pour vos conseils concernant les perspectives des travaux. Monsieur Zephirin Mouloungui, merci de m'avoir fait l'honneur de diriger ce jury de thèse avec bienveillance.

Monsieur Gilles Berthoumieux, merci pour votre confiance durant ces quatre années, et merci de m'avoir permis d'aménager mon emploi du temps durant cette dernière année, afin de mener à bien ce manuscrit.

Gérard et Christine, merci de m'avoir fait confiance lors du montage du projet. Gérard, merci d'avoir toujours eu une vue d'ensemble du projet, qui m'a permis de prendre du recul par rapport aux résultats et aux perspectives quand c'était nécessaire. Merci aussi pour vos encouragements et votre bonne humeur, en particuliers lors de la rédaction et de la préparation de l'oral.

Christine, merci d'avoir toujours été disponible malgré un emploi du temps surchargé. Merci pour votre optimisme permanent et merci de m'avoir encouragée à aller toujours plus loin dans les travaux de recherche (en particulier dans les travaux d'incorporation de mucilages en extrusion ... !). Je vous remercie également tout particulièrement pour votre réactivité et votre soutien lors de la rédaction et de la préparation de l'oral. Je garderai grâce à vous de doux souvenirs de cette période, malgré le stress inhérent à tout ça.

Merci à tout le personnel du LCA de maintenir une ambiance aussi bien détendue que propice au travail. Merci à l'équipe logistique, Didier, Romain, Ingrid, et Emmanuelle pour le support technique dans la bonne humeur.

Merci à Céline et Géraldine de faire mes premiers pas au laboratoire lors de mes stages.

Anne, merci pour tout ! Pour les petits et les gros coups de main au quotidien, pour les conseils pratiques et le prêt de matériel. Merci de m'avoir épaulée avec Laure lors des campagnes d'extrusion et des multiples analyses qui en découlaient.

Laure, merci pour ton aide sur le traitement et l'interprétation des résultats. Merci aussi pour ta rigueur et pour les multiples relectures du chapitre 3.

Lupita, merci pour ta sympathie et pour ton aide sur la DSC.

Eloïse, merci d'avoir travaillé à mes cotés pendant un an. Merci pour ton sourire permanent et pour les moments de détente en chanson. Bon vent pour les belles aventures qui t'attendent !

William, merci pour tes coups de main dans la bonne humeur !

Philippe, merci pour ta disponibilité lors de tes passages au LCA, merci pour tes conseils sur l'extrusion !

Merci à mes collègues doctorants, compagnons de galère ! Merci en particulier à ceux qui ont partagé mon bureau : Matthieu (merci pour tes conseils et pour l'aide au Kjeldahl), Jeremy, Marian, Evelien, Bouchra, .. Merci pour votre bonne humeur.

Nati, merci d'être devenue bien plus qu'une simple collègue de bureau. Merci pour les bons moments partagés à Valladolid, Paris et La Rochelle, et pour tous ceux qui restent à venir. Cécile, qui aurait cru que du CM2 DE Balma nous nous retrouverions au LCA ? Merci pour les moments potins (ça va, tout le labo est au courant maintenant !), pour les pauses, les sessions shopping et surtout pour les quelques jours à Paris ! Merci pour les bons moments partagés également avec Marine.

Je remercie tout le personnel de la société de Sirius pour m'avoir toujours accueillie chaleureusement lors de mes visites ponctuelles à Cambounet durant ma thèse. Des remerciements particuliers à celles qui sont devenues mes collègues de bureau : Isabelle, Laura et bien sûr Aloïse. Merci pour votre soutien durant mes moments de stress intense (*de toute façon je suis nulle et j'y arriverai jamais*). Vous êtes bien plus que des collègues ! Ma petite chicorée, merci pour tout ! Du karaoké en voiture aux fous rires en prod, aux conseils culinaires et aux news Pure People.

Manou, merci d'apporter la chaleur réunionnaise dans la campagne tarnaise.

Merci à mes amis extérieurs ! Sophie, Hélène et Elsa, de la licence CBPS à nos vies d'adultes, quel plaisir d'évoluer avec vous ! Lucie, des bancs de la P1 à nos thèses respectives, merci d'être une amie fidèle. Nadège et Nico, merci pour les traditionnels dîners du dimanche soir, particulièrement précieux durant ma thèse, et qui vont continuer. Agnès, Elo et Antho, merci d'être là depuis le collège, le lycée et la fac.

Merci à ma famille pour son soutien sans faille. Merci à mes parents de m'avoir toujours encouragée et soutenue dans mes choix. Ça y est, on l'a bu ce champagne ! Victor et Louise, je suis fière d'être votre sœur. Merci pour ce que vous êtes tout simplement. Merci également du fond du cœur à Cathy et Michel. Merci de m'avoir accueillie à bras ouverts dans votre famille.

Julien, notre histoire a démarré durant cette thèse. Merci de faire partie de ma vie, merci pour ton support quotidien. De beaux projets et de beaux voyages s'offrent à nous.

# Introduction générale



## Introduction générale

Aujourd'hui, les nouvelles réglementations du référentiel Ecocert sont de plus en plus exigeantes envers la qualité et la provenance des matières premières utilisées dans la formulation de cosmétiques biologiques. Cette problématique s'applique en particulier aux émulsifiants, traditionnellement pétro-sourcés. Entre autres composés, les Polyéthylène glycol (PEG), polymères hydrophiles non ioniques, font partie des douze ingrédients à éviter, selon une liste émise en 2010 par la fondation canadienne David Suzuki pour l'environnement et la santé qui s'attache à protéger la diversité de la nature.

Les progrès de la science dans le domaine des émulsifiants ont permis de proposer depuis de nombreuses années de nouvelles molécules. Certains peuvent être issus de sucres, tels que les alkylpolyglucosides. Parmi eux, le Montanov 68 (cetearyl alcohol and cetearyl glucoside), commercialisé par la société Seppic provient d'un procédé de synthèse sans solvant. D'autres sont obtenus à partir d'acides gras comme par exemple le DUB GMS (glyceryl stearate) de la Stéarinerie Dubois.

En outre, les consommateurs, influencés par les médias, sont de plus en plus demandeurs de cosmétiques dits « naturels » ou « verts ».

A ce jour, peu de travaux à notre connaissance font état de substitution de tensioactifs et d'émulsifiants synthétiques par des matrices naturelles actives dans le domaine de la formulation cosmétique. De plus, la fonctionnalisation d'émulsions biosourcées par incorporation de molécules actives à libération contrôlée revêt aujourd'hui une grande importance dans les domaines de la formulation à vocation santé et cosmétique.

Les travaux de cette thèse CIFRE sont le fruit d'un partenariat entre la société Sirius Bio et le Laboratoire de Chimie Agro-industrielle. Depuis 1996, la société Sirius Bio s'est spécialisée dans le négoce de matières premières végétales naturelles et biologiques, notamment des huiles essentielles, végétales (*huiles grasses*) et de la vanille. Un laboratoire de Recherche et Développement de formulation de cosmétiques y réalise des produits de soin à façon pour des marques propres ainsi que pour des clients depuis 2006. L'objectif de Sirius Bio est d'aller le plus loin possible dans la formulation de cosmétiques « verts », en particulier en s'affranchissant définitivement de l'utilisation d'émulsifiants issus de procédés de synthèse. Ces travaux se situent donc dans un contexte de chimie durable.

L'objectif de notre étude est de proposer un procédé éco-compatible pour l'obtention d'émulsions « *in situ* » à partir de graines oléo-protéagineuses provenant de cultures régionales telles que le chanvre, le cardon, le colza et le pastel. La technologie

choisie pour ce fractionnement est l'extraction en réacteur thermo-mécano-chimique déjà largement étudié au sein du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, non seulement pour le traitement de la matière végétale dans le domaine des matériaux, mais également pour le fractionnement des agro-ressources.

Dans le cadre de nos travaux, nous proposons d'adapter le procédé déjà étudié au Laboratoire de Chimie Agro-industrielle sur les graines de tournesol et de neem au cas des graines de chanvre, de colza, de pastel et de lin qui seront fractionnées seules ou en mélanges. Les graines oléo-protéagineuses sont des substrats de prédilection du fait de leur grande diversité en termes de composition en acides gras et en protéines.

Ce procédé permet d'obtenir la fraction d'huile extraite sous forme émulsifiée, dans l'eau utilisée comme solvant d'extraction. Le passage par les émulsions en termes de fractionnements permet d'éviter l'usage de solvants organiques, préservant la caractéristique éco-compatible du procédé d'extraction. Le caractère émulsifiant favorisera par ailleurs la synergie des activités ainsi que la galénique des formulations. Les co-produits de l'extraction du végétal pourront alors être valorisés en tant qu'émulsifiant et/ou tensioactifs pour permettre la substitution des ingrédients de synthèse (SDS, sulfate de lauryle, éther de glycol, PEG, ...) et élaborer directement des formulations cosmétiques 100% végétales et biolabellisables. L'aspect innovant de ces travaux de recherche est de pouvoir réaliser une formulation en totum de plante conservant les activités biologiques attendues. La plante possède dans son entité tous les éléments lui permettant de se défendre contre les agressions extérieures, de se développer et de se nourrir. Cette étude se focalise sur les procédés d'extraction de manière à obtenir des fractions sans modification de la répartition des molécules actives ainsi que de leurs co-facteurs de façon à les laisser dans leur univers naturel pour optimiser l'activité des actifs.

Dans une première partie, l'état de l'art sera réalisé sur les émulsions et les émulsifiants, ainsi que sur les graines sélectionnées et les procédés de fractionnement déjà appliqués aux graines afin de mettre en évidence les verrous scientifiques et technologiques et choisir les voies de recherche à privilégier.

La deuxième partie sera consacrée à la caractérisation physico-chimique des graines, ainsi qu'à l'étude de leur fractionnement. Un premier fractionnement sera destiné à l'extraction spécifique de pseudo-isolats protéiques, dont les propriétés émulsifiantes seront comparées. Une extraction aqueuse en réacteur batch agité de chacune des graines oléoprotéagineuses permettra de comparer l'impact de la nature des matières premières sur le fractionnement. Pour finir, les graines de lin subiront un fractionnement destiné à l'extraction de leurs mucilages, lesquels seront ensuite caractérisés avant d'être utilisés comme actifs dans le chapitre suivant.

Dans le troisième chapitre nous étudierons le fractionnement aqueux des graines en réacteur thermo-mécano-chimique (TMC) ouvert. Ce dispositif permettra l'extraction des

lipides sous forme d'émulsions huile dans eau riches en protéines. Ce fractionnement sera appliqué aux graines entières seules mais également à des mélanges de graines entières, afin d'en étudier les phénomènes mis en jeu et les effets synergiques impactant non seulement le procédé mais également la fonctionnalité des émulsions produites. Enfin, un polysaccharide sera incorporé dans le solvant extractant afin d'étudier son influence sur le procédé de fractionnement et sur la stabilité des émulsions. Il s'agira également afin d'évaluer la possibilité d'obtenir des fractions enrichies en molécules actives.

Le quatrième chapitre sera dévolu à la composition des émulsions obtenues ainsi en relation avec leur stabilité, au moyen de méthodes analytiques telles que la calorimétrie différentielle à balayage ou la résonance magnétique nucléaire à bas champs. Pour finir, l'incorporation, au sein de formulations cosmétique, des fractions émulsifiées eau dans huile légères et grasses développées dans le troisième chapitre sera expérimentée et discutée dans ce chapitre.

Une dernière partie expérimentale sera dédiée aux matériels et méthodes utilisés pour mener les travaux.



# Chapitre I : Etat de l'art



# I. Etat de l'art

## I.1 Emulsions et émulsifiants

### I.1.1 Introduction

De nombreux produits cosmétiques, tels que les crèmes mais également certains gels douche sont des émulsions :

- les crèmes légères, pénétrant facilement dans la peau sont des émulsions huile dans eau, stabilisées par des émulsifiants hydrosolubles
- les « cold-creams » sont des formulations épaisses, denses, correspondant à des émulsions eau dans huile, stabilisées par des émulsifiants lipophiles.

Ainsi, la nature et la concentration des deux phases qui composent l'émulsion permettent de donner une gamme de texture allant des émulsions les plus fluides aux plus denses, ce qui explique l'intérêt porté aux émulsions par les domaines de l'agro-alimentaire et de la cosmétique.

Jusqu'à récemment, beaucoup d'émulsifiants utilisés dans le secteur cosmétique étaient d'origine pétrosourcée, mais leur utilisation est de plus en plus remise en question, du fait de l'origine fossile du pétrole, mais également du fait du potentiel irritant de bon nombre de ces produits. Certains des émulsifiants les plus critiqués appartiennent à la famille des PEGs (polyethylene glycol). Nous pouvons citer par exemple le PEG-25 propylène glycol stearate, le PEG-75 propylène glycol stearate, ... En plus de leur rôle d'émulsifiant, ils peuvent être utilisés comme solvants, et permettent de donner une brillance nacrée au produit.

Les PEG appartiennent à la liste des « douze ingrédients à éviter » dans les formulations cosmétiques, définie par la fondation canadienne David Suzuki. Les autres ingrédients de la liste sont les suivants :

- BHA et BHT : hydroxyanisole butylé et hydroxytoluène butylé
- Les colorants dérivés du goudron de houille
- Les colorants reliés au DEA
- Le dibutyl phtalate
- Les libérateurs de formaldéhyde
- Les parabènes
- Les parfums
- Le petrolatum
- Les siloxanes
- Le sodium laureth sulfate
- Le triclosan

Les PEGs montrent des signes de génotoxicité, et peuvent causer des irritations cutanées s'ils sont employés sur des peaux abimées. D'autre part, ils améliorent la pénétration des actifs et peuvent ainsi permettre à des ingrédients toxiques de traverser l'épiderme.

Ils sont synthétisés par polymérisation d'un gaz très toxique, hautement réactif, cancérigène et mutagène, l'oxyde d'éthylène. Sa polymérisation avec un alcool gras permet, à haute température et haute pression, de former des alcools polyéthoxylés.

Si, en principe, aucune trace d'oxyde d'éthylène n'est retrouvée au sein du produit final, celui-ci peut être contaminé par un co-produit de réaction, le 1,4 dioxane, formé par dimérisation de l'oxyde d'éthylène. Ce composant est considéré par l'état de Californie comme cancérigène pour l'homme, et il est persistant dans l'environnement.

Les PEGs sont interdits par les réglementations ECOCERT et COSMOS, qui régissent les cosmétiques biologiques. D'autre part, la réglementation CE n°1907 en 2006 a mis en place la réglementation européenne REACH (Registration, Evaluation, Autorisation and Restriction of Chemicals). Celle-ci a pour but de remplacer les substances chimiques préoccupantes pour la santé et pour l'environnement. Elle interdit l'utilisation de nombreux tensioactifs tels que les alkylphénols éthoxylés, les éthers sulfates, les alkylbenzènes sulfonates linéaires.

### I.1.2 Définition d'une émulsion

Les émulsions sont un mélange de deux phases non miscibles, une phase aqueuse et une phase grasse, ou plus généralement une phase polaire et une phase apolaire grâce à des tensioactifs.

La phase polaire, aqueuse contient l'eau et les composants hydrophiles pouvant être des ions, des acides ou des bases, des vitamines, des sucres ou encore des protéines.

La phase non-polaire, grasse (huileuse, lipophile ou organique) contient des huiles, des cires ou des graisses, pouvant être synthétiques, ou d'origine végétale ou animale. Le tableau ci-dessous cite quelques exemples de matières premières pouvant être employées dans la phase huileuse (Doumeix, 2011) :

**Tableau 1 : Exemples de composés employés dans la phase grasse d'émulsions**

Origine	Cires	Graisses	Huiles
Animale	Cire d'abeille Blanc de baleine	Lanoline	Huile de baleine Huile de foie de requin
Végétale	Cire de carnauba	Beurre de cacao Beurre de karité	Huile d'arachide, de soja, de colza, d'amande douce ...
Minérale	Paraffine	Vaseline	Vaseline Paraffine
Synthétique	Esters gras	Esters gras	Esters et alcools gras Huile de silicone

Une phase liquide est dispersée au sein de l'autre phase sous forme de gouttelettes de diamètre supérieur à 0,1 µm.

Deux éléments sont nécessaires à l'obtention d'une émulsion stable : une agitation mécanique et un composé émulsifiant.

L'agitation mécanique est indispensable à l'obtention de gouttelettes fines, de taille homogène. Dans l'industrie, différents outils de dispersion sont employés, selon la nature des émulsions formulées (finesse, viscosité, bilan énergétique, transfert à l'échelle industrielle) :

- hélices
- mélangeurs statiques
- turbines
- défloculeuse
- moulin colloïdal
- émulseur rotor-stator
- disperseur à ultrasons
- homogénéiseurs haute pression

Le système mécanique doit assurer un cisaillement, responsable de la dispersion des gouttes, mais également une circulation et un transport du liquide, afin que l'ensemble du volume de l'émulsion puisse être totalement émulsifié.

Classiquement, pour la formulation d'une émulsion pour des applications cosmétiques, les étapes à respecter sont les suivantes :

- les deux phases à mélanger doivent être portées à la même température avant l'émulsification. Dans le cas où la phase grasse contient des cires, la phase aqueuse est également montée à une température de l'ordre de 80°C
- la phase dispersée est versée progressivement dans la phase continue, à laquelle on impose une agitation mécanique
- si certains des ingrédients sont sensibles à la chaleur (conservateurs, parfums, huiles essentielles,...) ils seront introduits lors d'une deuxième phase de mélange, une fois que l'émulsion sera descendue à température ambiante

Les émulsions sont stabilisées grâce à des molécules, les émulsifiants, qui ont pour propriété de se disperser à l'interface entre les deux phases. Cette propriété est liée à leur structure, car elles sont composées d'une tête polaire et d'une queue apolaire. Ainsi, le groupement polaire se situe dans la phase aqueuse et le groupement apolaire se situe au sein de la phase grasse. Les émulsifiants sont une fonction des tensioactifs.

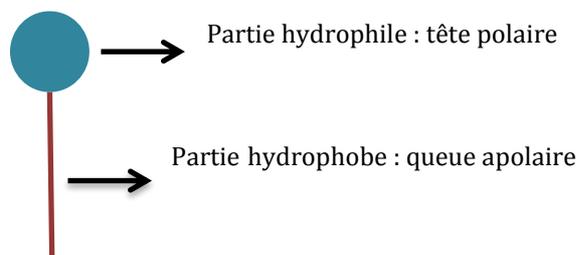


Figure 1 : Représentation schématique d'un tensioactif

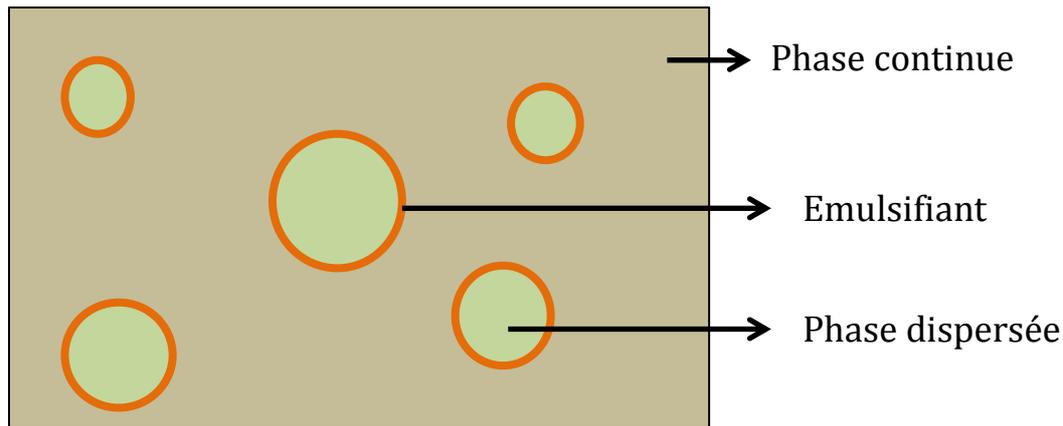


Figure 2 : Représentation schématique d'une émulsion en présence d'un émulsifiant

Dans certains cas, des polymères amphiphiles ou des protéines, mais également des phases lamellaires et des particules solides peuvent jouer le rôle d'émulsifiants. Lorsque le volume de la phase continue ne dépasse pas 30% du volume de l'émulsion, l'émulsion est dite « concentrée ».

### I.1.3 Les émulsifiants

#### I.1.3.1 Généralités

Le lait est l'exemple même du fait que la nature est capable seule de produire des émulsions stables dans le temps grâce aux caséines, des protéines membranaires, qui jouent un rôle d'émulsifiant.

La nature de la tête polaire permet de classer les émulsifiants selon les classes suivantes :

- Anioniques : leur tête polaire dispose d'une charge négative, telle qu'une fonction carboxylate  $\text{COO}^-$ , sulfonate  $\text{SO}_3^-$ , ou sulfate  $\text{OSO}_3^-$
- Cationiques : leur tête polaire dispose d'une charge positive, telle qu'un amine  $\text{R}_3\text{NH}^+$  ou un ammonium quaternaire  $\text{R}_4\text{N}^+$
- Zwitterioniques : c'est le cas des phospholipides et des bétaines qui disposent d'une fonction anionique et d'une fonction cationique
- Non ioniques : c'est le cas des polyols, dont la tête polaire n'est pas chargée.

Les tensioactifs entrent dans la composition de nombreux produits de la vie quotidienne : détergents, produits d'hygiène lavants et rincés, cosmétique blanche (crèmes, laits, maquillage). Dans ces derniers, et dans d'autres produits de soin, les tensioactifs interviennent en tant qu'émulsionnants ou adoucissants.

Les émulsifiants présentent également des propriétés de diminution de la tension de surface, et sont spécifiquement employés pour la stabilisation des émulsions, alors que les tensioactifs peuvent également être employés comme agents moussants, mais aussi comme antiseptiques dans des formulations de produits d'hygiène.

### I.1.3.2 Détermination de la balance hydrophile lipophile

Un émulsifiant soluble dans l'eau stabilise une émulsion huile dans eau, et inversement. Le HLB (balance hydrophile-lipophile) est une donnée caractéristique de toute molécule tensioactive, et caractérise sa solubilité. La valeur de la HLB du tensioactif est un facteur déterminant pour son choix en formulation, en fonction de la teneur en phases aqueuses et huileuses de l'émulsion. Le tensioactif doit être choisi pour être soluble dans la phase continue de l'émulsion. Ainsi, la balance HLB est employée pour caractériser l'affinité relative du tensioactif pour les phases aqueuses et huileuses.

La valeur de la HLB permet de classer les molécules testées de la manière suivante (Vandeputte, 2012):

Tableau 2 : Propriétés des molécules selon la valeur de leur HLB

Zone HLB	Propriétés
4-6	Emulsionnant E/H
7-9	Agent mouillant
8-18	Emulsionnant H/E
13-15	Détergent
15-18	Solubilisant

Les calculs les plus communément employés sont les formules de Griffin et de Davies (Luan et al., 2009).

La formule de Griffin permet de calculer le HLB de la manière suivante :

$$HLB = 20 \times \left(1 - \frac{S}{A}\right)$$

S est l'indice de saponification de l'acide gras

A est l'indice d'acide

Dans ce cas là, la valeur de la HLB varie entre 0 et 20, une HLB de 0 correspond à un tensioactif totalement hydrophobe tandis qu'un tensioactif totalement hydrophile a une HLB de 20.

Quand l'indice de saponification est difficile à obtenir, la HLB est calculée comme suit :

$$HLB = \frac{E + P}{5}$$

E est le pourcentage de fonction oxyéthylénique, et P est le pourcentage d'alcool polyhydroxylé.

Une autre méthode de calcul de la HLB prend en compte les masses moléculaires :

$$HLB = 20 \times \frac{\text{Masse moléculaire partie hydrophile}}{\text{Masse moléculaire de la molécule}}$$

La formule de Griffin correspond à l'équation suivante :

$$HLB = 7 + \sum HLB \text{ groupements hydrophiles} + \sum HLB \text{ groupements hydrophobes}$$

Les différents groupements retrouvés dans les structures des tensioactifs présentent les valeurs de HLB suivantes :

**Tableau 3 : Valeurs de la HLB pour les groupements hydrophiles et hydrophobes**

Groupements hydrophiles	Valeur attribuée au groupement	Groupements hydrophobes	Valeur attribuée au groupement
-O-	1,3	=CH-	-0,475
-OH libre	1,9	-CH <sub>2</sub> -	-0,475
-OH d'un sorbitan	0,5	-CH <sub>3</sub>	-0,475
-COOH	2,1	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-	-0,15
-COO·Na <sup>+</sup>	19,1	-CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -O-	-0,125
-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O-	0,35	Phényl	-1,66

Cependant, ces méthodes de calculs présentent des limites, non seulement parce que les émulsifiants du commerce sont souvent un mélange de molécules, mais aussi parce que ces méthodes de calculs ne prennent pas en compte l'ionisation en fonction du pH, la température, la concentration en émulsifiant, l'interaction avec d'autres molécules et la concentration respective en phases continues et dispersées.

Il existe d'autres méthodes pour calculer le HLB, en considérant la température d'inversion de phase, l'index de polarité ou la différence d'affinité du tensioactif.

Des travaux font également état des relations quantitatives structure-propriété et relation quantitative structure-activité, qui correspondent aux liens entre une structure chimique et une activité biologique ou à une réactivité chimique, dans ce cas là on considère le lien entre la structure de surfactants anioniques et leur HLB. Les tensioactifs sont décrits selon cinq descripteurs : constitutionnels, topologiques, géométriques, électrostatiques, et de chimie quantique (Luan et al., 2009).

Dans certains cas, les données de solubilité et de polarité de la molécule d'intérêt rentrent en jeu dans le calcul de la HLB (Szymanowski and Beger, 1987). En effet, les valeurs de polarité estimées par chromatographie gazeuse en phase inverse, et utilisées ensuite pour calculer les HLB donnent des résultats nettement sous estimés. Il faut en réalité prendre en compte le milieu dans lequel le surfactant est présent lors du calcul de sa HLB, car celui-ci influe sur son comportement et modifie la HLB.

### **I.1.3.3 Les classes d'émulsifiants utilisés dans l'industrie**

Dans le domaine industriel, certains tensioactifs jouent le rôle d'émulsifiants ou de stabilisants et permettent ainsi de garantir la stabilité des produits. Ils peuvent être divisés en quatre classes, comme indiqué dans le tableau ci dessous (Myers, 1999) :

**Tableau 4 : Emulsifiants/stabilisants employés dans l'industrie**

Classe d'émulsifiants/stabilisant	Mode d'action
Ions non surfactants	S'adsorbent à la surface des gouttelettes mais n'affectent pas la tension interfaciale. Certains imposent une barrière électrostatique entre les gouttelettes
Petits matériels colloïdaux	Forment une barrière physique entre les gouttelettes, retardent ou évitent la coalescence des gouttelettes
Additifs polymériques	S'adsorbent fortement à l'interface entre les deux phases, réduisent la tension interfaciale. Forment une barrière par interactions stériques et électrostatiques entre les gouttelettes et modifient la viscosité ou l'élasticité des interfaces. Possèdent également des propriétés de solvatation qui augmentent l'épaisseur de la phase continue et la viscosité interfaciale. Exemples : biopolymères tels que les protéines ou les polysaccharides (amidons, gommages, cellulose), produits synthétiques tels que l'acide polyacrylique
Surfactants monomériques « normaux »	S'adsorbent à l'interface, stabilisent le système en diminuant la tension interfaciale. Certains (SDS par exemple) peuvent être irritants et toxiques pour l'environnement

En plus des molécules amphiphiles monomériques agissant comme tensioactifs, telles que les lécithines, de nombreuses macromolécules peuvent agir comme émulsifiants, c'est le cas des protéines, des polysaccharides, des lipoprotéines, des glycolipides et des lipides polaires.

#### I.1.3.4 Les émulsifiants dans les cosmétiques biologiques et naturels

130 agents jouant le rôle d'émulsifiant, agent de contrôle de la viscosité ou épaississants constituent la base de données COSMOS. Ils sont tous d'origine naturelle, et peuvent être classés selon leurs origines et compositions chimiques.

Il est important de noter que la définition d'un tensioactif naturel peut différer selon les sources et les auteurs, et qu'en l'absence de véritable définition, certaines agences ou référentiels ont mis en place leur propre définition d'ingrédients naturels, selon différents critères :

- Selon la « national products association », les ingrédients dits « naturels » doivent provenir ou être fabriqués à partir d'une matière première renouvelable, trouvée dans la nature, sans aucun additif d'origine pétrochimique.
- Selon le référentiel naturel (label créé en 2008 par l'european natural and organic cosmetics interest grouping), les substances naturelles sont des substances d'origine

botanique, inorganique-minérale ou animale (à l'exception des vertébrés morts), mais également leurs mélanges, et leurs produits de réactions entre eux.

La plupart des normes précisent également des critères de traitement dans un but de préservation de l'environnement.

Les têtes polaires des agro-tensioactifs sont généralement constituées d'un carbohydrate ou d'une protéine. Les carbohydrates peuvent être différents types d'oses (lactoses, polyols,..), du glycérol ou du lactose. Ils peuvent également être générés à partir de co-produits de l'industrie de l'amidon. Les protéines peuvent être issues du gluten de blé ou de maïs sous forme d'oligopeptides ou d'acides aminés.

La chaîne lipophile des agro-tensioactifs est fréquemment issue d'huiles végétales ou d'acides gras isolés.

Certaines molécules émulsifiantes ou tensioactives chimiquement modifiées peuvent être acceptées par les réglementations Cosmos et Ecocert. Le tableau ci dessous rassemble quelques exemples (Beerling and Gough, 2013).

**Tableau 5 : Emulsifiants acceptés par Cosmos et Ecocert**

Procédé chimique	Exemples d'émulsifiants
Saponification de triglycérides	Stearate de sodium Cocoate de sodium
Etherification de la glycérine	Polyglyceryl-3-ricinoleate Polyglyceryl-10-esters
Estérification ou transestérification	Glyceryl oleate Sucrose laurate
Glycosylation d'acides gras	Cetearyl glucoside Decylglucoside
Acylation d'acides gras	Sodium stearoyl glutamate Sodium/disodium cocoyl glutamate
Sulfation d'acides gras	Sodium cetearyl sulfate Sodium coco sulfate
Production amphotérique	Cocoamidopropyl betaine
Réaction entre un glucose et des alcools gras dérivés de matières grasses végétales	Alkylpolyglucosides, tels que : Plantaren 1200 up (lauryl glucoside)  Endinol mild CG-850 (caprylyl-capryl glucoside)
Réaction entre l'acide lactique et des acides gras d'origine végétale	Lactylates : Akoline SL (sodium stearoyl lactylate)  Capmul S12L (sodium
Réaction entre l'acide L-glutamique et les acides gras de noix de coco	Glutamates : Amisoft CK 11 (potassium cocoyl glutamate)

Le 16 septembre 2016, et depuis le 1<sup>er</sup> janvier 2016, les ventes de tensioactifs dans le monde représentent plus de 8 milliards de dollars. Elles représentent plus de 12 millions de tonnes par an dans le monde, et leur marché devrait croître de 2,7% entre 2012 et

2017 (source : <http://www.planetoscope.com/hygiene-beaute/1706-ventes-mondiales-de-tensioactifs.html>).

En France, la part de marché des agro-tensioactifs représentait 25 à 30% en 2012, soit 120 000 tonnes. Pour être considéré comme étant d'origine naturelle, les surfactants doivent contenir au moins 50% de matériaux d'origine renouvelable ou durable, et leurs modifications chimiques doivent respecter les principes de la chimie verte (faible toxicité environnementale, réduction de l'énergie consommée, faible consommation de CO<sub>2</sub>) (Mills, 2012). Les agro-tensioactifs sont majoritairement employés dans les domaines de la détergence ménagère, et des cosmétiques. Ce dernier marché représentait 35 000 tonnes par en en France en 2012.

Selon le rapport de l'ADEME de 2015 concernant le marché actuel des produits biosourcés et leurs évolutions aux horizons 2020 et 2030, le taux de pénétration des produits biosourcés dans le marché français des cosmétiques est supérieur à 25%.

L'un des défis majeurs aujourd'hui dans l'industrie cosmétique est de trouver de nouvelles sources d'émulsifiants naturels, capables de remplacer les émulsifiants synthétiques conventionnels.

Les émulsifiants retrouvés sur la base de données COSMOS appartiennent aux classes suivantes :

- dérivés d'acides gras végétaux
- polysaccharides et dérivés de gommes végétales
- bétaïnes
- polysaccharides et dérivés d'acides gras
- polysaccharides et alcools gras
- esters de polyglycérol
- phospholipides
- autres origines

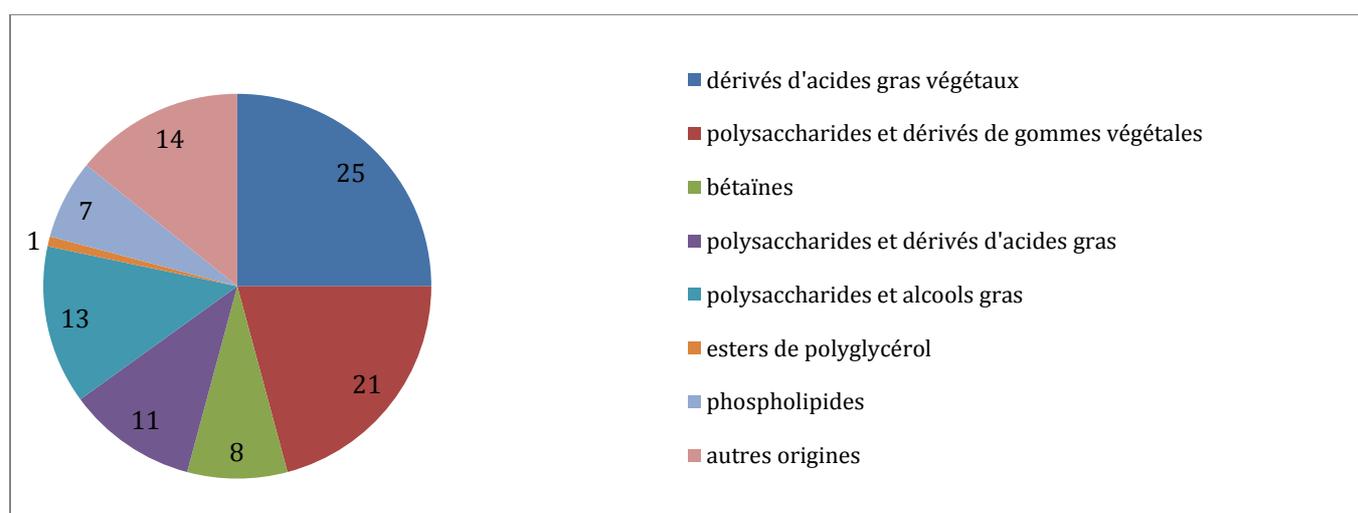


Figure 3 : Origines des émulsifiants retrouvés sur la base de données COSMOS (2013)

Source : base de données COSMOS (2013)

Le tableau suivant regroupe les différentes catégories d'émulsifiants selon leurs compositions, associées à quelques exemples.

**Tableau 6 : Origines végétales et noms INCI d'émulsifiants**

Catégorie	Nom INCI (international nomenclature of cosmetic ingredients)	Origine
Dérivés d'acides gras végétaux	Sulfated castor oil Hydrogenated coconut oil Hydrogenated peanut oil Hydrogenated palm oil	Huile de ricin Huile de noix de coco Huile de cacahuète Huile de palme
Dérivés de gommes végétales	Acacia senegal gum Guar gum  Gellan gum  Rhizobian gum (and) sodium hyaluronate Caesalpinia spinosa gum Ceratonia siliqua seed extract (locus bean gum) Xanthan gum	Acacia Graines de cyamopse à quatre ailes (légumineuse) Origine microbienne (pseudomonas elodea) Origine microbienne (bactérie du sol) Arbuste péruvien Caroube  Origine bactérienne (Xanthomonas campestris)
Bétaïnes	Coco bétaïne Lauryl bétaïne Cocoamidopropyl bétaïne	Huile de noix de coco  Huile de noix de coco
Polysaccharides et dérivés d'acides gras		
Polysaccharides et alcools gras	Cethyl alcool	Huile de noix de coco
Ester de polyglycerol	Polyglyceryl-4-cocoate	Huile de noix de coco
Phospholipides	Phospholipids	Lécithine de soja

#### **I.1.4 Polymères et molécules naturelles aux propriétés émulsifiantes**

Les polymères peuvent être définis comme des macromolécules constituées de l'enchaînement covalent d'unités répétées, dérivant d'un ou de plusieurs monomères. Ils sont largement utilisés dans le domaine de la cosmétique du fait de leur disponibilité. En effet, ils sont largement retrouvés dans la nature, sous forme de protéines (répétition d'acides aminés) ou de polysaccharides (répétition d'unités osidiques). Ils possèdent également une grande tolérance cutanée. Les polymères naturels et synthétiques peuvent être employés comme agents épaississants, agents filmogènes, et humectants.

Les polymères synthétiques peuvent être pétro-sourcés, comme les acryl-polymères ou vinyls-polymères. D'autres peuvent être d'origine biologique, comme les polyamides ou les polycaprolactones.

##### **I.1.4.1 Les polysaccharides aux propriétés émulsifiantes**

Les polysaccharides sont des colloïdes rigides et hydrosolubles, qui ne sont pas considérés comme des émulsifiants en tant que tels (Garti, 1999), mais pouvant être valorisés pour leurs propriétés émulsifiantes.

Dans la mesure où ils n'abaissent pas la tension interfaciale, leur action est plus efficace en présence d'agents mouillants. Ils sont fréquemment employés comme colloïdes protecteurs ou agents épaississants, mais aussi comme agents filmogènes ou émoullients. Les gommes naturelles et les mucilages sont des colloïdes hydrophiles, qui gonflent en présence d'eau. Ils augmentent ainsi la viscosité de la phase continue, de sorte que les particules solides restent en suspension. Les phénomènes de coalescence, liés au rapprochement des gouttelettes, sont ainsi retardés (Prajapati et al., 2013).

Les polysaccharides étant des polymères naturels, ils sont biodégradables et biocompatibles. Leur utilisation est largement entérinée dans le domaine de la formulation cosmétique.

Le tableau suivant regroupe les différents polysaccharides employés dans le champ cosmétique ou médical comme stabilisants d'émulsions, émulsifiants ou épaississants.

Tableau 7 : Applications pharmaceutiques de gommés naturelles, adapté de (Prajapati et al., 2013)

Polymère	Structure	Origine	Utilisation dans les produits cosmétiques Mode d'action	Référence
Agar	Polymère de galactose avec groupements sulfate	Algue rouge ( <i>Gelidium amansii</i> )	Agent de consistance et de liaison	(Lyons et al., 2006)
Carraghénanes	Enchaînement de D-Galactopyranose	Algue rouge	Stabilisant dans les émulsions et les suspensions	(Bani-Jaber and Al-Ghazawi, 2005)
Gomme de guar	Galactomannanes (polymères de manose et galactose)	Cyamopse à quatre ailes ( <i>Cyamopsis tetragonoloba (L.) Taub.</i> ) : légumineuse	Emulsifiant, épaississant	(Al-Saidan et al., 2005)
Gomme d'acacia	Hétéropolyosides chargés de type arabinogalactanes-protéines	Acacia	Emulsifiant, émollient	(Beneke et al., 2009)
Gomme de ghatti	Polysaccharide de poids moléculaire élevé produisant par hydrolyse arabinose, galactose, manose, xylose et acide glucuronique	<i>Anogeissus latifolia</i> : arbre originaire d'Inde, Népal, Sri Lanka, et Birmanie	Emulsifiant, émollient	(Jain and Dixit, 1988)
Gomme de tragacathe	Mélange de polysaccharides, en majorité trangacanthine et acide tragacanthique	Obtenue à partir de la sève mucilagineuse séchée de plantes du genre <i>Astragalus</i> (Sud Est de l'Europe, Sud Ouest de l'Asie)	Emulsifiant, émollient	(Rowe et al., 2009)
Gomme de karaya	Polyoside composé de galactose, de rhamnose et d'acide galacturonique principalement, et d'une	Exsudât des branches du <i>Sterculia</i> , arbre originaire d'Inde	Emulsifiant	(Rathi et al., 2013)

	petite quantité d'acide glucuronique			
Polysaccharide de graine de tamarinier	Polysaccharide TS		Emulsifiant	(Datta and Bandyopadhyay, 2006)
Gomme xanthane	Polyoside ramifié de glucose, mannose, acide glucuronique et acide pyruvique	Obtenue à partir de l'action de la bactérie <i>Xanthomonas campestris</i>	Emulsifiant	(Santos et al., 2005)

### I.1.4.2 Les protéines aux propriétés émulsifiantes

Les protéines sont largement utilisées dans l'industrie agroalimentaire pour leurs rôles de surfactants macromoléculaires dans les émulsions ou les mousses.

Elles possèdent des propriétés d'activité de surface, moindres par rapport à des petites molécules telles que les lécithines ou les monoacyls glycérols. Elles contiennent des groupes hydrophiles et hydrophobes, dus aux structures des acides aminés qui les composent, mais ne sont pas constituées d'une tête hydrophile associée à une queue hydrophobe, comme le sont les tensioactifs. De ce fait, lorsqu'elles s'adsorbent à l'interface huile/eau, seules des petites parties des groupes hydrophobes peuvent être adsorbées, le reste de la protéine est dans la phase aqueuse. Plus les protéines sont hydrophobes, plus elles sont capables de s'adsorber à l'interface, diminuant ainsi la tension interfaciale et stabilisant ainsi l'émulsion. En outre, les protéines globulaires présentent des propriétés de stabilisation des émulsions plus importantes que les protéines fibreuses.

Dans le domaine cosmétique, les protéines sont largement utilisées du fait de leur importante capacité à retenir l'eau, ce qui les rend capable de maintenir un bon état d'hydratation cutané et capillaire.

Tableau 8 : Exemples d'utilisations de fractions protéiques en formulation (Secchi, 2008; Teglia et al., 1993)

	Exemple	Fonction	Utilisation
Isolats protéiques	Collagène/Elastine/Soie/Blé hydrolysés	Humectant, filmogène	0,2-5 % dans les crèmes et lotions
Protéines très hydrosolubles	Collagène, serum albumine	Humectant, protecteur	0,01-0,1 % dans les crèmes et les lotions
Gélatine	Gélatine	Epaississant, filmogène, stabilise les émulsions	1-2 % dans les émulsions
Condensats protéiques	Potassium cocoyl hydrolyzed collagen	Co-émulsifiant	0,5-2 % dans les émulsions H/E
Protéines insolubles	Poudre de soie, kératine/élastine insolubles	Absorbent l'huile, agent de cohésion	1-5 % dans les préparations de maquillage poudrées

Les protéines de soja présentent l'avantage d'avoir des propriétés gélifiantes et émulsifiantes. Les protéines de pois sont très disponibles (hautes teneurs en protéines dans les pois), et leurs profils d'acides aminés sont très équilibrés, ce qui les rend intéressantes pour les formulations cosmétiques. C'est également une alternative intéressante aux protéines de soja, controversées du fait de leur origine OGM.

Des travaux font état de l'amélioration des propriétés émulsifiantes des isolats protéiques de cacahuètes, via des traitements par ultrasons (Zhang et al., 2014). Ces traitements permettent de diminuer la taille des particules de 474 à 255 nm, sans pour autant en

diminuer la masse moléculaire. Les traitements par ultrasons modifient la structure ternaire des protéines. Les propriétés émulsifiantes sont évaluées via les calculs de l'EAI (index de l'activité émulsifiante) et de l'ESI (index de la stabilité de l'émulsion). La valeur la plus faible de l'EAI est obtenue avec l'extrait protéique natif, et celle-ci augmente significativement par une minute de traitement aux ultrasons. Une durée supérieure de traitement n'a pas d'effet significatif sur cette caractéristique. Concernant la puissance des ultrasons appliqués, ceux-ci doivent être supérieurs à 600 W pour que l'augmentation de l'EAI soit notable. D'autre part, une augmentation de la température du milieu dans lequel sont appliqués les ultrasons permet également d'augmenter les valeurs de l'EAI et de l'ESI.

Les propriétés émulsifiantes des protéines sont liées à leur solubilité, leur charge de surface, leur hydrophobicité ainsi qu'à leur flexibilité. D'autres travaux (Krešić et al., 2008) rapportent que les ultrasons peuvent également modifier les propriétés fonctionnelles des protéines de lait, en impliquant des modifications de la structure secondaire de celles-ci. Les effets des ultrasons sont liés à une combinaison d'effets thermiques, mécaniques et chimiques. Cependant, il faut prêter attention aux températures employées, qui, lorsqu'elles sont trop élevées, peuvent affecter les propriétés émulsifiantes en modifiant la taille des particules, leur structure secondaire, ainsi que l'hydrophobicité de surface des protéines. Les protéines peuvent ainsi se déformer, ce qui interrompt les interactions hydrophobes et la formation des ponts disulfure. La dénaturation des protéines via les ultrasons est due aux modifications extrêmes de température et de pression qu'ils impliquent.

D'autres travaux rapportent le lien entre le pH et l'activité émulsifiante des isolats protéiques de pois (Liang and Tang, 2013). Les protéines de pois sont majoritairement constituées de protéines de stockage, des globulines 11S et 7S, la vituline et la légumine. Elles représentent 65 à 80% de la fraction protéique extractible. Le pH acide appliqué au milieu émulsifié favorise la formation de l'émulsion : tailles de gouttes plus homogène, meilleure résistance au crémage.

#### **1.1.4.3 Complexes de protéines et de polysaccharides comme émulsifiants**

La gomme arabique doit ses propriétés de stabilisation d'émulsions et de formation de films à la présence au sein de sa structure de 2% de protéines, liées par des liaisons covalentes à l'hydrocolloïde. Les protéines permettent la formation d'émulsions, et peuvent également être employées en tant qu'agents stabilisants. Les polysaccharides sont des agents épaississants, qui possèdent la propriété de retenir l'eau. Des liaisons covalentes entre les protéines et les polysaccharides peuvent être formées de manière synthétique, sans pour autant employer des solvants indésirables. Il est par exemple possible de lier des protéines à du propylène glycol alginate à pH basique, ou encore de

lier des protéines au dextrane par réaction de Maillard, sous des conditions de chauffage lent.

Dans certains cas, les interactions entre les protéines et les polysaccharides sont faibles, il n'y a pas réellement de formation de complexe, ou la durée de vie du complexe est inférieure à la durée de vie de l'émulsion.

La stabilisation de l'émulsion peut être due à un épaississement et une gélification liée aux polysaccharides, qui sont les plus efficaces, à de faibles concentrations, pour donner une viscosité élevée aux milieux. Dans l'industrie agro-alimentaire, la gomme xanthane ou la gomme de guar sont fréquemment ajoutés aux émulsions pour les épaissir.

Une concentration en polysaccharides élevée est le facteur déterminant pour augmenter la viscosité de la phase continue de l'émulsion, et limiter ainsi le mouvement des gouttelettes.

Cependant, l'ajout de xanthane dans une émulsion contenant 10% d'huile minérale et stabilisée par des caséinates de sodium a démontré que la gomme xanthane, lorsqu'elle est présente à des concentrations inférieures à 0,125% en masse, engendrait des phénomènes de séparation de phase, qui n'ont pas lieu en son absence. En dessous d'un certain seuil, la rhéologie de la phase continue ne peut pas empêcher le déplacement des gouttelettes, induit par la floculation provoquée par le polysaccharide non adsorbant. L'incompatibilité thermodynamique entre les polysaccharides en solution aqueuse et les protéines adsorbées à la surface des gouttelettes de l'émulsion provoque la séparation rapide entre une phase appauvrie en polymère, dense et crémeuse, et une seconde phase riche en polymères. En revanche, l'inhibition des phénomènes de crémage avec des concentrations en xanthane élevées, est liée à l'immobilisation des gouttes d'huile dans un réseau gélifié.

La déstabilisation des émulsions par des polymères hydrosolubles est un phénomène général, pouvant avoir lieu à des concentrations élevées (de l'ordre de quelques pourcents) avec des polymères non épaississants tels que le dextrane.

Les interactions fortes entre les protéines et les polysaccharides, telles que les interactions électrostatiques et les liaisons covalentes peuvent donner lieu à des complexes protéine-polysaccharide résistants. La nature des interactions électrostatiques varie d'une protéine à l'autre (Dickinson, 1994, 2009).

#### **I.1.4.4 Autres molécules**

- Les phospholipides

Les phospholipides sont contenus, en faible quantité, dans la plupart des huiles végétales. Ce sont des composés amphiphiles, composés de deux queues hydrophobes (ou aliphatiques) d'acides gras, et d'une tête hydrophile contenant des groupements

phosphate chargés négativement. Dans la plupart des cas, la tête polaire est un dérivé du glycérol (glycérol-3-phosphate), estérifié par une tête polaire. Les phosphoglycérides les plus répandus sont la phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylcholine. Les autres phospholipides dérivent de la sphingosine et non du glycérol, ce sont les sphingomyélines.

Une fois dans l'eau, ils forment des liposomes dont la forme dépend des propriétés physiques de leurs têtes polaires. Ils peuvent être mono ou bi-couches, avec une structure plane, cylindrique, ou sphérique. Lorsqu'ils se rassemblent sous forme de monocouches, ils sont appelés micelles.

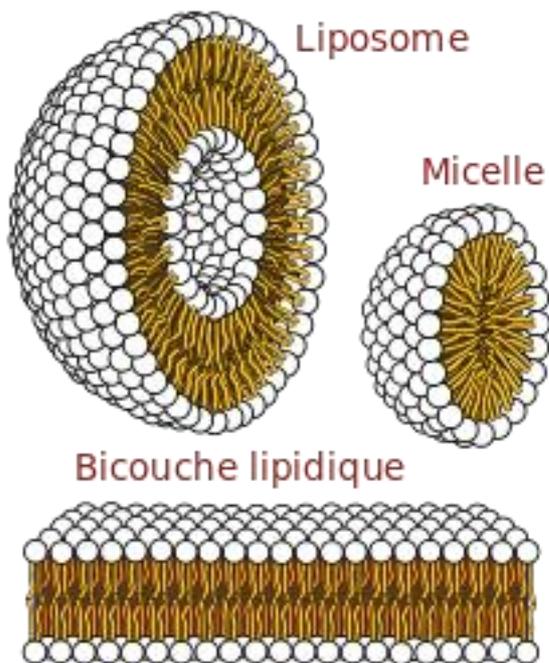


Figure 4 : Structure d'un liposome, d'une micelle et d'une bicouche lipidique

Certains phospholipides, les lécithines, peuvent être extraits de produits naturels tels que les œufs, le soja, le blé ou l'avoine. Ils sont peu chers et très disponibles mais doivent être purifiés avant leur utilisation. Ils sont largement utilisés dans le domaine pharmaceutique, pour la formation de liposomes. En cosmétique, ils sont intéressants du fait de leur biocompatibilité et biodégradabilité. (Garti, 1999; Nii and Ishii, 2004)

- Les saponines

Plus de mille saponines sont retrouvées dans les plantes. Ce sont des hétérosides, composés d'une partie hydrophile, liée à un dérivé de triterpène hydrophobe. Cette structure amphiphile leur confère des propriétés surfactantes.

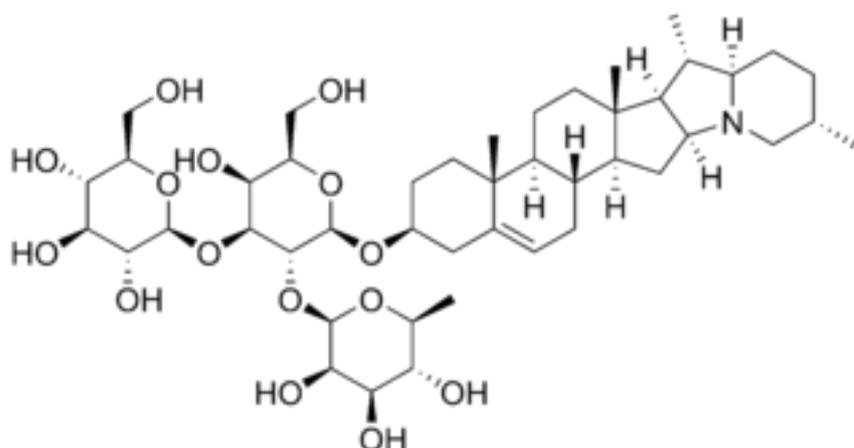


Figure 5 : Structure de la solanine, une saponine

Ils peuvent être classés en trois catégories :

- triterpènes glycosides
- stéroïdes glycosides
- glycoside alkaloïde stéroïde

Selon les sources dont elles proviennent, les saponines peuvent présenter des propriétés complémentaires :

Tableau 9 : Exemples de sources naturelles de saponines

Plante	Propriétés additionnelles des saponines
<i>Sapindus mukurossi</i> (arbre à savon, Inde)	Anti-irritantes Anti-microbiennes Anti-fongiques
<i>Yucca schidigera</i> (yuka, Mexique et désert de Mohave-Etats-Unis)	
<i>Quillaja saponaria</i> (arbuste, Chili)	Prévention contre l'acné

Les saponines commercialisées pour des applications cosmétiques sont promues comme remplaçantes naturelles des tensioactifs SLS (sodium laureth sulfate) controversés car irritants.

Il existe un produit commercial, le Phytofoam, commercialisé par la société Croda (Etats Unis). Il est constitué d'extraits de trois plantes : *Acacia concina* (Inde), dattier du désert (Afrique) et *Gypsophila paniculata* (Europe centrale et de l'est). Cet additif améliore le volume, la texture et la stabilité des mousses, et possède également des propriétés détergentes. Il peut ainsi être utilisé dans de nombreuses formulations moussantes, telles que les gels lavants, les démaquillants, les gels douche, les gommages et les bains moussants.

Cependant malgré leurs avantages, les saponines sont jusqu'à maintenant rarement employées dans les formulations cosmétiques du fait de leur coût, mais également du fait de la couleur et de l'odeur qu'elles induisent dans les produits obtenus. (Yang and McClements, 2013)

### I.1.5 Emulsions stabilisées par des particules solides

Appelées émulsions de Pickering, ces émulsions peuvent être huile dans eau, eau dans huile ou des émulsions multiples. Elles ont pour particularité d'être stabilisées par des particules solides colloïdales telles que l'argile ou la silice, qui sont utilisées alors comme des alternatives aux surfactants traditionnels. Ces particules solides ont des tailles nanométriques ou submicroniques, et s'accumulent à l'interface entre les deux phases de l'émulsion, formant ainsi une barrière physique qui prévient les phénomènes de coalescence. Leur efficacité provient du fait qu'ils ne sont solubles dans aucune des deux phases constituant l'émulsion. Ces particules solides sont parfois appelées « raidisseurs d'interface » (Bon and Colver, 2007).

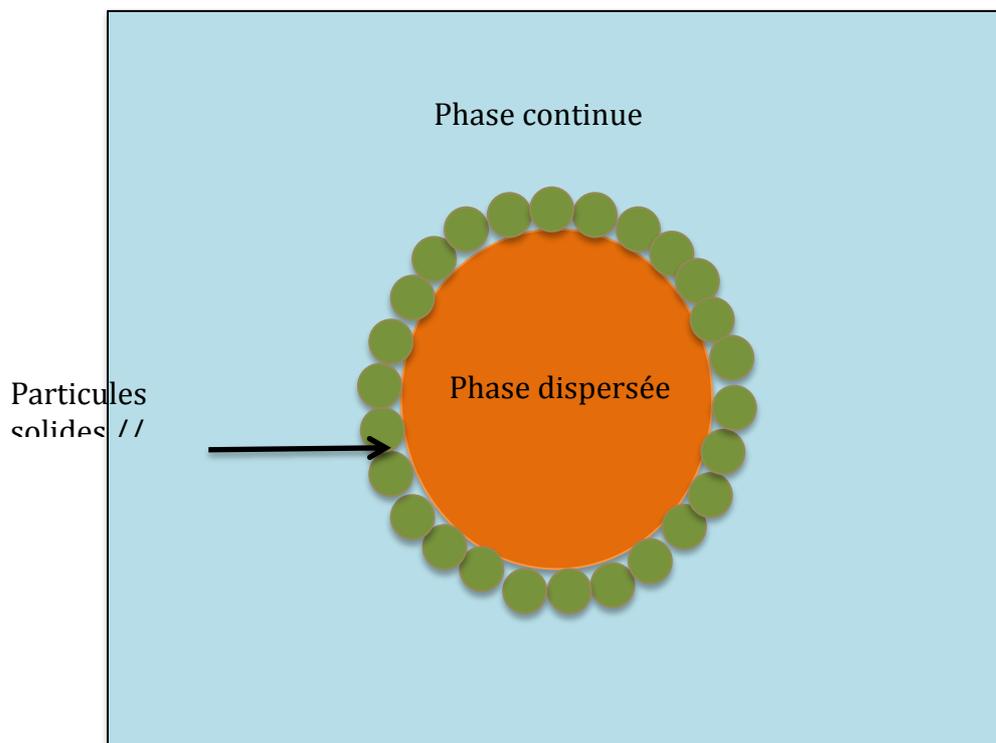


Figure 6 : Représentation schématique des particules à l'interface dans une émulsion de Pickering

Dans le cas des particules solides, le facteur permettant de déterminer la future stabilité des émulsions est la mouillabilité des particules : la meilleure stabilité des émulsions huile dans eau est obtenue avec des particules ayant un angle de contact compris entre 70 et 86°. Pour les émulsions eau dans huile, l'angle de goutte doit être compris entre 94 et 110° (Chevalier and Bolzinger, 2013).

Pour des applications dans l'industrie pharmaceutique, les émulsions de Pickering présentent deux avantages majeurs : leur haute stabilité et la spécificité des propriétés interfaciales.

Les émulsions de Pickering sont plus particulièrement utilisées pour la formulation d'émulsions multiples, dont la stabilité est faible en utilisant des tensioactifs conventionnels. Ces émulsions multiples peuvent être formulées pour des lotions, afin

d'éviter leur aspect huileux, mais également pour permettre la libération d'un actif au sein d'une crème (Frelichowska et al., 2009).

Les particules solides stabilisent les émulsions en formant des coques autour des gouttelettes de la phase dispersée. Cela permet également d'encapsuler l'ingrédient actif et d'en contrôler la libération.

Les particules solides permettent de former des gouttelettes de diamètre supérieur à celui des gouttelettes formées avec des émulsifiants classiques, ces diamètres pouvant aller jusqu'à quelques millimètres. Cela peut laisser envisager des valorisations en tant que matériau encapsulant pour des actifs sensibles.

D'autre part, les particules solides permettent d'améliorer la texture et la résistance aux UV des émulsions formulées.

Les substances utilisées sont généralement d'origine minérale, comme le talc ou la kaolinite. Récemment, des travaux ont permis de développer des particules fonctionnalisées afin de les rendre amphiphiles, ce qui leur permet de mieux s'ancrer aux interfaces (Laredj-Bourezg et al., 2012).

#### **I.1.6 Applications industrielles de nouveaux émulsifiants : exemples de brevets**

Le tableau suivant regroupe des exemples de brevet déposés par des industries. La plupart d'entre eux décrivent l'emploi de composés d'origine naturelle, mais certains décrivent l'emploi de particules solides, voire décrivent des procédés physiques d'émulsification. Les exemples ont été choisis selon leur diversité.

Tableau 10 : Exemples de brevets autour de nouveaux émulsifiants

Nom du brevet Date de publication Numéro Société	Principe
Emulsions stables obtenues à partir d'un émulsionnant naturel stabilisé avec du jus d'aloë vera 1980 80 16469 L'Oréal	L'émulsifiant naturel utilisé est la lécithine ou la saponine, combinée à du jus d'aloë vera, comme agent stabilisant pour obtenir des émulsions lisses et stables
Method for the preparation of cream 1995 EP 0 667 767 Phares pharmaceutical research	Utilisation d'une composition émulsifiante comprenant une membrane lipidique, un composé amphiphile n'étant pas un émulsifiant et éventuellement un milieu hydrophile, pour la formation d'émulsions huile dans eau,
Stable oil in water emulsion, fabrication process and use in cosmetics and dermatologic field 1998 0 864 320 A1 L'oréal Paris	Emulsions sans surfactants Utilisation de particules ioniques polymériques (anioniques ou cationiques) pour obtenir des émulsions fines et stables (taille des gouttelettes < 500 nm). Les particules ioniques polymériques peuvent être un co-polymère d'acide isophtalique ou d'acide sulfoisophtalique. La taille des particules est comprise entre 10 et 400 nm. 1-2% en masse de particules ioniques au sein de l'émulsion
Utilisation de galactomannanes comme agent émulsifiant 1999 99 129 03 Rhodia Chimie	Les galactomannanes sont des polysaccharides végétaux pouvant agir comme agent de texture et ayant des propriétés viscosantes, épaississantes et stabilisantes, pour les domaines de la formulation, de l'agro-alimentaire et de l'industrie cosmétique. Exemples : gomme de guar, caroube, ..

<p>Stable oil in water emulsions with unmodified hydrophilic silica particles 2008 08 50154 Université Claude Bernard Lyon 1</p>	<p>L'agent émulsifiant est remplacé par des particules de silice non modifiées</p>
<p>Preparation, in particular cosmetic preparation, process for the production thereof, and use thereof 2009 US 2009/0196842 Schwan Stabilo Cosmetics GMBH &amp; Co</p>	<p>Combinaison d'un émulsifiant synthétique et d'une cire naturelle</p>
<p>Fabrication process of a stable oil in water emulsion 2009 09 54 323 SAS Genialis</p>	<p>Sans ajout d'émulsifiant, mélange des phases grasses et aqueuses dans un récipient fermé sous une haute énergie vibratoire permettant d'obtenir émulsion stable, taille des gouttelettes du <math>\mu\text{m}</math> au nm Exemples d'huiles végétales : avocat, argan Emulsions stables plusieurs mois à T° ambiante</p>
<p>Composition cosmétique émulsifiante, préparation et usage 2008 08 52439 Lucas Meyer</p>	<p>Combinaison de trois composants d'origine végétale : Lécithine de tournesol, Emulsifiant anionique d'origine végétale, sélectionné à partir d'esters de glycéryl stéarate citrate Emulsifiant cationique d'origine végétale sélectionné à partir d'esters de polyglycérol</p>
<p>Utilisation cosmétique d'émulsifiants naturels 2010 WO 2010/055533 A1 B&amp;T Company (Italy)</p>	<p>Utilisés particulièrement pour les crèmes solaires dans lesquelles les émulsifiants synthétiques affectent l'efficacité L'émulsifiant naturel utilisé est l'huile d'olive transestérifiée avec de l'alcool cétéarylique et/ou du sorbitol</p>

## I.1.7 Caractérisations des émulsions et de leur stabilité

### I.1.7.1 Type d'émulsion

Lorsque la phase dispersée est la phase huileuse, l'émulsion est une émulsion directe, Huile dans Eau, notée H/E. Dans le cas contraire, quand la phase aqueuse est dispersée au sein de la phase grasse, l'émulsion est inverse, de type Eau dans Huile, notée H/E.

Il existe également des émulsions beaucoup plus complexes, au sein desquelles l'émulsion est elle-même dispersée dans une autre phase continue. Il est ainsi possible de formuler des émulsions huile dans eau dans huile (H/E/H) ou eau dans huile dans eau (E/H/E).

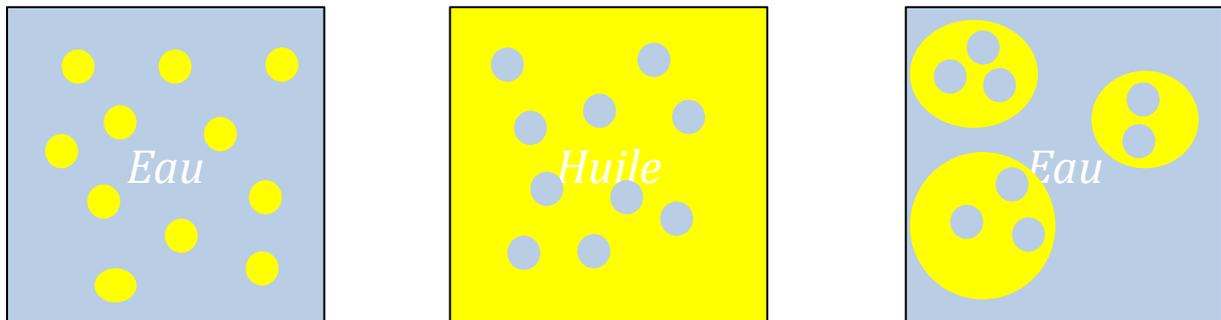


Figure 7 : Représentations schématiques de différents types d'émulsion H/E, E/H et E/H/E

### I.1.7.2 Stabilité d'une émulsion

A l'exception des microémulsions, les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables.

Il existe plusieurs phénomènes de déstabilisation liés à la migration des gouttelettes, à des modifications de leur taille, à l'inversion des phases ou encore à des instabilités chimiques ou biochimiques (Doumeix, 2011).

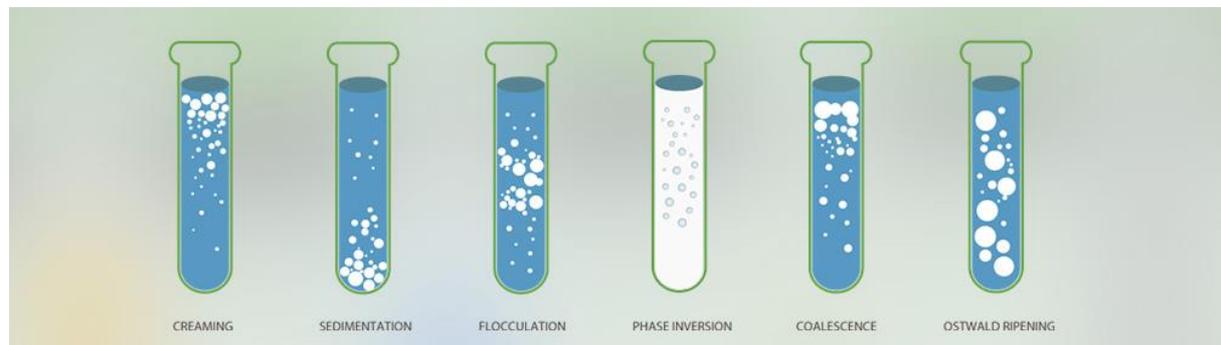


Figure 8 : Déstabilisation des émulsions (source Lum France)

- Les phénomènes liés à la migration des gouttelettes sont liés à la floculation ou à la sédimentation et au crémage.

- Lors de la floculation, les gouttelettes formant la phase dispersée se rapprochent pour former des particules plus grosses. Ce phénomène est lié à la valeur du potentiel zéta. Celui-ci correspond à la charge électrique qu'une particule acquiert en solution grâce aux ions qui l'entourent. Plus le potentiel zéta est négatif, plus les particules se repoussent, ralentissant ainsi les phénomènes de floculation. Ce phénomène peut ou non être réversible. D'autre part, une émulsion floculée peut rester stable longtemps si la tension interfaciale des gouttelettes reste faible. L'épaississement de la phase continue ou l'augmentation de sa viscosité est un bon moyen de limiter les phénomènes de floculation.
- Le crémage et la sédimentation sont des phénomènes réversibles, l'agitation de l'émulsion permettant de la faire revenir à son état initial. Ces phénomènes sont la conséquence de la différence de gravité entre les deux phases : la phase la plus dense se concentre en bas du contenant tandis que la phase la moins dense se concentre au dessus de la précédente. Deux paramètres sont à prendre en compte pour anticiper ce phénomène : la taille des gouttelettes et la viscosité de la phase continue.
- Les phénomènes liés à la modification de la taille des gouttelettes sont la coalescence et le mûrissement d'Ostwald.
  - Au cours de la coalescence, deux gouttelettes se rassemblent pour n'en former qu'une. C'est un phénomène irréversible. La répétition du phénomène de coalescence aboutit à la rupture de phase, au cours de laquelle les deux phases constitutives de l'émulsion se séparent.
  - Lors du mûrissement d'Ostwald, les gouttelettes de plus petite taille migrent à travers la phase continue vers les gouttelettes les plus grosses, augmentant ainsi la granulométrie de l'émulsion. Ce phénomène est lié à la formulation employant des dispositifs tels que le rotor-stator ou l'homogénéisateur haute pression, qui ne permettent pas d'obtenir une population de gouttelettes homogènes en taille.
- L'inversion de phase correspond à une inversion de sens d'une émulsion, par exemple le passage d'une émulsion huile dans eau à une émulsion eau dans huile. Ce phénomène peut avoir lieu de manière contrôlée dans l'industrie, mais également apparaître spontanément lors de la préparation ou du stockage du produit. L'augmentation de concentration de la phase dispersée sous agitation maintenue peut donner lieu à une inversion de phase.
- L'instabilité chimique et biochimique est liée à la présence de lipides ou de biopolymères au sein de l'émulsion. L'oxydation et le rancissement des huiles végétales entraîne des modifications d'odeur et de goût, qui causent des problèmes dans les domaines de l'agroalimentaire et de la cosmétique. Des composés issus de l'oxydation des lipides peuvent être libérés, et interagir avec la membrane interfaciale, favorisant ainsi les phénomènes de coalescence. Les biopolymères tels

que les polysaccharides et les protéines peuvent également subir des hydrolyses. Les sucres sont un milieu favorisant fortement la croissance bactérienne.

### I.1.7.3 Concentration d'une émulsion

La concentration d'une émulsion peut être calculée par la fraction volumique de phase dispersée  $\phi$ , ou taux de rétention (Doumeix, 2011) :

$$\phi = \frac{V_D}{V_D + V_C}$$

*V<sub>D</sub> est le volume de la phase dispersée*

*V<sub>C</sub> est le volume de la phase continue*

Ce paramètre influe sur la stabilité de l'émulsion, mais également sur sa fabrication et sur ses propriétés.

Une émulsion diluée a une valeur de fraction volumique de phase dispersée  $< 0,02$ , pour une émulsion concentrée cette valeur est comprise entre 0,3 et 0,74 et elle est supérieure à 0,74 pour une émulsion très concentrée.

Les gouttelettes d'une émulsion concentrée voire très concentrée ont plus d'interactions entre elles que les gouttelettes d'une émulsion diluée dans laquelle les interactions répulsives ou attractives entre les gouttelettes sont quasiment nulles.

### I.1.7.4 Conductivité d'une émulsion

La mesure de la conductivité est la méthode la plus simple pour déterminer le type d'émulsion. En effet, la phase aqueuse est en principe chargée en électrolytes, et est donc caractérisée par une conductivité élevée (de l'ordre du mS/cm), alors que la phase grasse, de part sa nature apolaire, a une conductivité très faible (de l'ordre du  $\mu$ S/cm). Ainsi, une émulsion huile dans eau est conductrice et a une conductivité élevée, tandis que la phase continue d'une émulsion eau dans huile est isolante, et l'émulsion a une conductivité quasiment nulle (Salager et al., 1982). (Amid and Mirhosseini, 2012; Kato et al., 1985; Suttiprasit et al., 1993)

La figure ci dessous montre la variation de la conductivité d'une émulsion lors de l'ajout de sels ou de tensioactifs qui entraînent une inversion de phase (Nielloud, 2000). Sur les graphes, les conductivités proches de 0 sont attribuées à des émulsions eau dans huile, tandis que les conductivités supérieures à 5 mS/cm correspondent à des émulsions huile dans eau.

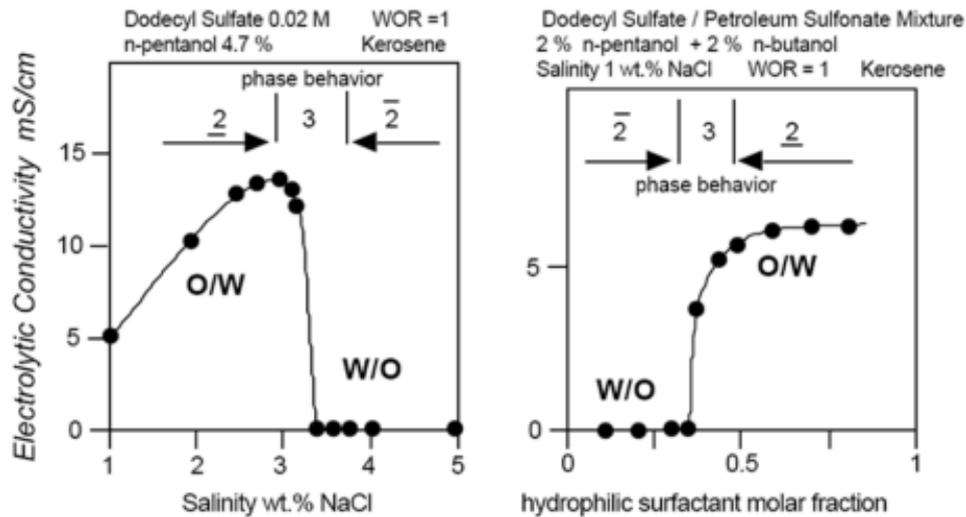


Figure 9 : Variation de la conductivité d'une émulsion lors de l'ajout de sels ou de tensioactifs

#### I.1.7.5 Microscopie optique

La microscopie optique permet de mesurer non seulement la taille des gouttelettes, mais elle permet également d'évaluer les phénomènes de coalescence présents au sein de l'émulsion.

La mesure de la taille des gouttelettes permet également de classer les émulsions en fonction de la taille de leurs gouttelettes :

- les microémulsions sont caractérisées par des gouttelettes de tailles comprises entre 0,01 et 0,2  $\mu\text{m}$ . Ce sont les seules émulsions à être thermodynamiquement stables. Elles ont pour particularité d'être transparentes car la taille des particules est inférieure à 25 % de la longueur d'onde de la lumière visible.
- Les mini-émulsions, ou nano-émulsions, ont des tailles de gouttelettes de l'ordre de 100 nm. Elles doivent être formulées par des procédés différents des procédés d'agitation mécanique
- Les macro-émulsions sont les émulsions pour lesquelles la taille des gouttes est supérieure au micromètre, qui est la taille minimale des gouttelettes produites par agitation mécanique. La taille de leurs gouttelettes est comprise entre 0,5 et 500  $\mu\text{m}$ .

#### I.1.7.6 Granulométrie

La granulométrie correspond à la distribution de taille et au diamètre moyen des gouttelettes de la phase dispersée. La distribution granulométrique de l'émulsion peut

être mono-(diamètres rassemblés dans un pic unique) ou bi-modale. Une distribution resserrée donne lieu à une émulsion homogène ou monodisperse, dans le cas contraire l'émulsion est hétérogène ou polydisperse. La granulométrie des émulsions peut être déterminée par microscopie optique, en photographiant une fraction de l'émulsion puis en mesurant manuellement le diamètre des gouttelettes visibles. La granulométrie laser peut également être employée. Dans ce cas là, les gouttelettes diffractent la lumière émise par le granulomètre laser, et la réponse donnée est un histogramme correspondant à l'ensemble de la distribution.

#### **I.1.7.7 DSC et caractérisation des émulsions**

L'emploi de la calorimétrie différentielle à balayage pour la caractérisation des émulsions est basé sur les propriétés de solidification (cristallisation) des gouttes dispersées dans la phase continue. Son avantage notable par rapport à d'autres méthodes est l'absence de dilution de l'échantillon au préalable. Ceci permet d'en conserver les propriétés initiales mais également d'éviter de la déstabiliser.

Une des deux cellules d'analyse contient une certaine masse d'émulsion à analyser, l'autre, vide, est considéré comme référence. Un système de régulation de la température est mis en place afin d'imposer un balayage de température commun aux deux cellules.

Le thermogramme obtenu donne la chaleur libérée ou absorbée par l'échantillon en fonction de la température appliquée à l'échantillon. L'intégration de l'aire sous la courbe correspondant à la chaleur libérée ou absorbée par l'échantillon permet ainsi de déterminer l'énergie associée au phénomène, il s'agit de l'enthalpie, notée  $\Delta H$  (J/g).

L'analyse des signaux donnant les énergies et les températures de congélation/fusion permet de remonter aux propriétés de l'émulsion : taille des gouttelettes, émulsion stable ou non, ...

Pour une émulsion huile dans eau, la température de cristallisation de la phase aqueuse est comprise entre 0 et  $-25^{\circ}\text{C}$ , fréquemment autour de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Clause et al., 2005; Thanasukarn et al., 2004a).

De la nature de l'huile végétale dépend l'aspect de son signal (figure 9).

A titre d'exemple, l'huile de palme hydrogénée donne des signaux de cristallisation à des températures positives lorsqu'elle est sous forme libre (bulk), autour de  $20^{\circ}\text{C}$ . L'émulsification de l'huile diminue la température de cristallisation entre 5 et  $10^{\circ}\text{C}$ , et on observe également un pic autour de  $-15^{\circ}\text{C}$ . Ce dernier pic correspond à la cristallisation de l'eau présente dans l'émulsion. Lorsque l'émulsion a commencé à se déstabiliser, l'huile est sous deux formes : libre (« bulk ») et émulsifiée. Dans ce cas là, nous observons sur le thermogramme les trois pics de cristallisation précédemment décrits : le pic de l'huile émulsifiée situé autour de  $5^{\circ}\text{C}$ , un pic autour de  $20^{\circ}\text{C}$  correspondant à l'huile « bulk », et le pic de l'eau à  $-10^{\circ}\text{C}$ .

L'huile de tournesol présente des pics de cristallisation à des températures différentes de celle de l'huile de palme hydrogénée. Ils sont tous retrouvés à des températures négatives : l'huile sous forme de « bulk » cristallise autour de  $-55^{\circ}\text{C}$ , l'huile sous forme émulsifiée a une température légèrement supérieure, autour de  $-50^{\circ}\text{C}$ . Le pic de cristallisation de l'eau est toujours retrouvé à  $-15^{\circ}\text{C}$ . Lorsque l'huile est présente sous ses deux formes au sein du mélange analysé, le thermogramme présente les trois pics précédemment décrits (Cornacchia and Roos, 2011).

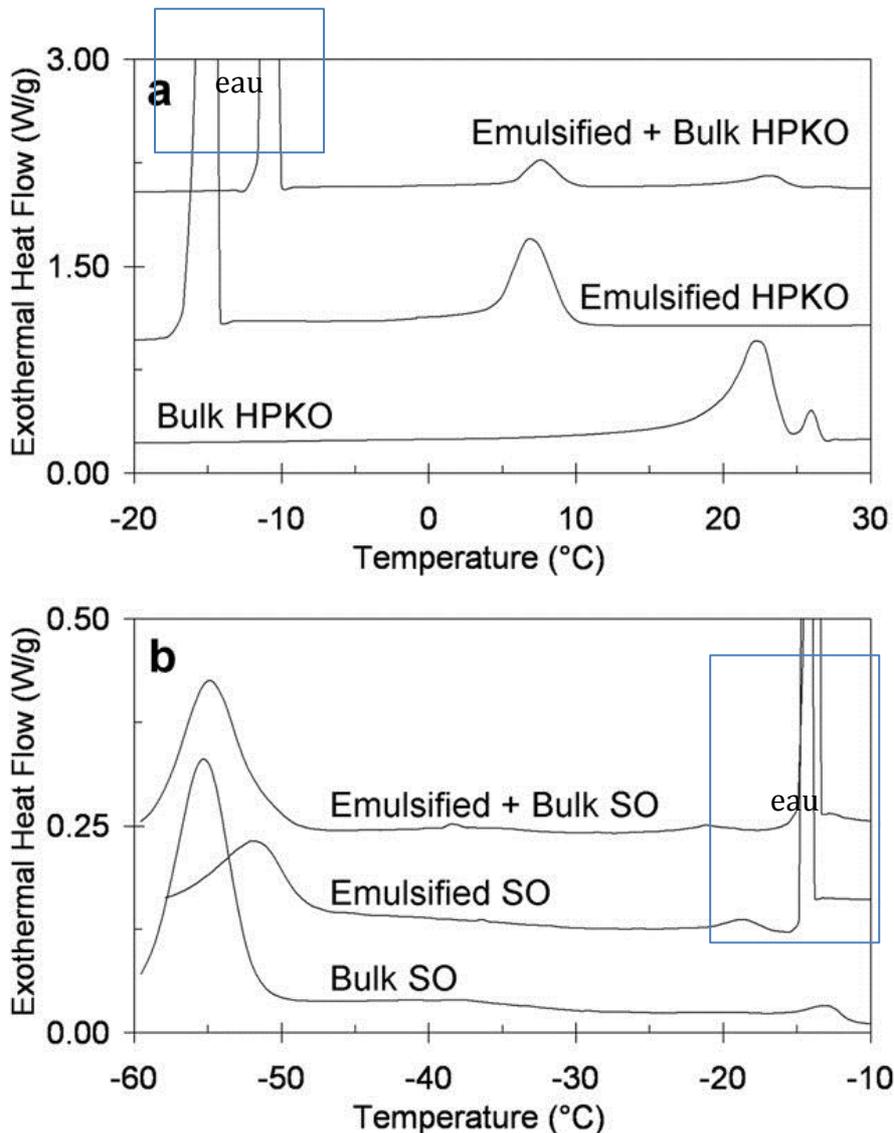
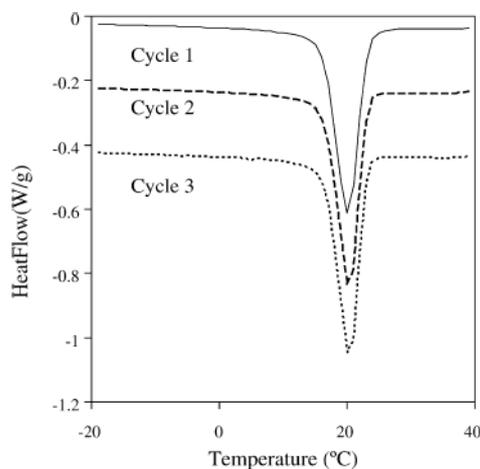


Figure 10 : Thermogrammes obtenus lors du refroidissement de l'huile de palme hydrogénée (HPKO) et de l'huile de tournesol (SO) (Cornacchia and Roos, 2011)

La différence de comportement des huiles s'explique par leurs compositions : l'huile de palme, composée à presque 50% d'acides gras saturés est sous forme solide à température ambiante. L'huile de tournesol ne comptant que 10% d'acides gras saturés dans son profil d'acides gras, elle est sous forme liquide à température ambiante. Le pic de cristallisation de l'huile de palme est donc présent à une température positive, tandis que l'huile de tournesol cristallise à une température inférieure à  $0^{\circ}\text{C}$ .

Quelle que soit la nature de l'huile, les analyses des huiles émulsifiées ou le mélange des huiles émulsifiées et « bulk » donnent des pics de cristallisation entre -10 et -20°C, qui correspondent à l'eau présente au sein de la phase aqueuse des émulsions.

Lorsque les cycles appliqués ne descendent pas au delà de -10°C, le thermogramme obtenu permet de visualiser préférentiellement la cristallisation de l'huile. Si la température descend jusqu'à -20°C, la cristallisation de la phase aqueuse peut également être visualisée. Cela a permis à P. Thanasukarn (Thanasukarn et al., 2004b) de déterminer une température de cristallisation de l'huile de palme à 21°C, et de l'eau à -17°C. La figure 10 ci après correspond aux histogrammes de cristallisation de l'huile de palme après trois cycles de refroidissement de +40 à -20°C. Dans tous les cas, l'huile de palme cristallise à 21°C. Les différents cycles appliqués n'ont pas d'effet sur la température de cristallisation de l'huile de palme.



**Figure 11 : Cristallisation de l'huile de palme après 3 cycles de refroidissement de + 40°C à -20°C successifs (d'après Thanasukarn et al., 2004b)**

Les analyses en DSC de leurs émulsions leur ont également permis de tester différents émulsifiants : tween 20 (surfactant non ionique de type polysorbate), caséine et isolat de lactosérum (WPI), et de démontrer que l'isolat de lactosérum présente les meilleures stabilisations émulsifiantes (figure11). En effet, c'est dans le cas où l'émulsion est stabilisée par la caséine que les thermogrammes de cristallisation de l'huile sont les plus proches les uns des autres. Lorsque le tween 20 est employé comme émulsifiant, la température de cristallisation de l'huile de palme augmente, passant de 5°C à 20°C, et se rapprochant ainsi de la température de cristallisation de l'huile de palme sous forme « bulk ». Le même phénomène est observé dans le cas où la caséine est employée comme émulsifiant.

En revanche, lorsque l'émulsifiant est l'isolat protéique de lactosérum, le pic correspondant à l'huile émulsifiée, présent autour de 5°C est présent lors des trois cycles de cristallisation. Des pics supplémentaires, se rapprochant de la température de cristallisation de l'huile sous forme de « bulk », mais les trois cycles ne permettent pas de déstabiliser suffisamment l'émulsion pour que la température de cristallisation de l'huile atteigne les 20°C.

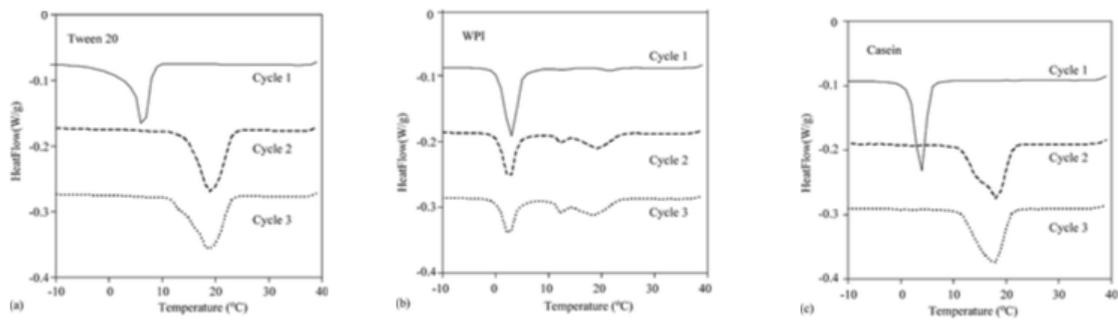


Figure 12 : Influence de la nature de l'émulsifiant sur la cristallisation de l'huile de palme en émulsion (d'après Thanasukarn et al., 2004b)

Leurs essais ont également permis de démontrer le fait qu'une température minimale de cycle supérieure à la température de cristallisation de l'eau (fin du cycle à  $-10^{\circ}\text{C}$  pour une température de cristallisation de l'eau aux alentours de  $-20^{\circ}\text{C}$ ) permet dans le cas où la température de cristallisation de l'huile est supérieure à celle de l'eau, d'éviter la déstabilisation de l'huile, comme le montre la figure 12 ci après : à gauche, la température de refroidissement est descendue à  $-10^{\circ}\text{C}$ , tandis qu'à droite elle est descendue jusqu'à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Lorsque la température est suffisamment basse pour permettre la cristallisation de l'eau, une déstabilisation de l'huile est observée. A l'inverse, lorsque la température de refroidissement n'atteint ne permet pas la cristallisation de l'eau, l'émulsion n'est pas déstabilisée et l'huile reste dans son état émulsifié.

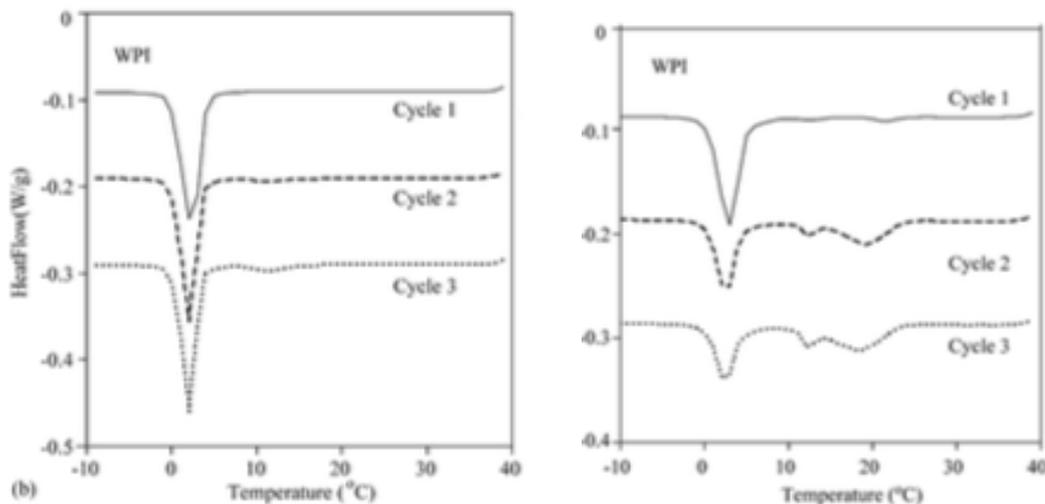


Figure 13 : Influence de la température de refroidissement sur la déstabilisation de l'émulsion

Ces mêmes auteurs ont également employé la DSC pour étudier l'influence de la présence de sucres ou de sels sur la stabilité de l'émulsion. La présence de sucres protège les émulsions de la déstabilisation, tandis que les sels la déstabilisent (Thanasukarn et al., 2004a).

La DSC a également été employée par (Cornacchia and Roos, 2011) pour démontrer un effet de stabilisation dû à l'ajout de sucrose en émulsion, lorsque celui-ci est présent à des concentrations supérieures à 10%. Cela est probablement lié à une augmentation de viscosité de la phase aqueuse continue, liée à l'ajout de sucres en son sein.

une formule permettant de mesurer la déstabilisation des lipides a également été décrite, à partir des aires des pics de cristallisation des lipides durant le premier cycle, et après chaque cycle de refroidissement :

$$\text{déstabilisation des lipides (\%)} = \frac{A_f}{A_i} \times 100$$

$A_f$  est l'aire du pic de cristallisation de l'huile au n- ième cycle de refroidissement

$A_i$  est l'aire du pic de cristallisation de l'huile au premier cycle de refroidissement

Au cours des différents cycles induisant la déstabilisation de l'émulsion, la quantité d'huile émulsifiée diminue et  $A_f$  diminue aussi.

#### **I.1.7.8 RMN à bas champs et caractérisation des émulsions**

Le principe de la résonance magnétique nucléaire repose sur l'excitation d'un échantillon par un champ magnétique de radio-fréquence  $B_1$ . Au cours du retour à l'équilibre, un signal dit de « relaxation » est émis. Son amplitude de départ est liée à la quantité de noyaux étudiés, sa fréquence de résonance est liée au déplacement chimique et la pente de la courbe de décroissance exponentielle est liée au paramètre de relaxation.

Dans la résonance magnétique à bas champs, un champ magnétique de l'ordre de 20 MHz est appliqué sur l'échantillon, et excite les spins de l'échantillon. Lors de la relaxation qui suit, les spins libèrent l'énergie qu'ils avaient alors absorbée. Le temps nécessaire aux protons pour revenir à leur état d'origine est quantifié. La courbe de décroissance exponentielle donnant l'intensité du signal en fonction du temps subit une transformée inverse de Laplace qui permet alors d'obtenir le tracé de l'intensité du signal en fonction de  $T_2$ , le temps de relaxation spin-spin ou transversal. L'échelle des abscisses permet de donner le temps de relaxation pour chaque population de protons. Deux données peuvent être exprimées :

- L'amplitude du signal est proportionnelle à la quantité de noyaux excités. Elle permet alors de remonter à la quantité de protons.
- La constante de vitesse, correspondant au temps de retour à l'équilibre des spins. Cette valeur, exprimée en millisecondes (ms), donne des indications sur la mobilité des protons. Elle est aussi notée temps de relaxation  $T_2$ .

Dans le cadre de ces travaux de thèse, les analyses d'émulsions par RMN à bas champ ont été réalisées par la société Cerevaa, située dans la région bordelaise. Cette société a mis au point sa propre méthode d'analyses en RMN à bas champ pour des applications diverses : cosmétique, agro-alimentaire.

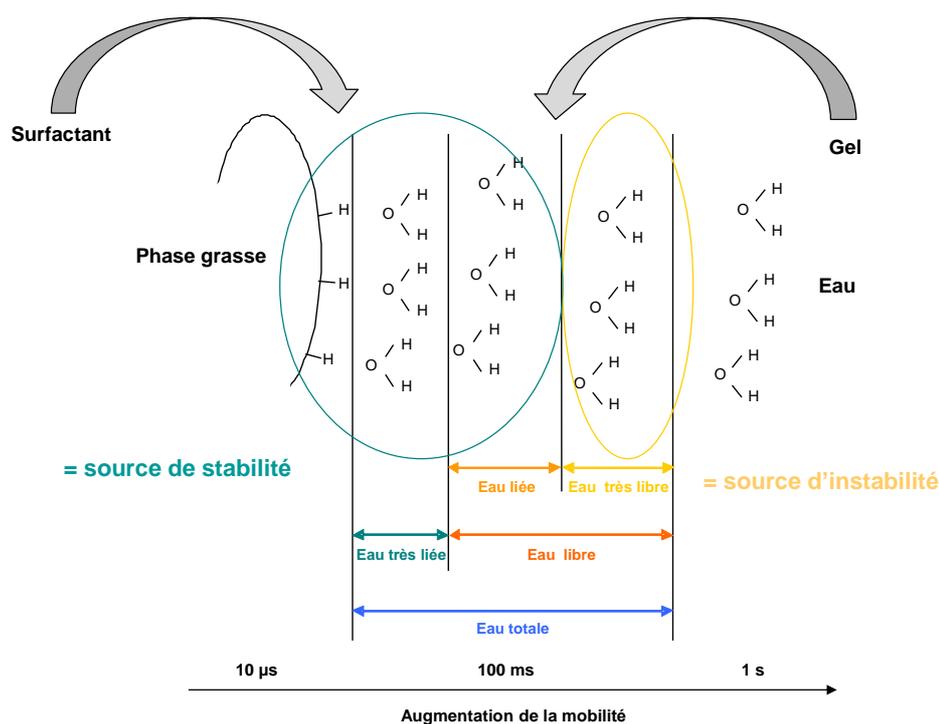
Ces analyses, centrées sur les protons de la phase aqueuse, permettent deux types de caractérisation des émulsions :

- La compartimentation des protons, donnant lieu à trois types d'eau : l'eau très libre, l'eau liée et l'eau très liée
- La mobilité des protons.

Comme le montre la figure 14 ci-dessous, plus les molécules d'eau sont liées de manière efficace à la phase grasse, plus faible est la mobilité des protons. En revanche, les molécules d'eau très libres voient la mobilité de leurs protons se rapprocher de l'ordre de la seconde, et induisent ainsi une source d'instabilité dans la formule.



## La stabilité en lien avec la disponibilité de l'eau



Ce document confidentiel est la propriété de Cerevaa

Figure 14 : Stabilité en lien avec la disponibilité de l'eau (Document Cerevaa)

Les techniques de résonance magnétique nucléaire sont très utiles pour des applications en chimie et en médecine, mais le coût élevé des aimants employés pour la RMN « classique » est souvent un frein pour les industriels. La RMN à bas champ présente l'avantage d'employer des aimants moins puissants, donc moins chers. Des appareils de mesures portables ont été développés (Blümich et al., 2009).

Cette méthode est utilisée en agro-alimentaire, en particulier pour l'étude de la conservation du poisson lors de son transport (Carneiro et al., 2016). Comme dans les émulsions, les molécules d'eau peuvent être séparées en différents groupes en fonction de leur mobilité et des liaisons entre les molécules et les muscles du poisson. La distribution de l'eau dans la structure musculaire du poisson donne des indications sur la stabilité et la conservation du poisson durant le voyage.

Elle est peut également être employée dans le domaine de la pétrochimie, notamment pour évaluer la capacité de molécules à déstabiliser les émulsions natives eau dans huile afin de « purifier » le pétrole (Carneiro et al., 2015). L'avantage de la RMN à bas champ à deux dimensions est le fait qu'elle permette de visualiser et d'étudier séparément les comportements des deux phases, sans avoir besoin d'effectuer une séparation physique des deux phases en amont.

En formulation, la RMN à bas champ permet de détecter l'inversion de phase des émulsions. En effet, les gouttelettes d'eau d'une émulsion eau dans huile ont un temps de relaxation T2 limité. L'application d'une agitation sur l'émulsion peut entraîner l'inversion des phases. L'eau passe donc sous forme de phase continue, et le temps de relaxation des protons est nettement plus important (Barrabino et al., 2014).

## **I.2 Choix des matières premières et leurs utilisations dans la formulation cosmétique**

### **I.2.1 Les graines, des ressources disponibles, de compositions variées**

#### **I.2.1.1 Généralités sur les graines**

Les graines sont les organes de la plante qui abritent le futur embryon. Elles se développent suite à la fécondation d'un ovule. Elles ont un rôle non seulement de protection, mais également de nutrition du futur embryon. La nutrition est assurée par la mise en réserve de matériaux fournis par la plante mère.

Le passage de l'ovule à la graine se traduit par une croissance importante, en rapport avec le développement de l'embryon, de l'albumen (tissu nourricier de la graine) et la mise en place des réserves, ainsi que par des modifications de ses différentes parties.

Deux types de graines sont à différencier :

- Les angiospermes voient leurs ovules contenus dans un ovaire : les graines sont situées au sein des fruits. C'est le cas des plantes à fleurs.
- Au contraire, les ovules des gymnospermes ne sont jamais enfermés. Les graines ne sont pas situées au sein de fruits.

Les réserves de la graine peuvent être situées au niveau de l'albumen, mais également des cotylédons (premières feuilles de l'embryon) et du péricarpe (dérivé du parenchyme nucellaire). Elles contiennent les éléments suivants :

- Les lipides, qui représentent la majorité des réserves. Ils sont sous forme de gouttelettes cytoplasmiques.
- Les glucides tels que les amidons, hémi-celluloses (parois cellulaires), sucres solubles (saccharose des amandes) et des hétérosides.
- Les protéines

- Des enzymes qui permettent l'hydrolyse des réserves au moment de la germination. Il s'agit des amylases des graminées, des lipases du ricin et des protéases des légumineuses.

Les graines décrites dans la suite du manuscrit sont le chanvre, le colza, le cynara, le pastel et le lin. Il s'agit d'angiospermes dicotylédones, constituées d'une amande entourée d'un ou deux téguments. L'amande peut être simple si elle ne contient que l'embryon, double si elle contient également l'albumen ou triple si un périsperme s'ajoute à l'albumen et à l'embryon. La figure 15 ci-après montre la coupe schématique d'une graine angiosperme dicotylédone, avec les différents organes qui la constituent.

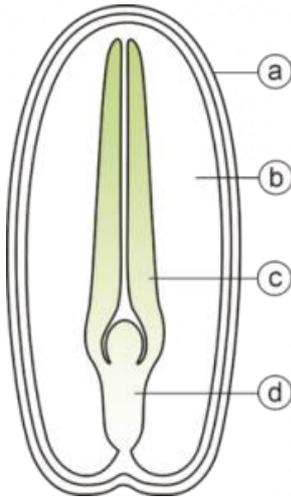


Figure 15 : Structure schématique d'une graine angiosperme dicotylédone : (a) : tégument, (b) : albumen, (c) : cotylédon, (d) : embryon

### I.2.1.2 Le chanvre

- Généralités sur la plante

Le chanvre (*Cannabis sativa*) est une plante annuelle cultivée dans les zones tempérées et tropicales. Elle appartient à la famille des *Cannabaceae*. Cette famille comprend deux genres : *humulus* (houblon) et *cannabis*. L'espèce *Cannabis Sativa* comprend trois sous espèces :

- *C. sativa ssp indica* (chanvre indien) : il s'agit de la forme présentant des propriétés psychotropes.
- *C. sativa ssp ruderalis* (ou spotanea) : il s'agit de la forme sauvage
- *C. sativa ssp sativa* : variété industrielle, source de fibres et de graines.

Il existe deux sous espèces de chanvre industriel : le monoïque, obtenu après amélioration génétique, et le dioïque, présent naturellement. Ce dernier est constitué d'une population d'individus à caractère mâle ou femelle. Afin de pallier à la productivité moindre en terme d'huile et de fibres, et à l'espérance de vie plus courte des pieds males, des variétés de type monoïque à dominante femelles, donc plus productives, ont été développées.

Sa culture industrielle ne nécessite ni herbicides, ni pesticides, et elle possède de faibles besoins en azote. Le chanvre est facilement valorisable en agriculture biologique, et c'est un excellent stockeur de CO<sub>2</sub>. Ces atouts font du chanvre un modèle de développement durable. Toutes les composantes de la plante sont valorisables :

- La paille, séparée en fibres et chènevotte
- Le chènevis, les graines du chanvre

Les fibres correspondent à la partie périphérique de la tige, elles représentent 30 à 35% en masse de la plante. Elles sont valorisées pour la fabrication de papier, mais également pour le renforcement de certains types de plastiques, et des matériaux de construction. La chènevotte correspond à la partie médullaire de la tige. Elle représente 50 à 55% en masse de la plante. Sa haute capacité de rétention en eau en fait un candidat idéal pour des utilisations dans le bâtiment, en tant que matériau isolant, mais également comme litière, et pour le paillage d'espaces verts.

Le défibrage de la fibre donne un troisième co-produit, la poudre de chanvre, qui représente 15 à 20% en masse de la plante. Elle est composée de petites particules de fibres et de chènevotte, et est riche en matière minérale. Elle peut être utilisée comme amendement organique ou en tant que litière pour les bovins. Une fois comprimée, elle peut servir de combustible pour les chaudières industrielles.

La graine de chanvre, ou chènevis, est une graine à albumen huileux. Elle est de forme ronde, de couleur brune à grise, et contient 30 à 35% d'huile. Elle peut être valorisée comme aliment pour le domaine de l'oisellerie, ou comme appât pour la pêche. Son rendement est d'environ 1 tonne/hectare.



Figure 16 : Planche botanique du chanvre

La production de chanvre en France représentait 8% en 2014 des surfaces agricoles exploitées. Cela correspond à environ 11000 hectares. Les bassins principaux de culture du chanvre sont retrouvés au nord-ouest et au nord-est de la France. Cependant, à l'échelle locale, il existe une filière de culture du chanvre en Midi-Pyrénées, avec notamment des exploitations de chanvre biologique dans le Gers.

En 2012, la culture du chanvre en France représentait un rendement en paille de 7,8 tonnes de matière sèche par hectare, et de 9,2 quintaux de chènevis par hectare.

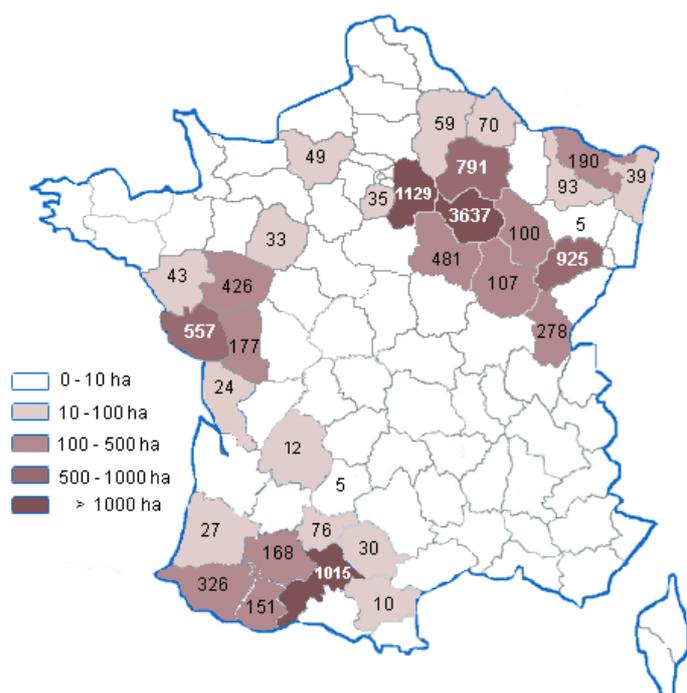


Figure 17 : Surfaces de chanvre en France en 2012 (source : Terres inovia)

Sa culture est autorisée pour les variétés pauvres en THC ( $\delta$ -9-tetrahydrocannabinol, molécule active du cannabis), dont la teneur doit être inférieure à 0,2% pour le chanvre industriel (Wang et al., 2008).

La plante est largement cultivée pour ses applications dans l'agroalimentaire (boissons et aliments), l'industrie des fibres et l'industrie pharmaceutique

En particulier, ses fibres sont largement utilisées dans l'industrie du papier, et les graines sont souvent considérées comme des co-produits.

- Les graines de chanvre

La France et la Chine sont les principaux producteurs de graines de chanvre au niveau mondial, avec des productions de l'ordre de 30000 et 25000 tonnes respectivement en 2014 (Dunford, 2015).

Les graines de chanvre présentent la composition suivante :

Tableau 11 : Composition des graines de chanvre

Graines de chanvre	
Teneur en humidité (%)	6-7

Teneur en huile (% M.S.)	31-36
Teneur en protéines (% M.S.)	23-25
Teneur en fibres (% M.S.)	28-34
Teneur en cendres minérales	6

Le tableau précédent est adapté de (Callaway, 2004).

Les graines de chanvre, à albumen huileux, renferment deux cotylédons riches en substances de réserve, protéines et lipides.

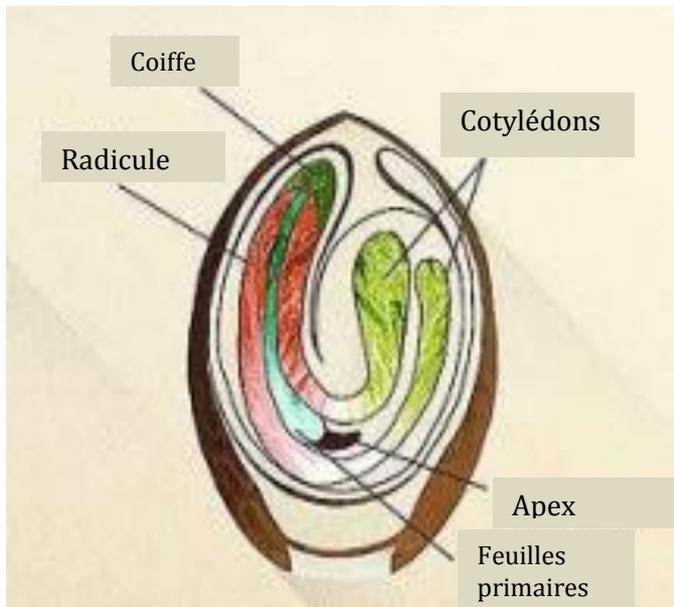


Figure 18 : Structure de la graine de chanvre

L'huile végétale de chanvre, du fait de sa teneur élevée en acides gras polyinsaturés, est une ressource nutritive exceptionnelle pour la consommation humaine. Elle est majoritairement composée d'acide linoléique (55%), d'acide alpha-linolénique (16%) et d'acide oléique (11%). Elle contient également entre 1,8 et 1,9% de composés insaponifiables (Montserrat-de la Paz et al., 2014). Ses acides gras saturés majoritaires sont l'acide palmitique (6-8%), stéarique (2,5-3%) et arachidique (0,5-0,8%) (Li et al., 2010).

L'huile de chanvre, de couleur jaune-vert, est très riche en acides gras polyinsaturés, et présente une certaine efficacité contre le cholestérol sanguin. Elle présente les propriétés thérapeutiques suivantes : anti-inflammatoire, anti-infectieuse, hypocholestérolémiante, protectrice du système cardio-vasculaire, et contre les troubles dermatologiques.

Elle est également intéressante en cosmétique pour ses propriétés hydratante, assouplissante, régénérante, revitalisante, en particulier pour les peaux sèches, ridées, fatiguées et deshydratées.

En terme d'indications thérapeutique, elle est recommandée pour aider à lutter contre le cholestérol, les affections cardio-vasculaires, psychiatriques, neurologiques, les problèmes immunitaires, le stress, la fatigue nerveuse, l'eczéma, l'œdème, l'arthrite et l'impuissance masculine. (Clergeaud and Clergeaud, 2003)

Les protéines de chanvre contiennent une quantité importante d'acides aminés essentiels et sont très digestes (Callaway, 2004). Une protéine particulièrement riche en méthionine et cystéine a été isolée de graines de chanvre (Odani and Odani, 1998). Cette dernière peut être utilisée pour améliorer les qualités nutritionnelles d'aliments.

Les graines de chanvre possèdent le profil de composition en acides aminés suivant, en mg/100g de graines (Dunford, 2015).

**Tableau 12 : Composition en acides aminés de la graine de chanvre**

Alanine	1,28
Arginine	3,10
Acide aspartique	2,78
Cystéine	0,41
Acide glutamique	4,57
Glycine	1,14
Histidine	0,71
Isoleucine	0,98
Leucine	1,72
Lysine	1,03
Méthionine	0,58
Phénylalanine	1,17
Proline	1,15
Serine	1,27
Threonine	0,88
Tryptophane	0,2
Thréonine	0,86
Valine	1,28

### **I.2.1.3 Le colza**

#### ○ Généralités sur la plante

Le terme de « colza » renvoie à de nombreuses espèces, en particulier les espèces riches en huile de la famille des *Brassica*, dont des graines de moutarde cultivées pour leurs huiles à usage industriel ou alimentaire.

Les espèces de brassica majoritairement cultivées sont les *B. napus* et *B. campestris*.

Le colza (*Brassica napus*) est une plante annuelle à fleurs jaunes, appartenant à la famille des brassicacées (anciennement crucifères). Elle est largement cultivée en Europe pour son huile, utilisée aussi bien dans l'agroalimentaire que pour la production de biocarburants.

Toutes les parties de la plante sont utilisées (Jahreis and Schäfer, 2011):

- Les graines sont employées pour leur huile, aussi bien pour l'alimentation animale que pour la production de biodiesel
- Les feuilles sont consommées comme des légumes majoritairement en Asie, et pour l'alimentation animale
- les tourteaux, co-produits d'extraction de l'huile, sont utilisés dans l'alimentation animale, du fait de leur teneur élevée en protéines
- les tiges séchées peuvent être utilisées comme combustible dans le chauffage domestique



Pl. DC. *Chou Aneet.* Brassica Napus L.

Figure 19 : Planche botanique du colza

Les graines de colza présentent la composition suivante (Salunkhe, 1992) :

Tableau 13 : Composition de la graine de colza

	Graine de Colza
Teneur en humidité (%)	6-9
Teneur en huile (% M.S.)	38-50
Teneur en protéines (% M.S.)	36-44
Teneur en fibres (% M.S.)	11-16
Teneur en cendres minérales (% M.S.)	7-8

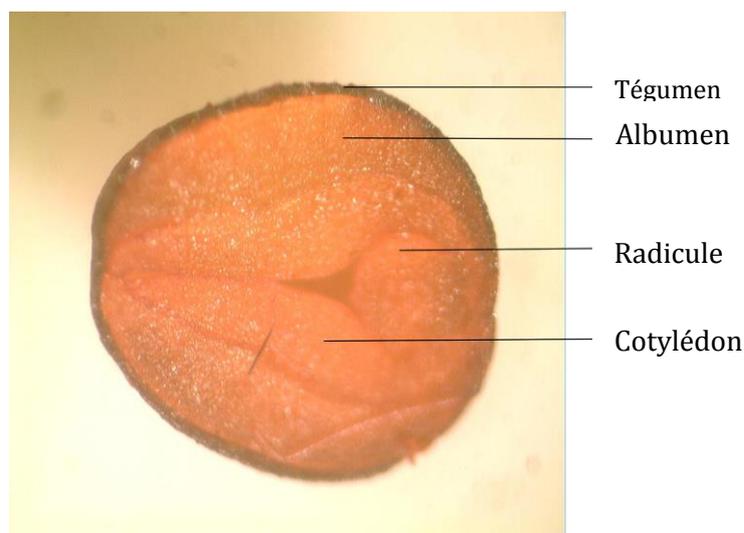


Figure 20 : Coupe d'une graine de colza

Son huile a connu un engouement important en agroalimentaire en particulier à cause du déclin de la popularité de l'huile d'arachide.

De ce fait, de nombreux travaux ont conduit à l'amélioration de ses qualités nutritionnelles, en particulier la diminution de sa teneur en acide érucique, supposé entraîner des lésions cardiaques chez le rat, ainsi que des glucosinolates, qui provoque en plus d'une hypertrophie thyroïdienne des effets néfastes sur ses hormones. De plus, dans le cadre de ses applications en cosmétique, ce point là est important du fait de la supposée mauvaise tolérance cutanée de l'acide érucique. De ce fait, les espèces commercialisées ont évolué de « traditionnelle » à « simple zéro » puis « double zéro ». (Morice and Karleskind, 1992; Shahidi, 1990) L'espèce obtenue présentant de faibles teneurs en acide érucique et en glucosinolates est appelée CANOLA au Canada, contraction de CANadian Oilseed Low Acid.

Les variétés originelles de colza étaient cultivées pour les utilisations de l'huile végétale dans les lampes à huile, mais également pour l'application de l'huile comme lubrifiant dans les machines à vapeur.

Les améliorations génétiques réalisées ont permis de diminuer la teneur en acide érucique de 59,4 à 0,1 puis 0 pour les trois variétés citées. La teneur en glucosinolate a été réduite de 100-205  $\mu\text{mol/g}$  pour le traditionnel et le simple zéro à 18-30  $\mu\text{mol/g}$  pour le double zéro ((Shahidi, 1990).

La couleur jaune de l'huile de colza est due à la présence de lipochromes et de pigments, en particulier des caroténoïdes et chlorophylle, et leurs produits de dégradation. La teneur en caroténoïdes est de l'ordre de 2 à 3 ppm dans l'huile, dont 70 à 75% de  $\beta$ -carotène (Salunkhe, 1992).

Aujourd'hui, sa production mondiale est estimée à 60,39 millions de tonnes de graines, dont 34% en Union Européenne, 22 % en Chine, 21 % au Canada et 12 % en Inde.

L'huile de colza est la troisième huile mondiale en terme de production après l'huile de palme et l'huile de soja.

En 2007, le colza représentait 62% des 3681 kilotonnes de graines qui sont triturées en France. (guide MTD des huiles végétales, ITERG, 2010).

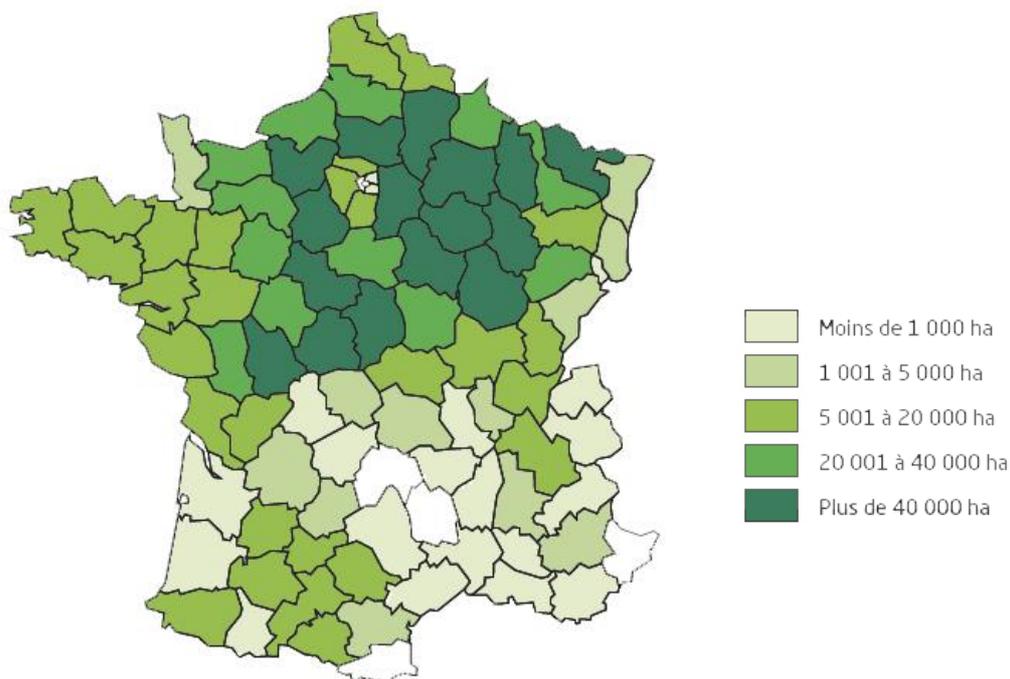


Figure 21 : Production du colza en France (2012) (source : CETIOM/Terres inovia)

Les points à retenir concernant l'huile végétale de colza sont les suivants :

- L'huile de colza pour l'alimentation humaine est une huile comestible raffinée (pour la qualité 00), pressée à froid et possédant une teneur importante en acide oléique et une faible teneur en acide  $\alpha$ -linoléique (< 3%) (Barth, 2009).
- Les huiles de colza comestibles et pressées à froid le sont du fait de leur faible teneur en acides gras saturés (de l'ordre de 6%), et de leur ratio n-6/n-9 optimal (2 :1)
- Chez les humains, l'acide  $\alpha$ -linoléique est converti en acide eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque. Ces acides gras ne sont pas essentiels
- L'efficacité de conversion de l'acide  $\alpha$ -linoléique en acides gras à longue chaîne n-3 polyinsaturés est limitée. La forte consommation d'acides gras n-6 polyinsaturés altère le taux de conversion.

- Selon de nombreuses études, la consommation importante d'acides gras n-3 polyinsaturés a une corrélation positive avec la diminution des risques cardiovasculaires, et résulte en une diminution du ratio acide arachidonique/acide eicosapentaénoïque dans les membranes cellulaires. Cela confirme les bénéfices pour la santé humaine des graines de colza (Russo, 2009; Wijendran and Hayes, 2004)

L'huile de colza présente des propriétés hypocholestérolémiantes, anti-oxydantes, et protectrice du système cardio-vasculaire. Elle est indiquée pour les cas d'artériosclérose, cholestérol et pour la prévention de la maladie d'Alzheimer. (Clergeaud and Clergeaud, 2003)

#### **1.2.1.4 Le cardon**

- o Généralités sur la plante

Le cynara, également appelé cardon (*Cynara cardunculus*) est une plante herbacée bisannuelle appartenant à la famille des asteracées. Elle possède un ancêtre commun avec l'espèce *Cynara scolymus*, l'artichaut moderne, largement cultivée aujourd'hui pour sa consommation humaine. Les deux espèces ont pour ancêtre commun des *Cynara* comestibles, cultivées depuis des siècles autour du bassin méditerranéen.

Traditionnellement, les feuilles blanchies, les pétioles des feuilles charnues et le réceptacle étaient consommés dans des soupes, des ragoûts ou des salades (Fernández et al., 2006).

Son développement passe d'abord par un stade de rosette, puis donne une tige principale épaisse et rameuse, pouvant atteindre une hauteur de deux mètres. Le développement des feuilles a lieu à l'automne et en hiver, la croissance de la tige a lieu au printemps, avant la formation des capitules contenant les graines au début de l'été. Les chaleurs de l'été provoquent le dessèchement des parties aériennes, laissant ainsi les bourgeons souterrains à l'état latent. Ce système de racines très résistant fait d'elle une plante particulièrement adaptée aux milieux arides du bassin méditerranéen. Le rendement de production en graines peut atteindre 2 à 3 T/ha (Cajarville et al., 2000). Ses feuilles sont très longues, de couleur grise, et présentent des pétioles. Ceux-ci se prolongent en nervure principale, et sont la partie comestible du cardon. Les fleurs, de couleur bleue violacée, se réunissent en capitules et apparaissent au cours de la deuxième année.

Les feuilles sont riches en protéases, les cardosines A et B. Les fleurs, quant à elles, étaient utilisées sous forme d'extrait aqueux dans la péninsule ibérique pour la production de fromage de chèvre et de brebis (Fernández et al., 2006; Silva, 2005).

Les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des bractées (intermédiaire entre la feuille et la fleur) ont été démontrées (Kukić et al., 2008). Des macérations d'extraits végétaux dans de l'éthanol sont réalisées, puis des extractions successives avec les

solvants suivants sont effectuées : chloroforme, acétate d'éthyle et butanol. Les extraits obtenus sont séchés, puis leurs activités antioxydante et antimicrobienne sont évaluées. Les méthodes FRAP (ferric ion antioxydant parameter) et DPPH (utilisant le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil) ont été choisies pour déterminer les activités antioxydantes. Les activités antimicrobiennes sont mesurées contre des souches d'origine alimentaire, des producteurs de mycotoxines, des bactéries pathogéniques humaines et des micromycètes. Les bactéries suivantes ont été testées : *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*. Les résultats ont démontré que tous les extraits possèdent des activités antioxydantes dépendant de leur concentration. En terme d'activité biologique, les extraits possèdent des activités antimicrobiennes comparables à celles d'antibiotiques standards.

Les bractées contiennent également des saponines, stéroïdes et glycosides triterpéniques, dont les activités biologiques et pharmacologiques sont nombreuses (Križková et al., 2004). Les feuilles présentent des teneurs intéressantes en acides phénoliques et flavonoïdes. Selon leur génotype, les feuilles de *Cynara Cardunculus* présentent des teneurs en acide caféoylquinine comprises entre 0,3 et 2,4 g/kg, en lutéoline comprise entre 1,4 et 11,3 g /kg, en apigénine comprise entre 0,6 et 5,8. La teneur en polyphénols totaux des feuilles est ainsi comprise entre 5,3 et 13,1 g/kg (Pandino et al., 2011) ((Pinelli et al., 2007).

Les racines sont une source intéressante d'inuline, polymère de fructose naturellement produits par certains végétaux. Cette fibre n'est pas digestible par l'intestin. Elle va donc arriver intacte au sein du côlon, où elle va être métabolisée par la flore intestinale, entraînant la libération de dioxyde de carbone, et d'oxygène. Elle stimule ainsi le développement des bactéries, et est ainsi considérée comme un prébiotique. Selon l'espèce et la saison, les racines de *Cynara* peuvent contenir des teneurs en inuline allant jusqu'à 800 g/kg de matière sèche. (Raccuia and Melilli, 2010)

- Les graines de cardon

Les graines de cardon, longtemps considérées comme des co-produits, ont été étudiées pour leur potentiel en tant qu'aliment pour les ruminants (Cajarville et al., 2000). Leur teneur en fibres, de l'ordre de 45%, est plus élevée que celle des graines classiquement données aux animaux (colza, tournesol, soja). Les graines sont de forme oblongues, surmontées d'une aigrette plumeuse, et se séparent facilement.

Elles présentent les caractéristiques suivantes (Curt et al., 2002; Jorge Gominho, 2001; Maccarone et al., 1999):

**Tableau 14 : Composition des graines de cardon**

Teneur en humidité (%)	5-7
Teneur en huile (% M.S.)	25
Teneur en protéines (% M.S.)	21
Teneur en fibres (% M.S.)	40
Teneur en cendres minérales (% M.S.)	4-5

Les extraits de graines présentent les meilleurs résultats sur des tests d'activités antioxydantes, avec une IC<sub>50</sub> sur la DPPH de l'ordre de 23 µg/mL, suivi des feuilles et des fleurs, dont l'IC<sub>50</sub> est supérieure à 50 µg/mL (Falleh et al., 2008).

Cette huile végétale est essentiellement composée d'acides gras polyinsaturés. Parmi eux, les acides linoléique et oléique sont majoritaires (58,7 et 28,4%), suivis des acides palmitiques et stéariques (25,0 et 3,7%) (Curt et al., 2002). Sa teneur en α-tocophérol est de l'ordre de 38,7 mg/100g. (Maccarone et al., 1999)

Cette huile présente donc une composition proche de celles des huiles végétales classiquement consommées (colza, soja, coton, tournesol). Concernant la digestibilité, les expériences montrent que les graines de cynara ne doivent pas dépasser 10 % en poids total de l'alimentation animale pour en tirer tous les bénéfices attendus sur la digestion.

#### **1.2.1.5 Le pastel**

- Présentation de la plante

Le pastel, *Isatis tinctoria* est une plante dicotélydone bisannuelle, appartenant à la famille des brassicacées (ou crucifères). Une fois à maturité, au bout de deux ans, elle pousse sous forme d'une tige cylindrique pouvant atteindre 1,50 m de hauteur. Les feuilles, qui donnent la teinture bleue, sont nombreuses, de taille décroissante en s'éloignant de la base. Des petites fleurs jaune pâle poussent sous forme de grappes de 40 à 50 cm de diamètre. Les graines sont contenues dans des enveloppes fibreuses, les siliques, de 1 à 2 cm de longueur, qui présentent une couleur bleue-violette à maturité.

L'exploitation du pastel a longtemps été limitée à la production du pigment bleu tiré de ses feuilles, typiquement dans le triangle d'or entre Toulouse, Albi et Castelnaudary. En effet, les conditions climatiques ainsi que la composition de la terre, sont propices à la culture du pastel. La plante a besoin d'un sol riche et meuble, siliceux, calcaire et argileux. Des hivers doux et pluvieux et des étés ensoleillés sont également idéaux pour sa culture. La période de floraison s'étale de mai à juin.

La culture du pastel avait disparu, détronée par l'importation de l'indigo des indes, puis par l'indigo synthétique, mais elle reprend depuis environ vingt ans.

La feuille de pastel contient deux types de molécules tinctoriales :

- L'indigotine ou indigo, de couleur bleue. Elle n'existe pas à l'état natif dans la plante, c'est un artéfact issu de métabolites secondaires.
- L'indirubine, isomère de l'indigotine, de couleur rouge.

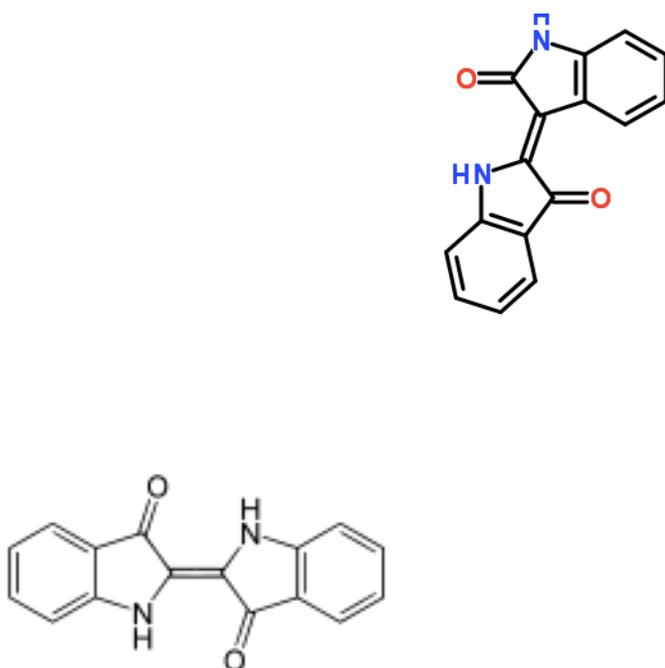


Figure 22 : Structure de l'indigotine et de l'indirubine

Le brun d'indigo et des flavonoïdes, de couleur jaune, se retrouvent également dans les extraits de pastel. Ce mélange de pigments confère à l'indigo naturel une couleur bleue, différente de celle de l'indigo synthétique.

Le pigment bleu est obtenu par macération des feuilles dans une solution aqueuse à 70°C. La macération est effectuée durant deux heures, puis le mélange est filtré et le liquide est récupéré. Le pH du mélange passe ensuite d'un pH acide (3-4) à un pH basique (10-11) par addition de KOH. L'oxydation est laissée sous agitation durant une heure. Le mélange est ensuite laissé au repos durant 16 heures afin de permettre la décantation de l'indigo. La dernière étape de raffinage de l'indigo consiste à l'isoler de la fraction liquide par filtration et séchage.

Le pastel est considéré depuis la nuit des temps comme une plante vulnérable, ayant pour vertu de favoriser la guérison des plaies et des blessures. Aussi bien les bretons et les germains, qu'Hippocrate, Pline et Galien en recommandaient l'utilisation sous forme de cataplasmes dans tous les cas d'altérations cutanées. Les indications médicinales du pastel en Europe, du moyen âge au 18ème siècle recourent ces données, et y ajoutent le pouvoir de guérir les morsures de serpent (Cardon and Du Chatenet, 1990).

Dans la pharmacopée chinoise, les feuilles de pastel sont employées pour le traitement des infections ORL, la racine séchée est recommandée contre les maladies infectieuses, virales et bactériennes, et la pneumonie. La plante entière est recommandée contre les tumeurs cancéreuses.



Pl. 38. Pastel des teinturiers. *Isatis tinctoria* L.

Figure 23 : Planche botanique du pastel

- Les graines de pastel

Les graines de pastel sont de petite taille, de l'ordre de 5 mm, et sont contenues au sein de siliques fibreuses, de couleur bleue violette à maturation.

Son huile insaturée, riche en acide linoléique et érucique est caractéristique des huiles végétales des plantes crucifères. Des travaux font état de la neutralisation de ses acides gras libres par estérification in-situ, suivi de leur transestérification par le méthanol. Cela a permis à l'huile de pastel d'apparaître comme une nouvelle source d'acides gras pour la cosmétique et la lipochimie (Iba et al., 1992). Elle a ainsi été utilisée au début des années 1980 par Bourjois et Chanel pour des formulations de soins et de maquillage (Lauth et al.). L'utilisation de l'huile de pastel par ces deux sociétés a duré jusqu'à la fin de l'obligation de non concurrence liée au brevet, en 1993.

Le dépôt d'un brevet d'invention par la société Cocagne et Compagnie et le laboratoire de chimie agro-industrielle ont relancé l'intérêt de l'opinion publique pour cette plante, dont les fractions autres que les feuilles étaient assez méconnues jusqu'à lors.

Ce brevet précédemment cité consiste en la précipitation d'extraits protéiques à partir du tourteau de pastel, et revendique des propriétés anti-âge et de réparation cutanée liées à la stimulation des fibroblastes, qui sécrètent le collagène, par les extraits protéiques.

#### **I.2.1.6 Le lin**

- Généralités sur la plante

Le lin est une plante dicotylédone autogame appartenant à la famille des linacées et au genre *Linum*. Elle est cultivée dans le monde entier depuis près de deux siècles, majoritairement pour ses fibres et ses graines. Il existe deux familles de lin, destinées soit à la production de fibres (lin fibre) soit à la production de graines (lin oléagineux). La différence entre les deux espèces est retrouvée au niveau du nombre de ramifications de la tige ; le lin oléagineux en possède beaucoup plus afin d'augmenter le rendement de production de graines.

Le lin cultivé, *Linum usitatissimum*, est une espèce annuelle. La plante peut atteindre un mètre de haut. Une centaine de feuilles se répartissent sur la tige, dans une disposition en spirale. Les fleurs ont une couleur pouvant aller du bleu pur au blanc, leur durée de vie est très limitée, de l'ordre de un jour. La floraison peut s'étendre sur 15 jours. La production mondiale de graines de lin variait entre 1,7 et 2,8 millions de tonnes par an entre 1992 et 2012. En 2012, les principaux producteurs mondiaux étaient le Canada, la Russie et la Chine. En 2010, 2 millions de tonnes de graines de lin étaient produites dans le monde, dont 22% au Canada et 4 à 5% en Union Européenne, qui est donc fortement dépendante du Canada pour son approvisionnement en graines. Cependant, l'huile de lin ne représente que 0,5 à 1,5% de la production mondiale totale d'huiles végétales.

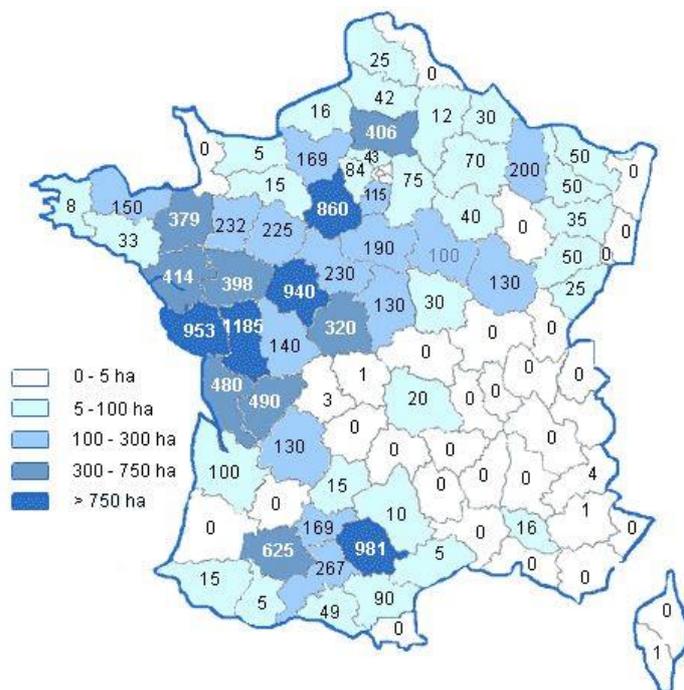


Figure 24 : Production française de lin en 2012 (source agreste 2012/Terres inovia)

Aujourd'hui, le lin est l'une des sources clés de molécules bioactives dans le cadre des aliments fonctionnels. Il est non seulement riche en acide alpha linoléique et en fibres solubles, mais c'est également une soucre essentielle de polyphénols dont le plus important est le SDG, secoisolariciresinol, diglucoside doté de propriétés anticancéreuses (Attoumbré et al., 2010).

Ses fibres, issues des tiges par rouissage et teillage sont ensuite filées et peignées afin de les transformer en fils. C'est le principal débouché des fibres de lin, 90% des fibres produites sont transformées en fils, destinés aux marchés de l'habillement, de la maison, de l'ameublement, des textiles techniques et des matériaux à usage industriel.

Les étoupes du lin, correspondant aux textiles non tissés, sont utilisées dans le bâtiment et dans l'automobile.

- Les graines de lin

Chaque fleur donne un fruit, une capsule contenant dix graines. Les graines sont lisses, plates, petites et légères, de couleur brune à maturité. Elles mesurent entre 4 et 6 mm de longueur, leur surface est lisse et généralement brillante. La gamme de couleur des graines varie du jaune au marron foncé. La graine mature est constituée de deux parties distinctes : l'enveloppe et l'embryon. L'enveloppe est composée d'un tégument externe et d'un tégument interne. Le tégument externe, également appelé spermodermes ou testa est composé de plusieurs couches de cellules.

L'embryon est composé d'une gemmule, d'une radicule, d'une tigelle, et de deux cotylédons, représentant en masse plus de 50% de la graine. 75% de l'huile est contenue dans les cotylédons, 22% dans l'endosperme et 3% dans la radicule. La couche extérieure de l'endosperme contient les sucres mucilagineux (James Daun et al., 2003).

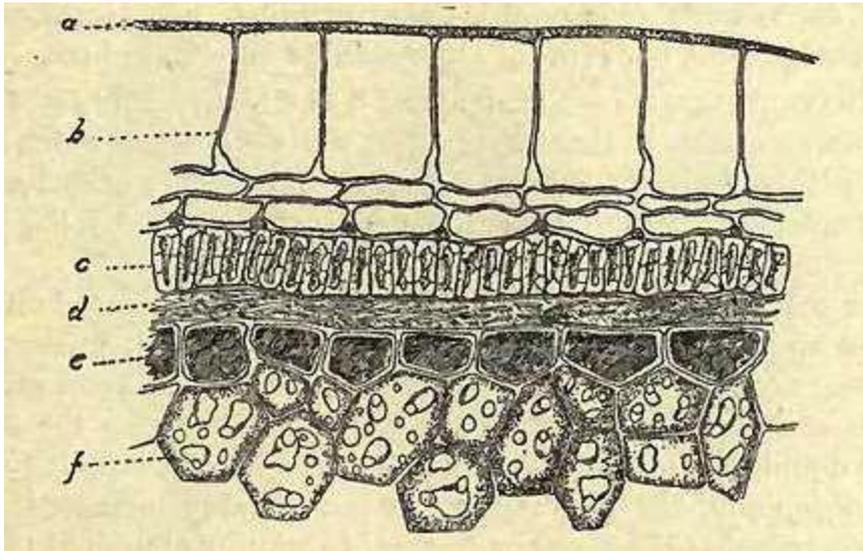


Figure 25 : Coupe transversale de la graine de lin

- a = cellules du mucilage
- b = couche parenchymateuse
- c = couche sclérenchymateuse
- d = couche membraniforme
- e = couche brune du tégument interne
- f = endosperme

Les graines présentent la composition moyenne suivante (Dunford, 2015; Fabre et al., 2015a; Goh et al., 2006; Herchi et al., 2012) :

Tableau 15 : Composition des graines de lin

Teneur en humidité (%)	5
Teneur en huile (% M.S.)	8-20 / 38-45
Teneur en protéines (% M.S.)	10,5-31
Teneur en fibres (% M.S.)	28-35
Teneur en cendres minérales (% M.S.)	4
Teneur en mucilages (% M.S.)	2-7

Les variations notées sur les teneurs en composés de la graine peuvent être expliquées par des différences de variétés de graines employées pour les études.

Les fibres contenues dans la graine de lin contiennent 7 à 10% de fibres solubles, dont la composition varie en fonction des génotypes et de la situation géographique des graines (Goh et al., 2006).

Les sucres mucilagineux, précédemment cités, correspondent à un réseau polysaccharidique visqueux qui, selon les plantes, peut être sécrété par les racines, les feuilles ou les graines. Chez le lin, il s'agit d'un mucilage séminal, sécrété par les cellules épidermiques du tégument externe. L'épiderme de la graine de lin renferme entre 3,5 et 9,4% de mucilage, en masse de graine. Cette valeur peut varier en fonction de la méthode d'extraction employée, et du génotype de la graine. Il est important de noter que les graines immatures ne libèrent pas de mucilages.

Lorsque la graine est immergée dans l'eau, le mucilage s'hydrate et gonfle, provoquant une augmentation de pression sur les parois cellulaires entraînant leur rupture et libérant ainsi le mucilage. La rupture se produit au niveau de la zone de jonction entre les parois radiales et la paroi tangentielle externe des cellules. Les fractions de parois restées accrochées au sommet des columelles apparaissent, dans la masse de mucilage extrudé, sous la forme de rayons partant de la surface de la graine.

Les mucilages sont exploités comme un co-produit de l'industrie de l'huile de lin. Leurs propriétés fonctionnelles et physiques ont été confirmées dans les années 1990 (Chen et al., 2006). Le potentiel commercial du mucilage dans les domaines cosmétiques et pharmaceutiques se base sur ses propriétés émoullissantes et adoucissantes (Bemiller et al., 1993). Des onguents et des pâtes à base de mucilages sont utilisés pour traiter entre autre l'impétigo et l'eczéma. Le mucilage peut aussi être utilisé comme laxatif, lubrifiant (toux), ou comme muco-adhésif. Ces propriétés ont été reprises dans le brevet WO 2008043944 A3 de SmithKline Beecham pour la préparation d'une composition cosmétique destinée à lutter contre le vieillissement cutané.

Un complément alimentaire à base de graines de lin partiellement délipidées réduit le taux de cholestérol LDL dans le sang, grâce aux mucilages (Fedeniuk and Biliaderis, 1994).

Selon les auteurs, et par là même le génotype de la graine étudiée, les mucilages peuvent avoir des compositions variées :

**Tableau 16 : Composition des mucilages**

Composition	Auteurs
Polysaccharides : jusqu'à 98% Protéines : 10% Huile : 10% Cendres minérales : 20%	(O'Mullane and Hayter, 1993).
Sucres : 91,6% Protéines : 8,6% Lipides : n.d. Cendres minérales : 11,3%	(Rebolé et al., 2002)

Les protéines pouvant se retrouver dans les mucilages sont les protéines structurales des parois cellulaires, qui interagissent avec les pectines.

Des protéines riches en glycine et en proline ont été retrouvées dans des mucilages racinaires et styloires. Il existe quatre classes de protéines structurales :

- les extensines, glycoprotéines riches en hydroxyproline, à forte teneur en lysine
- les protéines riches en glycine
- les protéines riches en proline et en hydroxyproline, à teneurs élevées en tyrosine et en lysine,
- les arabinogalactanes, protéines riches en hydroxyproline, sérine, alanine, thréonine et glycine.

Les profils d'acides aminés de divers mucilages de graines de lin et des graines elles mêmes ont été caractérisés (Cui and Mazza, 1996). Les mucilages présentent un taux d'acide glutamique supérieur à celui des graines, tandis que les autres acides aminés sont en proportions équivalentes dans les graines et les mucilages.

Les mucilages sont une fraction de polysaccharides hétérogène correspondant à la fraction soluble de la fibre (Wanasundara and Shahidi, 1997). Les sucres majoritaires sont l'acide galacturonique, le galactose, le xylose et le rhamnose. Le fucose, l'arabinose et le glucose sont minoritaires. Bailey, en 1936, a séparé les fractions polysaccharidiques neutres et acides des mucilages de lin :

- les polysaccharides neutres : arabinoxylanes, pouvant présenter les compositions suivantes :

**Tableau 17 : Composition des polysaccharides neutres retrouvés dans les mucilages de lin**

Composition des polysaccharides neutres	Référence
L-arabinose, D-xylose et D-Galactose	(Wanasundara and Shahidi, 1997),
62,8% de D-xylose, 16,2% de D-arabinose, 13,6% de D-glucose et 7,4% de D-galactose	(Cui et al., 1994)
Contamination par L-rhamnose et D-Galactose	(Warr et al., 2003)
Peut contenir jusqu'à 7,3% de fucose	(Warrant et al., 2005)

- les polysaccharides acides sont des polymères pectiques. Selon les différents travaux, ils peuvent présenter les compositions suivantes

**Tableau 18 : Composition des polysaccharides acides retrouvés dans les mucilages de lin**

Composition des polysaccharides acides	Référence
L-rhamnose, L-fucose, L-galactose et acide D-galacturonique	(Wanasundara and Shahidi, 1997)
54,5% de L-rhamnose, 23,4% de D-galactose , 10,1% de L-fucose, 5,5% de D-xylose, 2,0% de L-arabinose et 4,5% de D-glucose	(Cui et al., 1994; Warr et al., 2003)

Le ratio polysaccharides neutre/polysaccharides acides est de 1:2 (Wanasundara and Shahidi, 1997).

Le rendement d'extraction, la composition en polysaccharides et par là même les propriétés rhéologiques des mucilages sont influencés par le génotype (Cui et al., 1996; Diederichsen et al., 2006), l'environnement (Diederichsen et al., 2006), ainsi que par les procédés d'extraction et de purification (Cui et al., 1994; Fedeniuk and Biliaderis, 1994).

- o Huile de lin

Comme vu précédemment, les graines de lin présentent, selon les graines, une teneur en huile comprise entre 8 et 45% du poids sec de la graine. L'huile de lin a des propriétés de régulation du système hormonal, et de stimulation des défenses naturelles. Elle est recommandée contre les affections suivantes : contre l'artériosclérose, l'arthrite, la

constipation, le diabète, la lithiase, la sclérose en plaques, les troubles hépatiques, hormonaux et dermatologiques, ainsi que les ulcères d'estomac.

Elle est majoritairement composée d'acides gras polyinsaturés, en particulier l'acide linoléique (C 18 :3), qui tire son nom du lin. La triple insaturation de l'acide linoléique confère à l'huile de lin une grande réactivité vis à vis de l'oxygène. Elle peut donc se dégrader facilement, ce qui n'est pas idéal pour des applications agro-alimentaires. L'acide linoléique représente environ 65% des acides gras de l'huile de lin, suivi de l'acide linoléique, présent à des teneurs comprises entre 11 et 24%.

Aujourd'hui, environ 70% de la production mondiale sont destinés au domaine technique, et les 30% restants sont destinés à des productions alimentaires (Nykter et al., 2006). L'huile de lin présente également des applications pour la fabrication de médicaments.

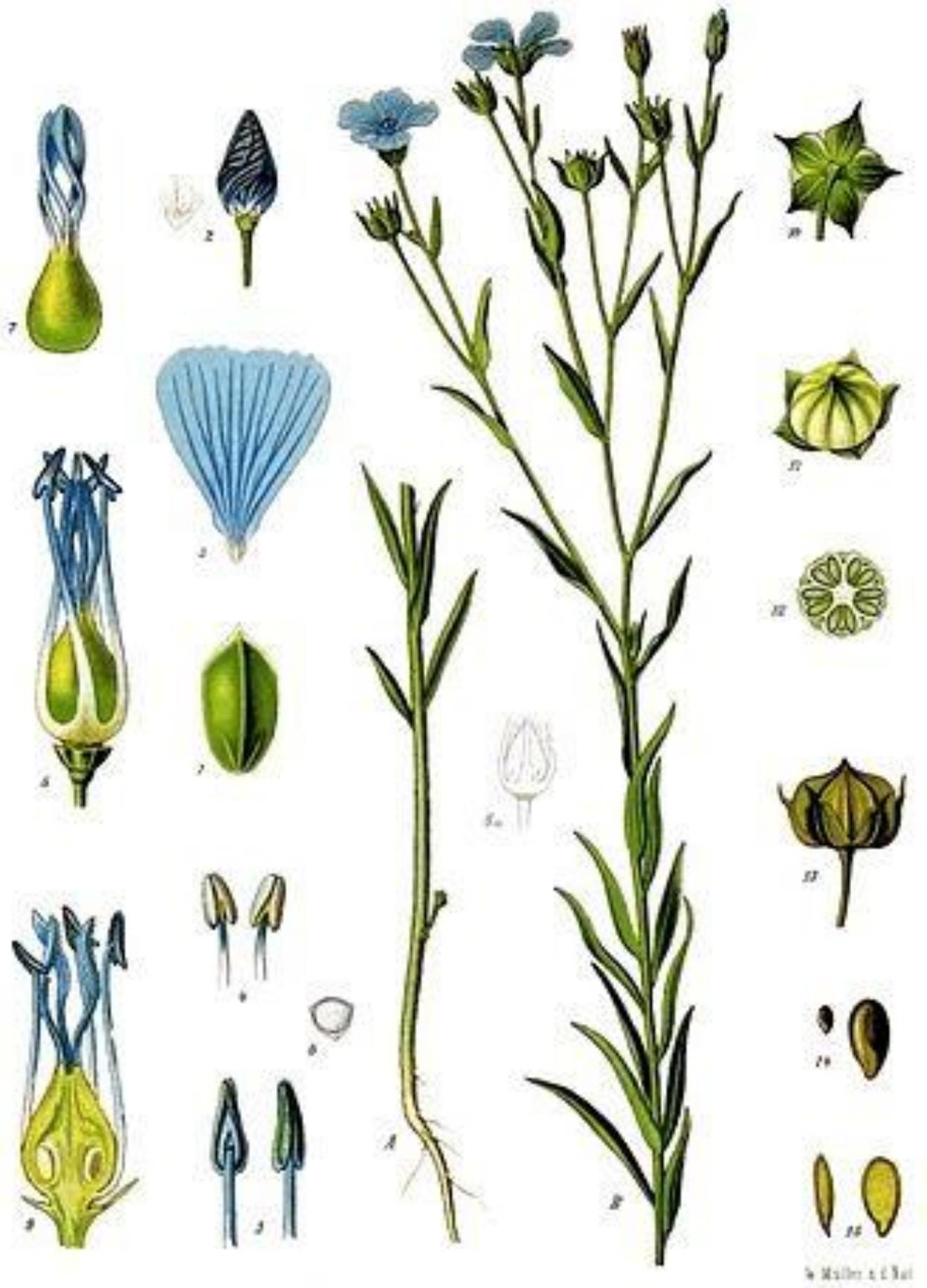


Figure 26 : Planche botanique du lin

Les graines de lin font partie, au même titre que les graines de chia, de roquette, de caméline ou de moutarde, de la famille des graines mucilagineuses. Après un contact prolongé avec de l'eau chaude, elles libèrent un réseau polysaccharidique qui fait gonfler le milieu.

Dans le cas des graines de lin, les mucilages représentent entre 3 et 9% du poids total de la graine (Fedeniuk and Biliaderis, 1994). Ces mucilages sont composés de 50 à 80% de polysaccharides, 4 à 20% de protéines et 3 à 9% de cendres (Cui et al., 1994; Oomah and Sitter, 2009).

Les mucilages sont typiquement composés de 21-36% d'acide galacturonique, 19-38% de xylose, 11-16% de rhamnose, 12-16% de galactose, 8-13% d'arabinose et 4-6% de glucose. (Fedeniuk and Biliaderis, 1994; Oomah and Sitter, 2009)

Les mucilages présentent de très nombreuses applications. Dans le domaine agro-alimentaire, ils sont utilisés comme agent texturant. Dans les domaines cosmétiques et pharmaceutiques, ils peuvent être employés comme adoucissant, anti-oxydant, émoullient et apaisant.

Les mucilages de lin sont obtenus par macération dans l'eau chaude des graines, et récemment des procédés d'amplification d'extraction par ultrasons et microondes ont été développés.

Un procédé d'extraction par micro-ondes permet de d'obtenir un rendement d'extraction de 8% en 30 minutes. Les mucilages obtenus par extraction aux ultrasons présentent une viscosité intrinsèque inférieure aux mucilages obtenus par extraction aux micro-ondes. Cela présente un certain avantage pour la séparation des graines et des mucilages à l'issue de l'extraction mais peut également être un inconvénient en fonction des applications souhaitées (Fabre et al., 2014). Quelque soit le procédé d'extraction testé (agitation magnétique, micro-ondes ou ultrasons), le ratio liquide/solide employé est de 5, et la température du milieu est maintenue à 50°C.

Les graines de lin présentent le profil de composition en acides aminés, en mg/100g suivant (Hall et al., 2009) :

**Tableau 19 : Composition en acides aminés des graines de lin**

Acide aminé	%
Alanine	4-5
Arginine	9-12
Acide aspartique	9-11
Cystéine	0-2
Acide glutamique	20-23
Glycine	5-6
Histidine	1-3
Isoleucine	4-5
Leucine	0-6
Lysine	2-4
Méthionine	1-2

Phénylalanine	5-6
Proline	3-5
Serine	2-3
Threonine	0-4
Tryptophane	0-1
Thréonine	2-3
Valine	5-6

## I.2.2 Avantages de l'utilisation de graines pour des formulations cosmétique

### I.2.2.1 Les huiles végétales et leurs bénéfices

Les huiles végétales saines et consommables par l'être humain doivent avoir entre autres les caractéristiques suivantes : une faible teneur en acides gras saturés, un haut pourcentage en acides gras mono et polyinsaturés, ainsi qu'un faible ratio n-6/n-3. D'autre part, elles doivent évidemment avoir des faibles teneurs en acides gras nocifs, tels que l'acide érucique, et en substances potentiellement nocives, telles que les pesticides. Elles doivent également posséder des teneurs intéressantes en composés nutritionnellement intéressants, tels que les tocophérols (Jahreis and Schäfer, 2011) .

Dans les applications cosmétiques, l'utilisation des huiles végétales a toujours répandue. Ainsi, durant l'Egypte antique, les hommes et les femmes s'enduisaient le corps d'huiles parfumées grâce à des huiles parfumées par des épices qui y macéraient. Les romains s'enduisaient le corps d'huile d'amande douce ou d'olive après leurs séances aux thermes. Des préparations à base d'huiles et de plantes étaient utilisées par les femmes pour l'entretien de leur chevelure en Inde ou en Chine. De nos jours, les huiles végétales tiennent une part importante dans de nombreuses préparations cosmétiques.

La fonction première de l'épiderme est de former une gaine protectrice, qui protège l'organisme du dessèchement et des agressions extérieures. (Elias, 1981) La propriété « barrière » de la peau est due au stratum corneum (couche cornée). La couche cornée est composée de cellules, les cornéocytes, intégrés au sein d'une matrice lipidique. La matrice lipidique est composée de céramides, de cholestérol et d'acides gras libres. Des études ont été réalisées afin d'étudier l'effet de la longueur de la chaîne des acides gras sur le comportement de phase thermotropique et sur les propriétés de mélange des lipides de la couche cornée (Oguri et al., 2014).

En particulier, concernant l'acide linoléique, celui ci est essentiel à la formation de l'épiderme. Il peut former un film à la surface de la peau et s'incorporer au ciment cellulaire. Cela lui permet alors d'éviter l'évaporation de l'eau, et de limiter la déshydratation cutanée. Il participe également à la croissance et à la cicatrisation cutanée. C'est une molécule précurseur d'anti-inflammatoires. Il entre dans la composition des céramides qui font partie du ciment lipidique, jouant ainsi un rôle de protection de l'épiderme.

Les acides oléiques et gadoléiques ont des propriétés nutritives et réparatrices.

L'acide  $\alpha$ -linoléique est réputé pour renforcer les membranes cellulaires. Il s'incorpore au ciment cellulaire ce qui lui permet de réguler la perméation et l'hydratation cutanée. Ils améliorent aussi l'élasticité cutanée.

Une expérimentation a été réalisée afin de confirmer les effets des acides gras sur l'hydratation cutanée : elle constituait à supplémenter en acides gras (300 mg par jour) des rats déficients en acides gras. Les esters d'acides gras purs choisis pour l'expérience sont les suivants : acides oléique, linoléique, arachidonique et colombinique. L'expérience a été menée sur une durée de dix jours.

Les rats supplémentés en acide linoléique, arachidonique et colombinique ont vu leur perte en eau trans-épidermale diminuée par rapport à ceux d'un groupe témoin, ne bénéficiant d'aucune supplémentation. En revanche, la supplémentation en acide oléique n'a pas montré de différence sur la perte en eau. La composition en acides gras de deux sphingolipides épidermiques, l'acylglucosylcéramide et l'acylcéramide ont été déterminées. Les résultats obtenus indiquent que le rétablissement d'une faible perte d'eau trans-épidermique a été associé à l'incorporation de linoléate dans les deux sphingolipides épidermiques.

Ces résultats démontrent la fonction spécifique et essentielle de l'acide linoléique dans le maintien de la perméabilité de la barrière cutanée. (Hansen and Jensen, 1985)

Comme le reste de l'organisme, la peau est incapable de synthétiser les acides gras « essentiels », c'est pourquoi ils doivent être apportés par l'alimentation ou par des voies extérieures tels que les soins appliqués sur la peau. En particulier, l'acide linoléique appartient à la famille des oméga-6 et entre dans la composition des céramides. Il peut ainsi permettre de reconstituer les lipides épidermiques, favorisant ainsi la bonne cohésion des cellules entre elles, en limitant les pertes en eau de la peau.

### **1.2.2.2 Protéines végétales**

Dans la littérature, de nombreux auteurs reconnaissent les bénéfices de l'utilisation de substances riches en protéines dans les formulations pour des applications topiques. L'un des avantages des protéines vient de leur capacité à se lier avec l'eau au sein de la couche cornée de la peau. La plupart des dérivés protéiques employés en formulation sont issus de protéines de structure simple.

Les tensioactifs peuvent avoir des effets irritants sur la peau. Les mécanismes de ces effets négatifs produits par les surfactants par contact avec la peau et les cheveux ne sont pas connus dans le détail. Cependant, il est supposé que l'interaction et l'adsorption de ces molécules avec la kératine de la couche cornée et les cuticules des cheveux est l'étape qui amorce les dommages tissulaires. Seuls les surfactants monomériques peuvent pénétrer :

les micelles hydratées sont trop grosses pour entrer dans le fin réseau des fibres de kératine. Ainsi, la concentration en monomères tensioactifs et la concentration micellaire critiques doivent être reliés aux dommages capillaires et cutanés. Une fois que les surfactants monomériques ou les petits agrégats sont liés à la couche de kératine, d'autres évènements et transformations peuvent avoir lieu. L'effet de dénaturation partielle est basé sur la combinaison des mécanismes suivants :

- les queues carbonées des tensioactifs pénètrent au niveau des zones polaires de la kératine, ce qui remplace les interactions hydrophobes stabilisantes par des interactions ligand-segment
- la tête polaire du surfactant provoque des forces d'attraction-répulsion sur les zones chargées de la kératine, modifiant ainsi son architecture. La formation d'excès de charges positives ou négatives augmente la pression osmotique, ce qui déforme la matrice et en augmente la perméabilité.

L'ajout de dérivés protéiques aux formulations moussantes permet de réduire leurs effets négatifs en formant des complexes avec les tensioactifs au sein même de la formulation moussante. Cela induit la formation de micelles de plus grosse taille, diminuant ainsi la concentration micellaire critique du système (Teglia and Secchi, 1994).

L'usage des protéines pour des applications topiques a des origines dès l'antiquité. En particulier, les bergers erythréens utilisaient le lait de chameau pour le nettoyage de la peau et des cheveux, Cléopâtre recourait au lait d'ânesse pour sa toilette, et des pêcheurs de l'île d'Hokkaido employaient de la farine de soja pour fabriquer des masques cutanés. Les premières utilisations rationnelles de protéines dans les formulations cosmétiques datent des années 1950.

Les effets bénéfiques de l'emploi de substances riches en protéines dans des formulations cosmétiques ont rapidement été démontrés par de nombreux auteurs (Teglia et al., 1993; Turowski and Adelman-Grill, 1985). Leur capacité à lier et retenir l'eau au sein de la couche cornée de l'épiderme leur permet de maintenir un environnement capillaire et cutané plus sain. Des études approfondies ont été menées concernant les propriétés de liaison des protéines et des peptides à la peau et aux cheveux. Leur rôle en tant qu'agent conditionneur pour les cheveux a été démontré au début des années 1960. Dans les produits de maquillage, les extraits protéiques sont peut-être employés dans la plupart des galéniques : émulsions, lotions, gels et poudres.

Dans les produits capillaires, les protéines sont réputées pour améliorer la résistance et l'élasticité des cheveux, et aider à la réparation des pointes abimées. Elles permettent également de protéger les cheveux contre les effets néfastes de la chaleur et des traitements chimiques (lissage et coloration) (Goddard and Gruber, 1999).

Dans les produits d'hygiène, les protéines permettent d'améliorer la tolérance cutanée et oculaire, et limitent les effets néfastes liés à la détergence de certains produits. Le tableau suivant rapporte des exemples d'emplois de protéines dans des produits d'hygiène rincés (Goddard and Gruber, 1999) :

**Tableau 20 : Gammes de concentration de dérivés protéiques dans des produits d'hygiène**

Dérivé protéique	Fonction dans la formule	Concentration
Hydrolysats protéiques (amande, collagène, élastine, extensine, protéines de lait, protéines de soja, protéines de blé, protéines de levure)	Anti-irritant, protecteur, hydratant	0,2-5% dans les shampoings et les gels douche
Collagène, serum albumine, caséinate de sodium	Hydratant, protecteur	0,01-5% dans les shampoings et les gels douche
Potassium et sodium cocoyl hydrolysés (collagène, protéines de soie, protéines de blé)	Détergent, améliore le pouvoir moussant,	1-10% dans les shampoings et les gels douche
Alkyldimonium hydroxypropyl hydrolysé (collagène, protéines de blé)	Anti-irritant, conditionneur	1-5% dans les shampoings et les gels douche

La plupart des dérivés protéiques employés en cosmétique sont issus de protéines simples, fibrillaires ou globulaires. Les protéines plus complexes telles que les protéoglycanes ou les dérivés nucléoprotéiques sont plus rarement employées. Les extraits de protéines issus de plantes (angiospermes) ou d'animaux (mammifères, poissons) sont employés, et des protéines issues de plus petits organismes (algues, champignons) sont étudiés depuis les années 1980 .

La disponibilité et le coût étaient le principal critère pour le choix des protéines, mais la crise de l'encéphalopathie spongiforme bovine des années 1990 a remis en cause l'utilisation d'extraits d'origine animale. Cela a amené les autorités de santé et les associations de consommateurs à promouvoir l'emploi d'extraits biosourcés.

Pour être employées dans des formulations aqueuses, les protéines doivent subir des modifications permettant de les rendre hydrosolubles. Une fois sous forme hydrosoluble, elles sont plus faciles à manipuler et plus adapter pour es applications en formulation. Cette forme est obtenue par des procédés d'hydrolyse. L'hydrolyse de protéines en plus petites fractions conduit à la production de peptides pouvant avoir des effets utiles en cosmétique. Les peptides peuvent ainsi posséder des propriétés très différentes de celles de leurs protéines natives.

Les propriétés cosmétiques sont également dépendantes des structures moléculaires entre les protéines hydrolysées. Le nombre, le type et l'enchaînement des acides aminés qui composent les protéines sont les facteurs déterminant leurs propriétés biologiques. Les protéines sont toujours constituées des mêmes vingt acides aminés, mais leurs proportions respectives, ainsi que leur enchaînement va induire des différences quantitatives et qualitatives, et leurs effets sur la peau et les cheveux.

L'hydrophobicité des peptides est le paramètre critique déterminant l'efficacité en cosmétique, dépendant de la composition en acides aminés. Pour les protéines

hydrolysées, une corrélation a été observée entre l'enchaînement des acides aminés hydrophiles et hydrophobes sur la chaîne protéique.

Les dérivés protéiques sont employés dans de nombreuses formulations de soin et de maquillage. Ils sont adaptés à la plupart des formules : émulsions, lotions, gels et poudres. Les protéines insolubles ont également des usages pour des applications particulières, notamment les fibres insolubles de collagène dans les masques pour le visage, ou les poudres de soie qui peuvent être utilisées dans des poudres de maquillage.

Les protéines natives et les hydrolysats de haut poids moléculaire, tels que le collagène soluble et ses dérivés, sont réservés aux soins cutanés du fait de leurs propriétés filmogènes. Ces gros polymères sont capables de former un film colloïdal continu sur la surface de la peau, lui conférant ainsi un toucher lisse et doux. (武田 et al., 2003)

Ces protéines doivent être préservées de la chaleur et d'agents dénaturants afin d'éviter la dénaturation.

En pratique dans les formulations, quelques points sont à noter :

- il faut éviter de combiner au sein d'une même formulation des isolats protéiques de différentes sources ou fournisseurs. Leurs fonctionnalités ne s'ajoutent pas forcément, et peuvent même s'inactiver
- des mélanges avec certains extraits végétaux contenant des tannins ou d'autres polyphénols sont à éviter car ils peuvent former des agrégats insolubles avec des peptides de taille importante
- des agrégats insolubles peuvent également être formés par la combinaison de polyanions de taille importante tels que l'acide hyaluronique.

### **I.3 Procédés de fractionnement des graines oléoprotéagineuses**

Les procédés de fractionnement de graines peuvent avoir différents objectifs : obtention de l'huile ou isolement d'un actif ou d'une fraction active. Ces actifs sont ensuite valorisés dans des domaines tels que l'industrie pharmaceutique, l'agroalimentaire ou la cosmétique. Des techniques très variées peuvent être choisies, en fonction en particulier de la nature de l'actif à extraire. Ces dernières années, dans une optique de chimie verte et de réduction des quantités de solvants employés, des techniques alternatives aux techniques classiques, employant des solvants organiques, sont développées. Il peut s'agir par exemple des extractions par micro-ondes ou par ultrasons. Dans le cas des graines oléo-protéagineuses, de nombreux procédés de fractionnement sont liés à l'obtention de leur huile. Certains procédés sont directement liés à l'obtention de l'huile végétale. Il peut s'agir de procédés totalement mécaniques, comme le pressage à froid, ou de procédés d'extraction via un solvant chimique, tel que le Soxhlet. D'autres procédés couplent une

action mécanique et une action chimique afin d'avoir le meilleur rendement d'extraction en huile végétale possible.

### **I.3.1 Procédés d'obtention des huiles végétales**

Les huiles végétales majoritaires en terme de production mondiale sont les huiles d'arachide, de colza, de coton, de lin, de coco, de palme, de ricin, de sésame, de soja et de tournesol. Entre 1999 et 2007, l'augmentation de leur production a atteint 150%. En 2011, la production mondiale d'huiles végétales atteignait 154 millions de tonnes, dont 17 millions dans l'union européenne (données : Terres Inovia). En parallèle, la quantité de graines cultivées atteint 488 MT en 1999, et 672 MT en 2007. Ainsi, l'augmentation de la production d'huile a été supérieure à celle de la quantité de graines cultivées. L'industrie s'est donc adaptée et a développé des procédés permettant d'améliorer le rendement de pressage des graines (Savoire et al., 2013). Les dispositifs mécaniques destinés au pressage des graines ont des capacités très variables, de 3 kg/h à 150 T/j.

Pour cela, deux procédés majoritaires sont employés :

- Le pressage : cette méthode est employée par l'Homme depuis l'antiquité, afin d'obtenir l'huile par pression des graines, pépins ou noix.

Le pressage dit « à froid » doit être effectué à des températures inférieures à 60°C, à l'aide de presses hydrauliques. Ce procédé doit être appliqué à des graines ayant un rendement en huile minimal de 30% pour être rentable. A l'issue du pressage, l'huile végétale doit être décantée et filtrée avant d'être conditionnée dans des emballages de préférence en verre opaque afin d'en conserver les intérêts nutritionnels. L'huile dite de première pression est obtenue à l'issue de la première extraction. Une huile extra-vierge contient moins de 1% d'acidité, une huile vierge en contient moins de 3%, et une huile dite « fine » est un mélange des deux huiles précédentes. L'inconvénient majeur du pressage à froid est son rendement d'extraction, inférieur à celui obtenu lors du pressage à chaud ou de l'extraction par solvants.

Le pressage à chaud s'effectue au sein de presses, dont la température de chauffe varie entre 80 et 120°C. L'huile obtenue est dite « huile brute ».

- L'extraction par solvant : consiste à mettre en contact la matière végétale broyée avec un solvant lipophile, typiquement l'hexane ou le cyclohexane, afin d'en extraire l'huile. Cette méthode permet d'obtenir un rendement d'extraction nettement supérieur à celui du pressage. Elle est largement utilisée dans l'alimentaire. Cependant, non seulement l'emploi de solvants classés CMR (cancérigène mutagène reprotoxique) tels que l'hexane est interdite pour des applications en cosmétique biologique, mais les procédés de raffinage de l'huile qui suivent son obtention ont un impact néfaste sur la qualité de l'huile. Ces procédés de raffinage sont destinés à désodoriser l'huile, la décolorer et en éliminer certaines substances.

Dans tous les cas, l'huile obtenue peut être soumise à des post-traitements :

- Le dégommeage consiste à retirer de l'huile des composés tels que des phospholipides, des acides gras libres et des protéines, qui induiraient une instabilité et pourraient générer de la fumée et de la mousse lors de la cuisson de l'huile.
- La désodorisation permet de produire une huile végétale sans goût et sans odeur, et permet également de limiter son oxydation après conditionnement.
- La décoloration a pour but de produire une huile moins colorée que l'huile brute.
- Le raffinage consiste à neutraliser les acides gras de l'huile par ajout de soude ou tout autre composé caustique, et de les transformer ainsi en savon. Cela va permettre de limiter les phénomènes d'oxydation liés au vieillissement de l'huile.
- L'hydrogénation des huiles est effectuée au niveau de leurs insaturations. Cela limite leur vieillissement mais produit un beurre à la place de l'huile végétale initiale.

Ainsi, les huiles végétales destinées à des applications cosmétiques sont extraites par pression à froid, et l'huile subit une simple étape de filtration mécanique sur filtres presse.

Les procédés industriels appliqués aux graines pour en extraire l'huile végétale sont résumés dans la figure suivante.

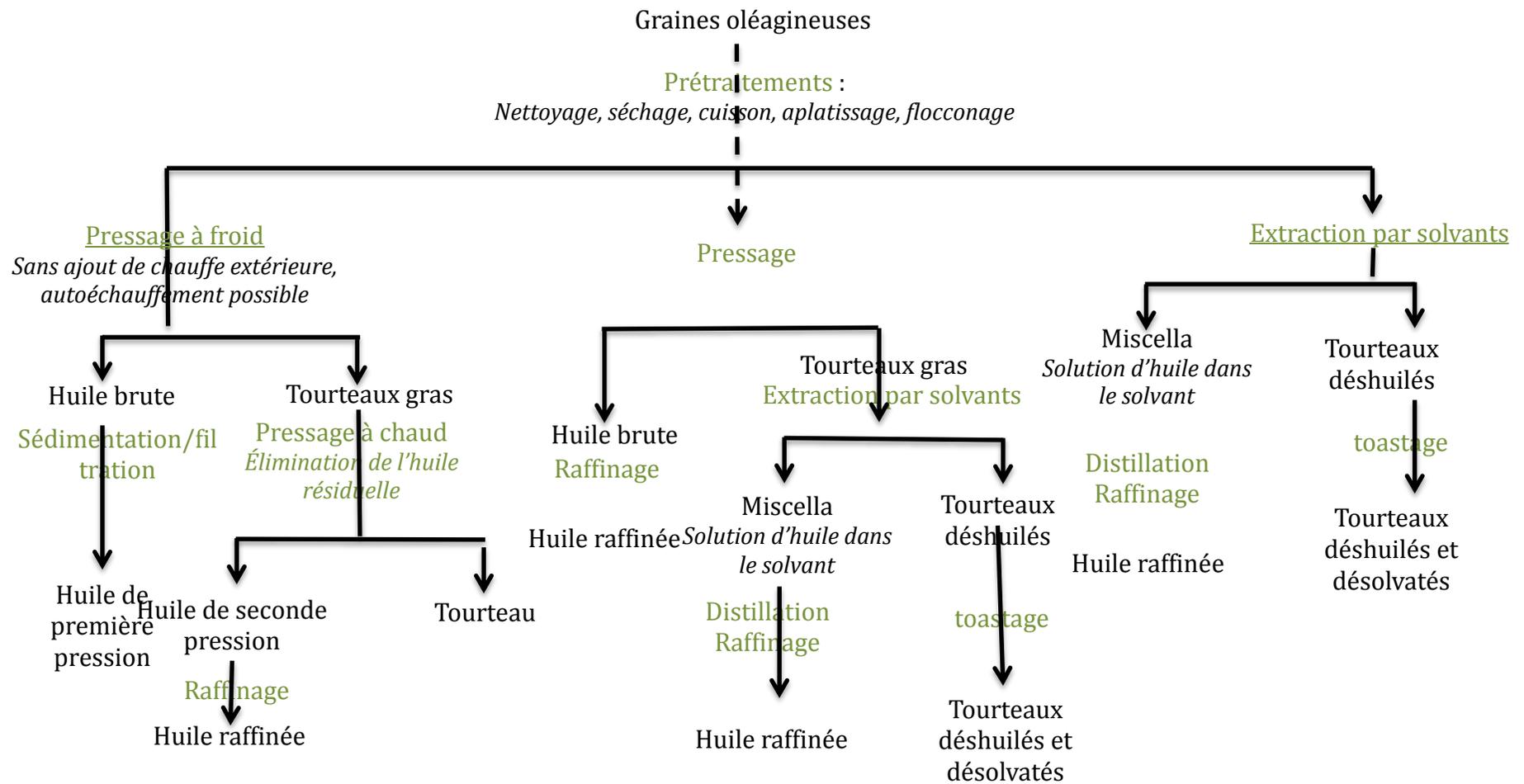


Figure 27 : Procédés d'obtention d'huile à partir de graines oléagineuses. Adapté de (Gros, 2005; Rombaut, 2013)

Classiquement, le pressage à froid des graines s'effectue sur des presses monovis. L'avantage de ce type d'appareil est leur mise en œuvre relativement simple. Cependant, pour une monovis donnée, les paramètres variables sont assez limités :

- Diamètre de l'ajutage, buse permettant la sortie du tourteau. Typiquement, plus la graine est petite, peu fibreuse et difficile à presser, plus le diamètre de la buse choisie sera petit.
- La distance entre la vis et l'ajutage.
- La température, par le biais d'un anneau chauffant généralement présent sur les presses monovis, mais dont la température n'est pas forcément réglable.
- La vitesse de vis.

Des travaux récents ont été menés afin d'optimiser le pressage des graines de coriandre, en modulant le diamètre de l'ajutage ainsi que la distance entre la vis et l'ajutage (Sriti et al., 2011). Le meilleur rendement a été obtenu avec un diamètre de 9 mm et une distance entre la vis et l'ajutage de 3 mm.

D'autres travaux ont été réalisés sur les graines de jatropha (Chapuis et al., 2014), dans lequel les influences de la température, du pré-traitement des graines (entières, broyées ou décortiquées), de la vitesse de vis et du diamètre de l'ajutage sur l'efficacité de pressage et la consommation d'énergie liée au pressage ont été évaluées. Il a été noté qu'une température inférieure à 75°C ne permettait pas d'exprimer d'huile, ce qui confirme la nécessité de l'emploi d'un anneau chauffant pour amorcer celle-ci. La conclusion principale de ces travaux est qu'un prétraitement de la graine tel qu'un décortiquage ou un concassage n'améliore pas franchement le rendement de pressage.

Des investigations ont été menées sur l'expression des pépins de raisin afin d'étudier l'influence du préchauffage (90 ou 120°C), de la vitesse de vis (40 ou 70 RPM) et du diamètre de l'ajutage sur le rendement d'huile et sa teneur en composés phénoliques (Rombaut et al., 2015).

L'extraction de l'huile végétale pour des applications commerciales passe généralement par deux étapes (Rombaut, 2013):

- un pressage des graines riches en huile, par le biais d'une presse hydraulique ou d'une presse monovis
- une extraction par solvant de l'huile résiduelle du tourteau. En effet, certaines utilisations postérieures des tourteaux nécessitent en effet une teneur en huile inférieure à 1%.

Pour limiter ces étapes, les procédés d'extraction continue, généralement en presse monovis, sont d'une importance grandissante. Cependant, les phénomènes de friction entre la matière première et la vis ou son fourreau, inhérents au procédé et nécessaires au pressage des graines, entraînent une consommation d'énergie élevée, mais également une surchauffe et une dégradation de la qualité de l'huile.

Les procédés d'extrusion bi-vis pourraient être une solution à ces problèmes car ils permettent d'améliorer le mélange et le broyage des graines lors de l'extrusion. Ces procédés sont également plus économes en énergie (Uitterhaegen et al., 2015).

### **I.3.2 Procédés d'extraction aqueuse en batchs**

#### **I.3.2.1 Exemples et généralités**

Des travaux font état de fractionnement in-situ de la graine de colza, souvent liés à la libération des oléosomes au sein d'une phase aqueuse. Les oléosomes sont les réservoirs naturels de triglycérides et de vitamines de la graine, dont la fonction est de protéger l'huile du rancissement et de l'oxydation. Ils sont entourés d'une couche de phospholipides, stabilisée par des oléosines, des protéines spécifiques, très hydrophobes.

L'utilisation de lipases endogènes conduit à l'hydrolyse des triglycérides afin d'obtenir la libération des acides gras. La lipase choisie, issue de *Candida rugosa* a pour avantages une non-stéréospécificité et une meilleure efficacité à l'interface huile/eau. Les essais ont été effectués au sein d'une suspension aqueuse de graines de colza par sonication ou par homogénéisation haute pression. Les acides gras sont séparés sous forme d'émulsion, après centrifugation du milieu d'hydrolyse. Les émulsions sont par la suite démixées, en particulier via l'utilisation d'éthanol (Mechling, 2002).

Des travaux plus récents ont mis en œuvre un procédé intégré destiné à un fractionnement aqueux des graines sans ajout d'émulsifiant, en partant du constat que la graine en elle-même contient l'huile et les agents émulsifiants nécessaires à la formation d'une émulsion. Le fractionnement aqueux direct de graines conduit à la formation d'émulsions via la libération et la dispersion des oléosomes de colza au sein de la phase aqueuse (Vaca Medina, 2010).

Le fractionnement aqueux est la méthode traditionnellement employée pour en extraire les mucilages des graines de lin, mais des travaux font état de l'ajout de micro-ondes et d'ultrasons au sein du milieu aqueux (Fabre et al., 2015b). Ces méthodes permettent d'améliorer les rendements d'extractions tout en diminuant les ratios liquide/solide employés, et donc la consommation d'eau.

Les extractions de mucilages par ultra-sons également employées afin d'éliminer les mucilages, en vue de la libération des oléosines de graines de Lin. Les oléosines sont libérées par fractionnement aqueux des graines dont les mucilages ont été éliminés. Les graines, en suspension dans l'eau distillée à une concentration de 15%, sont mixées sous l'action d'un homogénéiseur appliquant une haute contrainte de cisaillement, pendant 10 minutes à 7000 RPM. L'extrait obtenu subit deux cycles d'homogénéisation haute pression à 500 bars, l'extrait ainsi homogénéisé est centrifugé 10 minutes à 15000g. Une émulsion est ainsi isolée, ainsi qu'une phase aqueuse et un culôt constitué de résidus de la graine. L'émulsion obtenue est constituée de 70% d'eau, 25% de lipides et 3,5% de

protéines. Ce procédé permet d'extraire les deux tiers de l'huile de la graine (Fabre et al., 2015a). Les émulsions ainsi obtenues sont stabilisées par les phospholipides et les protéines membranaires libérées par le procédé.

Toujours dans le but de diminuer les quantités d'eau employées, des procédés alternatifs de fractionnement de graines, telles que le lupin, sont développés. Les graines de lupin sont employées comme substrat modèle du fait de leur richesse en huile et en protéines. Des étapes de concentration et la combinaison de procédés de fractionnement sec et aqueux permettent ainsi de diminuer l'impact environnemental du procédé (Berghout et al., 2015). L'objectif de ces travaux de fractionnement de la graine de lupin est l'obtention de fractions protéiques concentrées.

### **I.3.2.2 Procédés de fractionnement en batchs destinés à l'extraction d'huile**

Prenons les exemples du fractionnement aqueux du Neem et du tournesol en extrusion bi-vis (Evon, 2008; Faye, 2010). Dans ces cas là, le fractionnement aqueux en batch permet de déterminer des conditions de température, de ratio liquide/solide et de post-traitements des extraits obtenus. L'inconvénient majeur de ces méthodes est qu'elle ne permet pas de séparation liquide/solide in-situ. Elle nécessite donc des étapes postérieures de filtration.

Les procédés de fractionnement aqueux des graines de Tournesol et de Neem ont suivi les mêmes schémas :

- Une première étape d'extraction liquide/solide qui consistait à mettre en contact les graines avec de l'eau au sein d'un réacteur agité ou d'un mixeur du type Waring Blendor.
- Une étape de centrifugation afin d'isoler le culôt insoluble.
- Le surnageant est filtré, pour en isoler le gâteau de filtration. Le gâteau et le culot insoluble correspondent à des résidus solides issus de la graine, insolubles dans la phase aqueuse.
- La phase liquide subit ensuite une homogénéisation haute pression.
- Elle est ensuite centrifugée et filtrée. Cette dernière étape de filtration permet de séparer un dernier culot insoluble d'une phase aqueuse et d'une émulsion hydrophobe.

Les ratios liquide/solide employés sont de 4 pour le Neem et 5,67 pour le Tournesol. Le rendement d'extraction des lipides du Tournesol est de l'ordre de 47%, et de 34% de protéines. 86% des lipides extraits sont retrouvés sous forme émulsifiée, dans la phase hydrophobe. Dans le cas du Neem, les phases aqueuses et hydrophobes contiennent 54% des lipides et 48% des protéines initialement présentes dans la graine.

Des travaux font état d'un fractionnement aqueux de tourteaux de lin postérieurs à un pressage mécanique des graines (Gros, 2005; Li et al., 2009). Dans ce cas là, l'étape d'extraction aqueuse a pour but d'améliorer l'épuisement en huile des tourteaux obtenus. Cette étape est assistée par DEHT : décharges électriques de haute tension. Cette étape permet d'obtenir des émulsions huile dans eau, stabilisées par les phospholipides et les mucilages du tourteau, dont l'extraction est améliorée par les décharges. Simultanément à cette extraction, l'huile du tourteau est extraite et divisée en gouttelettes en raison des ondes de pression et du phénomène de cavitation créé par les décharges électriques. 500 impulsions permettent d'extraire 45% de l'huile présente dans le tourteau.

### **I.3.3 Fractionnement des graines oléo-protéagineuses en extrudeur bi-vis**

#### **I.3.3.1 Généralités sur l'extrusion**

L'extrusion bi-vis est utilisée dans l'agro-alimentaire pour la cuisson extrusion de céréales, biscottes et snacks, mais également pour la fabrication de nourriture pour l'alimentation animale. Elle est également utilisée dans l'industrie du plastique et des matériaux. L'utilisation de l'extrusion bi-vis est en plein développement dans de nombreux domaines d'applications, dont celui de la transformation de la biomasse. Ceci est lié à la grande versatilité de l'appareil, et au fait que l'on puisse réaliser plusieurs opérations différentes sur la matière première biosourcée au sein d'un même appareil. Plusieurs types de contraintes peuvent être appliquées sur la matière au sein de l'extrudeur bi-vis :

- Des contraintes thermiques liées au fait que les modules de l'extrudeur sont thermo-régulés.
- Des contraintes mécaniques, liées au profil de vis. Le type de vis, leur longueur ainsi que leur agencement (angle entre les éléments de vis) permettent d'appliquer des contraintes de cisaillement sur la matière, ou de la détendre ou de créer un bouchon dynamique.
- Des contraintes chimiques liées à la nature des solvants ou réactifs introduits ainsi qu'à la position du ou des points d'injection.

Ainsi, l'extrudeur bi-vis peut être qualifié de réacteur thermo-mécano-chimique.

L'extrudeur bi-vis est constitué de deux vis parallèles et identiques situées au sein d'un fourreau modulable. Le fourreau est lui-même divisé en un certain nombre de modules, thermorégulés, et indépendants les uns des autres. Les modules sont assemblés entre eux par des colliers. Les éléments de vis, de longueur variable, sont empilés sur les arbres de vis cannelés, tournant en même temps et à la même vitesse. Le fourreau est terminé par une filière de forme variable, permettant de mettre en forme la matière dans les applications en plasturgie ou en matériaux.

Le profil de vis, défini par l'agencement des éléments de vis entre eux (type d'élément de vis, angle, longueur et pas de vis) est très modulable en fonction de la transformation de la matière souhaitée au sein de l'extrudeur. L'extrudeur bi-vis permet également de réaliser au sein d'un même réacteur, plusieurs opérations sur la matière (Rigal, 1997):

- convoyage
- cisaillement et broyage
- cisaillement et détente
- chauffage et refroidissement
- introduction de liquide(s)
- introduction de solide(s)
- mélange
- réaction
- extraction liquide/solide
- entraînement à la vapeur
- séparation liquide/solide
- extraction de vapeur
- séchage
- extrusion/cuisson

### I.3.3.2 Principales applications en tant qu'outil d'extraction de la matière végétale

Depuis le milieu des années 1990, la technologie d'extrusion bi-vis, jusque-là limitée à des applications dans les domaines de l'agro-alimentaire et des matériaux, a été employée pour des valorisations de co-produits agricoles divers.

Le tableau suivant recense des travaux de fractionnement de la matière végétale, et plus particulièrement des travaux d'extraction en réacteur thermo-mécano-chimique.

**Tableau 21 : Extraction de composés végétaux en extrusion bi-vis**

Type d'extraction / Molécules extraites	Matière première	Références
Extraction de l'huile	Graines de colza  Graines de tournesol  Graines de neem Graines de coriandre Graines de jatropha Tournesol plante entière	(Bouvier and Guyomard, 1997; Guyomard, 1994) (Isobe et al., 1992)(Guyomard, 1994)(Lacaze-Dufaure, 1998) (Kartika et al., 2005)(Evon et al., 2007) (Faye, 2010) (Uitterhaegen et al., 2015) (Evon et al., 2013) (Evon, 2008)
Extraction de polysaccharides	Paille et son de blé	(Maréchal, 2001)

Extraction d'hémi-celluloses et de lignines	Paille de blé	(Magro, 1995)
Extraction d'hémi-celluloses	Paille et son de blé Sorgho Bois de peuplier et sorgho Bois de peuplier	(Zeitoun, 2011) (Manolas, 1993) (N'Diaye, 1996) (Prat, 1998)
Extraction de pectines	Pulpe de betterave	(Jorda, 2003)
Extraction de protéines	Graines de tournesol Tournesol plante entière Luzerne	(Silvestre et al.) Evon (Colas, 2012)
Production d'hémi-celluloses	Paille et son de blé	(Jacquemin, 2012)
Obtention d'extraits polyphénoliques	Bouleau et pin maritime	(Celhay et al., 2014)
Fractionnement aqueux	Graines de mélilot	(Rigal, 2015)

### I.3.3.3 Expression d'huile en extrudeur bivi

Du fait de la grande modularité du réacteur-extrudeur bi-vis, de nombreux essais de pressage de graines ont été réalisés. Le profil de vis, en particulier les zones de contrainte, ont été choisies selon des critères tels que la dureté des graines, leur teneur en fibres, et bien sûr leur teneur en huile végétale. En particulier, l'utilisation de l'extrusion bi-vis s'est avérée opportune dans le cas où le pressage des graines nécessitait l'ajout de matière végétale inerte (grignons d'olives, coques de graines de tournesol,...) afin de former le bouchon dynamique. Dans l'extrudeur bi-vis, les zones de pressage formées par les contrefilets contraignent la matière à former un bouchon dynamique (Isobe et al., 1992).

Des étapes de préparation de la matière, telles que la trituration, peuvent être effectuées au sein de l'extrudeur bi-vis, en amont de zones de pressage.

Le tableau suivant regroupe des exemples d'utilisation d'extrudeurs bi-vis pour le pressage de graines. La plupart des travaux cités ont été réalisés au laboratoire de chimie agro-industrielle de Toulouse. Ce tableau est issu de la thèse de Mamadou Faye (Faye, 2010), il a été actualisé.

Tableau 22 : Expression d'huile en extrudeur bi-vis

Nature des graines employées	Type d'extrudeur et configuration	Rendements d'extraction en huile	Références
Tournesol : graines entières et décortiquées	-presse bi-vis contra-rotative de type Suchiro Iron Works	-75% : graines entières 94% : graines décortiquées	(Isobe et al., 1992)
Tournesol et colza	BC 45 équipé d'une filière	85 %: graines de colza 86% : graines de tournesol	(Guyomard, 1994)
Colza, séchées ou non	BC 45 constitué d'une partie bi-vis, d'une partie double mono-vis et d'une filière	-75% pour les graines non séchées -85% pour les graines séchées	(Bouvier and Guyomard, 1997)
Tournesol oléique concassées	BC 21	-70%	(Lacaze-Dufaure et al., 1996)
Tournesol classique et oléique	BC 45	-70% : tournesol oléique -85% : tournesol classique	(Amalia Kartika et al., 2010; Kartika et al., 2005)
Jatropha	BC 21	-71%	(Evon et al., 2013)
Neem	BC 21	-63%	(Faye, 2010)
Coriandre	BC 21	-47% (Uitterhaegen et al., 2015) -51% (Sriti et al., 2012)	(Sriti et al., 2011, 2012) (Uitterhaegen et al., 2015)

### I.3.3.4 Extraction solide/liquide de graines en extrudeur bi-vis

Pour augmenter les rendements d'extraction en huile, et en particulier limiter la teneur en huile résiduelle dans les tourteaux, l'introduction de solvants organiques a été étudiée (tableau 20). Cette dernière a permis d'ajouter une étape d'extraction liquide/solide à l'étape de pressage des graines.

Comme pour le pressage des graines, de nombreuses expériences d'extraction d'huile assistée par solvant en extrusion bi-vis ont été réalisées au laboratoire de chimie agro-industrielle de Toulouse. Ces essais sont décrits dans le tableau suivant, issu de la thèse de Mamadou Faye (2010).

Tableau 23 : Fractionnement assisté par solvants de graines en extrudeur bi-vis

Nature des graines employées	Type d'extrudeur et solvant	Rendements en huile extraite	Références
Tournesol oléique	BC 21 Injection de 2-ethylhexanol	-90%	(Lacaze-Dufaure et al., 1996) (Lacaze-Dufaure, 1998)
Tournesol oléique et classique	BC 45 Injection d'esters méthyliques de tournesol au début du troisième module	-85% : tournesol oléique -90% : tournesol classique	(Kartika et al., 2005)
Graine de tournesol classique	BC 45 Injection d'esters méthyliques de tournesol au début du cinquième module	-70% de rendement en huile exprimée en 1ère zone de filtration -90% de rendement global (huile exprimée et huile extraite)	(Amalia Kartika et al., 2010)

### I.3.3.5 Fractionnement aqueux de graines en extrudeur bivis

En plus du fractionnement assisté par des solvants organiques, l'extraction aqueuse de graines a été étudiée. Dans ce cas là, l'huile est extraite sous forme émulsifiée dans l'eau, au sein du filtrât. Des solvants tels que l'éthanol sont ensuite employés pour démixer l'émulsion et en récupérer l'huile végétale. L'avantage présenté par cette méthode est l'aspect « chimie verte » dans lequel on évite l'emploi d'un solvant organique. L'utilisation de l'eau permet également d'envisager d'utiliser les émulsions en tant que telles, sans les déstabiliser pour en récupérer l'huile.

Dans tous les cas, les extrudeurs employés se divisent en plusieurs zones :

- Une zone d'alimentation, au sein de laquelle la matière première est introduite par le biais d'une trémie et d'un doseur
- Une zone de broyage, permettant le fractionnement de la graine et le pressage de l'huile végétale
- Une zone d'extraction liquide/solide, au sein de laquelle l'eau ou le solvant employé pour l'extraction est introduit

Dans les exemples développés ci-après, l'ajout de l'eau sert de vecteur pour l'extraction de l'huile, ou de composés bioactifs tels que l'azadirachtine du neem. Dans le cas du mélilot, l'introduction d'eau permet l'extraction du réseau polysaccharidique mucilagineux.

Le premier exemple décrit au sein du tableau concerne le fractionnement aqueux des graines de tournesol oléique. L'objectif était l'épuisement maximal en huile. Pour cela, deux étapes d'extraction ont été nécessaires : les graines entières ont subi une première étape de pressage en extrudeur bi-vis, et les tourteaux gras obtenus en tant qu'extrudats de cette étape ont été réintroduits dans l'extrudeur bi-vis pour subir une seconde étape de fractionnement par extraction aqueuse afin de maximiser les rendements cumulés en huile. Lors de cette deuxième étape appliquée aux tourteaux, des résidus lignocellulosiques sont introduits afin d'augmenter l'efficacité du pressage.

Le principe d'extraction bi-étagée a été ensuite étudié, sur les graines de tournesol classique, en un seul passage dans l'extrudeur, équipé dans ce cas de 2 zones de filtration. De la paille de blé, solide inerte, a aussi été introduite au niveau de la deuxième zone d'extraction afin de former le bouchon dynamique et d'assurer une séparation solide/liquide efficace. .

Ces travaux ont été poursuivis par l'extraction aqueuse directe des graines de tournesol, sans mise en œuvre d'une étape de pressage. L'introduction d'une fibre lignocellulosique inerte telle que la paille de blé ou l'écorce de tige de tournesol assure la séparation solide/liquide. Le filtrat issu de ces essais est une émulsion huile/eau.

Enfin, le procédé de fractionnement aqueux a été appliqué avec succès à la plante entière de tournesol, conduisant à un extrait sous forme d'émulsion huile/eau.

Les graines de Neem, plus dures et fibreuses se suffisent à elles mêmes pour assurer la séparation solide/liquide au niveau du bouchon dynamique. Les graines de Neem présentent une problématique différente : contrairement aux graines de tournesol, ce n'est pas l'extraction de l'huile végétale qui est visée, mais celle d'un actif insecticide, l'azadirachtine.

Tableau 24 : Fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis

Nature de la matière première	Type d'extrudeur bi-vis et configuration de la machine	Rendements en lipides	Remarques	Références bibliographiques :
Graines de tournesol oléique	BC 45 Pressage des graines de tournesol puis fractionnement aqueux des tourteaux	-80% en huile exprimée -86% en huile exprimée et extraite	2 étages d'extraction : - expression des graines -extraction aqueuse des tourteaux gras issus de la 1ere étape	(Evon, 2008) (Evon et al., 2009)
Graines de tournesol classique	BC45 : pressage des graines (modules 1-4) et fractionnement aqueux des tourteaux (modules 5-7)	-entre 68 et 78% : en huile exprimée et huile extraite	Introduction de paille de blé pour assurer la formation du bouchon dynamique	(Evon, 2008)
Graines de tournesol classique	BC 45 Extraction aqueuse Zones d'alimentation et de broyage, puis introduction d'eau avant la zone d'extraction liquide/solide. Introduction de paille de blé en aval de la pompe et en amont de la zone de séparation liquide/solide	-54,5%	Injection de paille ou d'écorce de tige de tournesol pour faciliter la formation du bouchon dynamique.	(Evon et al., 2007)
Tournesol plante entière	BC 45 Extraction aqueuse	-33% dans la phase hydrophobe supérieure -11% dans la phase hydrophobe inférieure	Conditions proches de celles employées pour le fractionnement aqueux de graines.	(Evon, 2008)
Graines de neem	BC 21 ou BC 45 Extraction aqueuse Pour les essais BC45, des disques malaxeurs bo-	BC 21 : rendement d'expression maximal de 50% dans l'émulsion	BC 21 : Introduction de l'eau au niveau du module 4. Température = 60°C Ratio liquide/solide : 1 -2,1	(Faye, 2010)

	lobes ont été ajoutés au module 5, en aval de l'introduction d'eau, afin d'intensifier le mélange sous cisaillement	BC 45 : rendement d'expression maximal de 55% dans l'émulsion et 72% dans le tourteau.	La vitesse de vis : 200- 300 RPM.  BC 45 : le ratio liquide/solide : 1-2 la vitesse de vis 50-100	
Graines de mélilot	BC21 Introduction de l'eau au module 4, en aval d'une zone de mélange constituée de disques malaxeurs monolobes disposés avec un pas de -45°		Température = 50°C Ratio Liquide/Solide=2,7-3,9 Vitesse de vis = 250 RPM	(Rigal, 2015)

## I.4 Conclusion

La recherche de nouveaux émulsifiants est un challenge important dans l'industrie de la cosmétique. Les graines, ressources renouvelables et hautement diversifiées, nous paraissent comme une matière première idéale pour la formulation d'émulsions, du fait de leurs compositions. En effet, l'huile végétale constitue une des phases des émulsions, et les protéines ont des propriétés émulsifiantes.

L'analyse des données de la littérature montre que les travaux menés sur le fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis présentent un grand potentiel en terme de production continue d'émulsions, lequel reste cependant à démontrer pour les graines sélectionnées, qui sont le colza, le chanvre, le cardon, le pastel et le lin.

De ce fait, les travaux développés au cours de cette thèse s'articulent autour de plusieurs axes :

- Le choix des graines :

Elles doivent être disponibles dans la région Midi-Pyrénées, et riches en fractions lipidiques, protéiques et polysaccharidiques d'intérêt. Notre choix pour ces travaux s'est porté sur le colza, le chanvre et le cynara du fait de leur disponibilité, mais également du fait de leur haut potentiel en huile végétale et en protéines. Le pastel a également été choisi du fait de sa spécificité régionale. Les mucilages issus des graines de lin par extraction aqueuse nous apparaissent comme des candidats de choix en tant qu'épaississants naturels dans les émulsions.

Pour rappel, les graines choisies présentaient les caractérisations suivantes :

Tableau 25 : Caractérisation des graines choisies (données bibliographiques)

Graine	Colza	Chanvre	Cardon	Pastel	Lin
Famille	<i>Brassicaceae</i>	<i>Cannabaceae</i>	<i>Asteracées</i>	<i>Brassicacées</i>	<i>Linacées</i>
Humidité relative (%)	6-9	6-7	5-7		5
Huile (% M.S.)	38-50	31-36	25		8-20 38-45
Protéines (% M.S.)	36-44	23-25	21		10,5-31
Fibres (% M.S.)	11-16	28-34	40		28-35
Cendres minérales (% M.S.)	7-8	6	4-5		4
Mucilages (% M.S.)					2-7

La littérature ne dispose que de très peu de données sur la composition intrinsèque des graines de Pastel.

- Les différents types de fractionnement pouvant être mis en jeu
  - L'expression à froid :

:

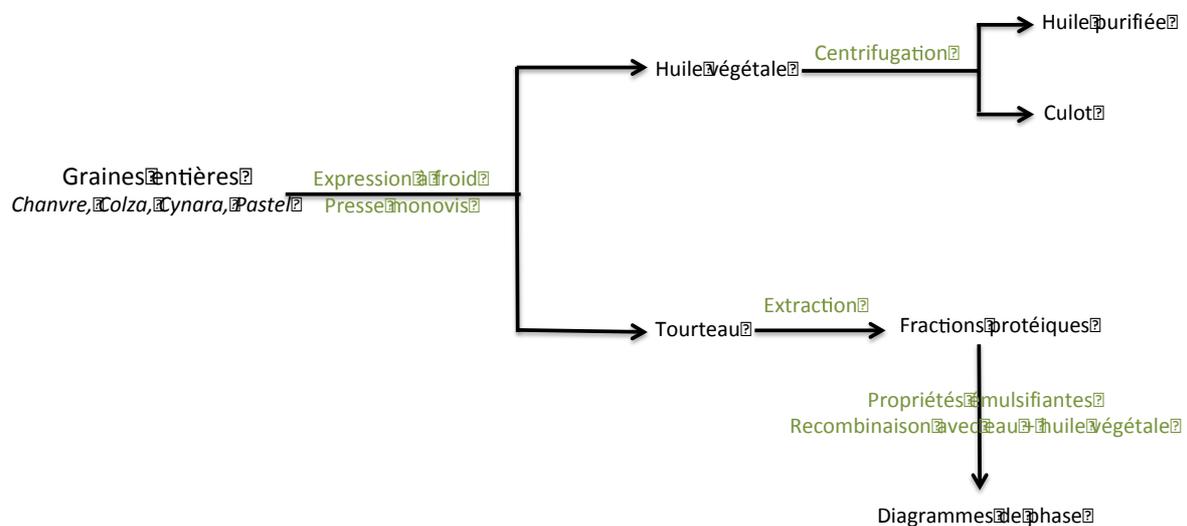


Figure 28 : Schéma de fractionnement des graines

Ce premier type de fractionnement est destiné à l'obtention des fractions lipidiques des graines. Les tourteaux obtenus sont valorisés via l'obtention des fractions protéiques. Les propriétés émulsifiantes de ces dernières seront évaluées via le tracé de diagrammes ternaires.

➤ L'extraction liquide/solide en batchs

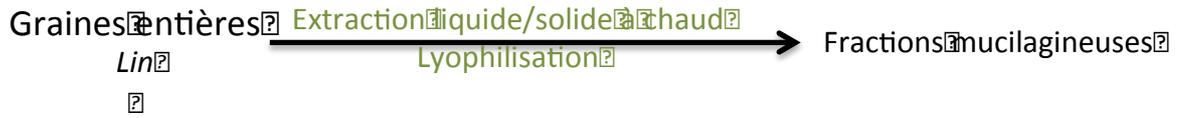


Figure 29 : Cas particulier des graines de lin

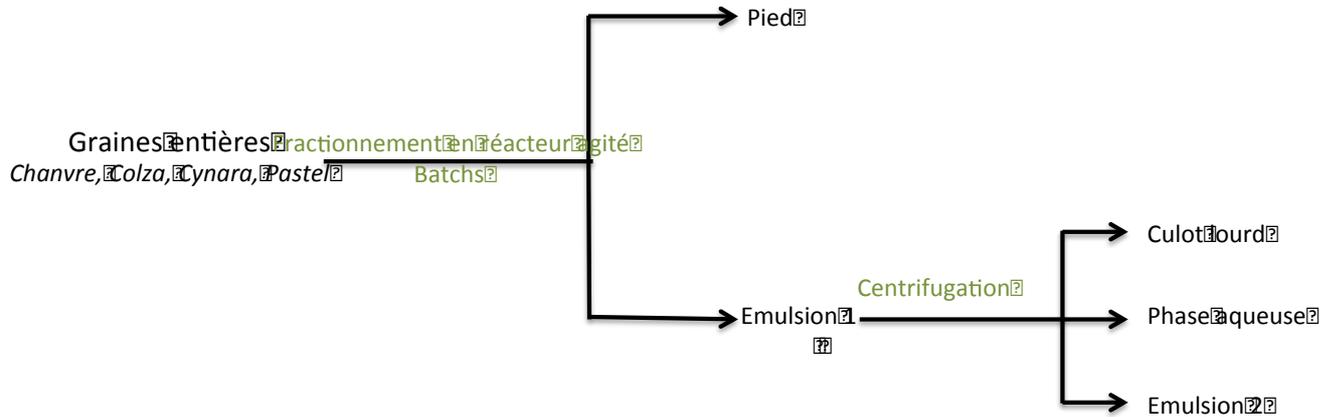


Figure 30 : Fractionnements aqueux de graines en batchs

Concernant les graines de lin (figure 29), l'extraction liquide/solide a pour but de libérer les mucilages qu'elles contiennent. Les autres graines choisies (figure 30) subiront un fractionnement aqueux en réacteur batch agité afin d'évaluer les tendances de leurs comportements face à ce type de contraintes, et d'étudier la nature et les rendements des différentes fractions obtenues.

➤ Extraction par extrusion bi-vis

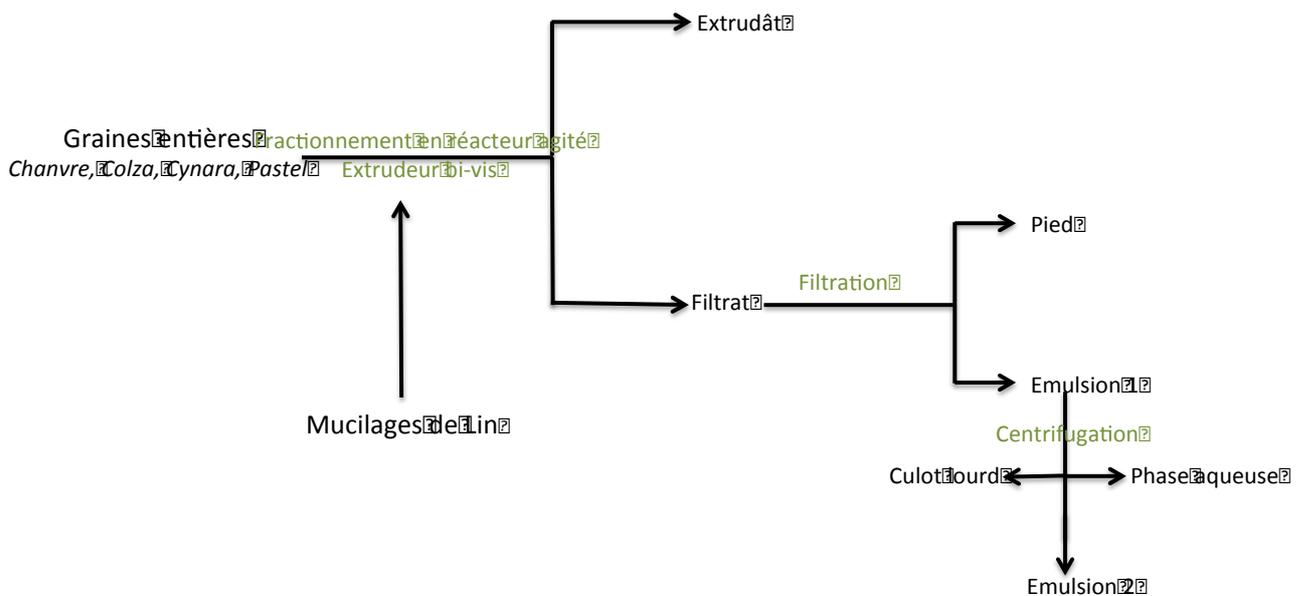


Figure 31 : Schéma du fractionnement aqueux par extrusion bi-vis de graines entières

Ce dernier procédé, mis en place en réacteur bi-vis, est une extension du procédé batch, dans un but de production continue des fractions d'intérêt. Nous envisageons également de coupler les procédés entre eux, notamment celui correspondant à l'obtention des mucilages de lin avec celui correspondant à l'extrusion bi-vis, en incorporant les mucilages lyophilisés dans la phase aqueuse extractante.

Ainsi, un certain nombre de possibilités s'ouvrent à nous quant au fractionnement des graines. Cependant, l'objectif final des travaux étant d'incorporer les fractions obtenues au sein de formulations cosmétiques, les travaux vont se focaliser sur le fractionnement aqueux des graines précédemment décrites.

Après avoir caractérisé les graines choisies, nous étudierons les propriétés émulsifiantes de leurs fractions protéiques par le biais de diagrammes de phases. Nous décrirons également le procédé employé pour l'obtention des fractions mucilagineuses. Nous étudierons également le fractionnement aqueux des graines en vue d'obtenir des émulsions, ainsi que la caractérisation physico-chimique des émulsions et leurs utilisations potentielles en formulation cosmétique.

# Chapitre II : Caractérisation physico-chimique des graines utilisées et propriétés fonctionnelles de certaines fractions



## II. Caractérisations physico-chimiques des graines utilisées et propriétés fonctionnelles de certaines fractions

Le chapitre précédent nous a confortés dans l'idée que l'intérêt de l'utilisation des graines résidait dans la variété de leur composition.

Pour ces travaux, le choix des matières premières s'est porté sur des graines oléoprotéagineuses. En plus d'être des ressources renouvelables et facilement disponibles, aussi bien issues d'agriculture conventionnelle que de l'agriculture biologique, elles présentent des compositions très variées. Les graines de chanvre, de colza et de cardon ont été choisies du fait de leur grande disponibilité dans la région Midi-Pyrénées, mais également du fait de leurs complémentarités en composition en huile et en protéines. La graine de pastel a été choisie du fait de son aspect très « local », car sa culture originelle, destinée à l'obtention du « bleu de pastel » est typique du triangle d'or situé entre Toulouse, Albi et Carcassonne.

Enfin, les graines de lin ont été sélectionnées du fait de leur teneur en polysaccharides mucilagineux, réseau polysaccharidique libéré lors de leur contact avec l'eau chaude (60°C). Ces derniers seront exploités pour la stabilisation des émulsions, obtenues avec les graines précédemment citées.

Ce chapitre s'articulera autour de plusieurs parties.

Dans un premier temps, nous étudierons la composition chimique des graines sélectionnées, ainsi que l'expression de leur huile végétale et la composition de celle-ci. Nous discuterons également de leurs activités biologiques, en se focalisant sur leurs propriétés antioxydantes.

Dans un second temps, nous nous pencherons plus spécifiquement sur les fractions protéiques des graines à travers l'obtention de pseudos-isolats, et en étudiant leurs propriétés émulsifiantes, sous forme de diagrammes de phases.

Enfin, des procédés de fractionnement en batchs seront appliqués aux graines de chanvre, de colza, de cardon et de pastel désiliquées. L'intérêt étant de tester le comportement des graines face à ce type de contrainte en milieu aqueux. Les graines de lin subiront un processus d'extraction spécifiquement destiné à la libération de leurs fractions mucilagineuses.

### II.1 Matières premières employées

Les graines de chanvre, *Cannabis sativa*, employées ont été gracieusement fournies par la coopérative agricole Euralis, à Grenade (31). Elles sont de forme arrondie, d'une longueur ne dépassant pas 5 mm. La couleur du lot dont nous disposons est marron clair.



Figure 32 : Photos des graines de chanvre employées

Les graines de colza, *Brassica Napus*, et de cardon, *Cynara Cardunculus*, ont été gracieusement fournies par la coopérative agricole l'épi salvagnacois, à Salvagnac (81). Les graines de colza sont de forme arrondie, de diamètre compris entre 2 et 3 mm. Elles sont de couleur noire.



Figure 33 : Photos des graines de colza employées

Les graines de cardon employées étaient de la variété « pein blanc inerme ». Les graines sont allongées, d'une longueur approximative inférieure à 1 cm. Leur couleur est de grise à marron clair.



Figure 34 : Photo des graines de cardon employées

Les graines de pastel, *Isatis tinctoria*, ont la particularité d'être contenues au sein de siliques fibreuses. Celles qui ont été employées pour ces études ont été cultivées par la société Sirius Bio, à Cambounet sur le Sor (81). Une fois désiliquées, les graines sont de couleur jaune orangée, de forme allongée, de longueur maximale 2 à 3 mm.



Figure 35 : Photo des graines de pastel dans leurs siliques employées



Figure 36 : Photo des graines de pastel désiliquées employées

Les graines de lin, *Linum usitatissimum*, utilisées lors de ces travaux ont été achetées à la coopérative agricole Lin 2000, située à Grandvilliers (60). Ces graines étaient de la variété oléagineux, marquise de printemps. Les graines de lin sont de forme oblongue, aux extrémités pointues. Leur longueur est de l'ordre de 7 à 8 mm.



Figure 37 : Graines de lin

## II.2 Caractérisation des matières premières

### II.2.1 Composition des matières végétales

#### II.2.1.1 Teneurs en matière sèche et en matière minérale

La teneur en matière sèche des graines est déterminée par étuvage à 105°C durant 12h. Le protocole détaillé est décrit dans la partie expérimentale (P.E.1.1).

Typiquement, les graines possèdent une teneur en humidité comprise entre 6 et 8% de leur masse brute, et une teneur en matière minérale maximale à 5% par rapport à la matière sèche. Les siliques, enveloppes fibreuses des graines de pastel, présentent une teneur en matière sèche supérieure à celle des graines.

Les graines sont stockées au sein de futs étanches, dans un entrepôt dont la température n'est pas régulée. Sauf indication contraire, dans la plupart des cas les caractérisations et manipulations liées au fractionnement des graines sont effectuées sur les graines brutes, non préalablement séchées. La plupart des caractérisations nécessitent une première étape de broyage de la matière.

Tableau 26 : Teneurs en matière sèche et matière minérale des graines

Graine	Teneur en matière sèche (%) <i>Norme NF V 03-903</i>	Teneur en matière minérale (% M.S.)
--------	---	--

		Norme NF V 03-922
Chanvre <i>Cannabis sativa</i>	93,73 ± 0,43	3,80 ± 0,01
Colza <i>Brassica napus</i>	93,40 ± 0,50	3,67 ± 0,08
Cardon <i>Cynara cardunculus</i>	92,03 ± 0,05	4,98 ± 0,14
Pastel <i>Isatis tinctoria</i>	93,40 ± 0,06	3,44 ± 0,02
Siliques des graines de pastel	95,40 ± 0,08	4,34 ± 0,07
Lin <i>Linum usitatissimum</i>	92,12 ± 0,08	3,81 ± 0,13

### II.2.1.2 Composition chimique des graines

La teneur en protéines des graines est déterminée en employant le dosage de l'azote total qu'elles contiennent, par la méthode Kjeldahl, décrite dans la partie expérimentale du document. Le taux de protéines est calculé à partir de la teneur en azote total en appliquant un facteur de conversion de 6,25, utilisé par défaut pour les graines. Ce facteur de conversion peut être ajusté à partir du calcul de la teneur en azote total, grâce au profil de composition en acides aminés de la matière première.

Cette méthode est référencée comme standard par l'AOAC (association of analytical communities), c'est celle qui est employée dans la plupart des publications citées.

La teneur en huile végétale est effectuée en utilisant la méthode d'extraction continue sur un dispositif de type Soxhlet, décrite dans la partie expérimentale (P.E.1.4)

La teneur en fibres est effectuée selon la méthode de l'ADF-NDF (acid detergent fiber-neutral detergent fiber), décrite dans la partie expérimentale. Cette méthode est une méthode de dosage gravimétrique, au cours de laquelle les composés non fibreux de la graine sont hydrolysés. Contrairement au dosage des protéines par la méthode Kjeldahl, la méthode Van Soest and Vine (ADF NDF) n'est pas référencée pour la teneur en fibres. Cette méthode est en réalité plus adaptée aux dosages des fibres dans des matières très fibreuses et très pauvres en lipides, telles que les fourrages. Les graines sont délipidées avant ces types de dosages, et les résultats obtenus sont des estimations.

La teneur en composés hydrosolubles est déterminée en plaçant l'échantillon dans un fritté adapté à un appareil de type Fibertech, également employé pour le dosage ADF-NDF. De l'eau déminéralisée est déposée sur les frittés, et le mélange est porté à ébullition durant une heure. Les quantités de composés hydrosolubles sont évaluées en déterminant la teneur en matière sèche de l'extrait aqueux récupéré après filtration du mélange. Le protocole détaillé est décrit dans la partie expérimentale.

Les résultats obtenus sur les graines étudiées sont décrits dans le tableau 27 ci-après :

**Tableau 27 : Constitution des fractions pariétales des graines**

	Résidu NDF (% M.S.)	Extractibles NDF (% M.S.)	Résidu ADF (% M.S.)	Extractibles ADF (% M.S.)	Répartition des fibres (% M.S.)
Chanvre	69,9	30,1	75,3	24,7	Cellulose : 20,9 ± 0,8 Lignine : 3,8 ± 0,1 Hémi-celluloses : 5,4 ± 3,5
Colza	70,1	29,9	71,0	29,0	Cellulose : 16,7 ± 0,1 Lignine : 12,3 ± 0,0 Hémi-celluloses : 0,9 ± 0,6
Cardon	60,8	39,2	67,1	32,9	Cellulose : 28,1 ± 1,1 Lignine : 4,8 ± 0,5 Hémi-celluloses : 6,2 ± 2,1
Pastel					
Graines + siliques	48,8	51,2	46,0	54,0	Cellulose : 40,0 ± 0,5 Lignine : 14,0 ± 0,9 Hémi-cellulose : 7,4 ± 1,5
Siliques	19,8	80,2	29,6	70,4	Cellulose : 48,5 ± 0,5 Lignine : 21,9 ± 0,9 Hémi-cellulose : 11,6 ± 1,5
Lin	74,92	25,08	82,4	17,6	Cellulose : 10,4 ± 0,5 Lignine : 7,5 ± 0,9 Hémi-cellulose : 7,19 ± 1,5

**Tableau 28: Composition chimique des matières végétales**

Graine	Teneur en protéines <sup>1</sup> (% M.S.)	Teneur en huile végétale <sup>2</sup> (% M.S.)	Teneur en composés hydrosolubles (sucres, pectines, protéines hydrosolubles) <sup>4</sup> (% M.S.)
Chanvre <i>Cannabis sativa</i>	32,32 ± 0,58	36,57 ± 0,33	17,8 ± 0,9
Comparaison avec la littérature	25% (Callaway, 2004) 23-26,50% (Anwar et al., 2006)	30% (Callaway, 2004) 26,90-31,50% (pressage à froid) (Anwar et al., 2006)	
Colza <i>Brassica Napus</i>	18,72 ± 0,02	39,4 ± 0,5	22,8 ± 0,2

Comparaison avec la littérature	30-40%(Jeong et al., 2012)	5-20% (Jeong et al., 2012) 33-35 pour le colza pauvre en huile 45-50 pour le colza riche en huile (Hu et al., 2013)	
Cardon <i>Cynara Cardunculus</i>	20,88 ± 0,66	21,88 ± 0,54	30,0 ± 0,5
Comparaison avec la littérature	21,3 % (Cajarville et al., 2000)	20-31,6 % (Curt et al., 2002)	
Pastel <i>Isatis tinctoria</i> Graines + Siliques		11,75 ± 2,05	
Graines désiliquées	35,45 ± 0,15	30,98 ± 0,	19,7 ± 0,1
Siliques	n.d.	8,4 ± 0,2	n.d.
Lin <i>Linum usitatissimum</i>	21,32 ± 1,26	18,5 ± 1,2	n.d.
Comparaison avec la littérature	4-20% (Cui et al., 1994; Oomah and Sitter, 2009)	20% (Oomah and Sitter, 2009)	

<sup>1,2,3,4,5</sup> Les méthodes analytiques employées pour ces caractérisations sont décrites dans la partie expérimentale.

Les données des références bibliographiques sont fréquemment des intervalles de valeurs car les auteurs comparent plusieurs espèces. Les différences observées avec ces données de la littérature peuvent également être liées à des facteurs tels que la situation géographique ou la météo.

Par exemple, Anwar et al. (Anwar et al., 2006) ont comparé des graines de chanvre provenant de trois zones agro-écologiques du Pakistan, et Curt et al. (Curt et al., 2002) ont comparé des graines de cynara cultivées dans huit régions espagnoles.

Les graines de chanvre, de cardon et de lin présentent des caractéristiques proches de celles décrites par les différents auteurs (tableau 3). Il semblerait que les graines de colza se situent entre les catégories de colza pauvre et riche en huile, décrites par Hu et al. (Hu et al., 2013).

Les graines utilisées dans le cadre de cette étude présentent des compositions différentes en constituants principaux. Les teneurs en constituants pariétaux (celluloses, hémicelluloses et lignine) sont comprises en moyenne entre 47 et 50% par rapport à la matière sèche pour le colza, le chanvre et le cardon, mais le pastel se détache avec une teneur en fibres supérieure à 58% de la matière sèche (tableau 27). Cela s'explique par le fait que les graines de Pastel employées pour ces caractérisations et pour la plupart des manipulations sont contenues dans leurs siliques, coques fibreuses permettant de protéger la graine. Au contraire, les graines de chanvre, de cardon, de colza et de lin ne possèdent pas de protection extérieure. On peut observer également que les teneurs en lignines sont plus importantes dans les graines de colza (12,3%) et de pastel (14%) que

dans les graines de chanvre et de cardon (4 et 5%). La teneur en hémicellulose est équivalente pour les graines de chanvre, cardon et colza, et n'est que de 7% pour le pastel. Les graines de chanvre, de colza et de cardon se différencient par leurs teneurs en huile végétale et en protéines (tableau 28).

Les graines de Colza, majoritairement cultivées pour l'utilisation de leur huile végétale, en sont les plus riches (39,4% M.S.), suivies de près par les graines de chanvre (36,7 % M.S.). Les graines de cardon, moins riches en huile végétale (21,9 % M.S.) possèdent une teneur en protéines intermédiaire (20,9 % M.S.) entre le colza (18,7 % M.S.) et le chanvre (26 % M.S.).

Ces teneurs en huile végétale et en protéines auront une influence sur le comportement des graines lors de leur fractionnement aqueux. En effet, l'huile végétale contenue dans la graine se doit d'être facilement accessible et disponible lors du fractionnement, afin d'être extraite sous forme émulsifiée, et de constituer ainsi la phase grasse de l'émulsion. D'autre part, les protéines vont, avec les phospholipides, avoir une action émulsifiante, permettant de stabiliser les émulsions.

Les valeurs des teneurs en protéines et en huile végétale sont dans la plupart des cas proches de celles décrites dans la littérature. Dans certains cas, des différences peuvent s'expliquer par le fait que l'espèce étudiée soit différente de l'espèce décrite. Des facteurs externes liés à la culture des graines (ensoleillement, humidité, ..) peuvent également intervenir pour expliquer ces différences.

Les composés hydrosolubles sont majoritairement des protéines hydrosolubles, ainsi que des polysaccharides. Le cardon est la graine la plus riche en composés hydrosolubles (30% M.S.), alors que le colza, le chanvre et le pastel en contiennent entre 17 et 20%.

## II.2.2 Affinité des matières premières pour l'eau

L'affinité pour l'eau des graines broyées a été évaluée en mesurant leur taux de gonflement et d'adsorption selon la méthode décrite dans la thèse de P. Evon pp 323-324. Le protocole est décrit dans la partie expérimentale (P.E.1.14)

Le taux de gonflement est lié à la capacité de la graine à absorber son poids en eau lorsqu'elle en est saturée. Les résultats obtenus sur les graines sont décrits dans le tableau 29 ci-après :

**Tableau 29 : Taux de gonflement des graines broyées**

Graine	Taux de gonflement (%)
Chanvre	94,5 ± 1,3
Colza	123,4 ± 7,0
Cardon	119,58 ± 3,41
Pastel	108,8 ± 19,7

Parmi les quatre graines testées, la graine de chanvre est la seule qui ne peut absorber un poids d'eau supérieur à son propre poids. Les autres graines peuvent absorber entre 1,08 et 1,23 fois leur poids.

Le taux de gonflement semble être légèrement corrélé à la teneur en fibres de la matière végétale : les graines les plus fibreuses, colza et cardon, présentent comme on pouvait s’y attendre, les taux de gonflement les plus importants.

Aucune référence bibliographique sur les taux de gonflement de graines n’a été retrouvée dans la littérature.

### II.2.3 Extraction de l’huile par pressage des graines en monovis

Le pressage des graines a été effectué sur une presse monovis, de transmission Aquitaine SA selon les conditions décrites dans la partie expérimentale (P.E.1.7). Ces conditions ont été les mêmes pour toutes les graines.

Pour chaque graine, la buse de sortie du tourteau choisie possédait un diamètre interne de 0,5 cm. De plus, un espace de l’ordre de 1,5 mm était créé en dévissant la buse, afin de faciliter la formation du bouchon.

Le tourteau de sortie était systématiquement repassé deux fois au sein de la monovis.

Une fois l’huile obtenue, elle est centrifugée à 10000g durant 15 minutes afin d’en supprimer les particules solides résiduelles (pied), entraînées dans l’huile végétale.

Les résultats obtenus sont compilés dans le tableau 30 ci-après.

Tableau 30 : Rendements de pressage des graines en monovis

Graine	Rendement de pressage <sup>1</sup> g/100 g (% M.S.)	Teneur en pied de l’huile (%)	Teneur en lipides résiduels dans le tourteau <sup>2</sup> (% M.S.)	Rendement d’extraction en huile (%) <sup>3</sup>
Chanvre	21,2	21,01	10,1	58
Colza	28,1	7,1	9,4	71
Cardon	16,3	9,4	8,3	75
Pastel désiliqué	24,0	4,9	12,9	77

<sup>1</sup>le rendement de pressage des graines est calculé de la manière suivante :

$$R_{HV} = \frac{m_{HV}}{m_G} \times 100$$

$m_{HV}$  est la masse d’huile végétale obtenue à l’issue du pressage

$m_G$  est la masse sèche de graines pressées

<sup>2</sup>la teneur en lipides résiduels dans le tourteau est déterminée grâce à la méthode de l’extraction des lipides au cyclohexane, sur un dispositif de type Soxhlet

<sup>3</sup>le rendement d’extraction en huile est déterminé par rapport au potentiel total en lipides des graines, décrit dans le tableau 25.

Les rendements en huile obtenus lors du pressage en monovis sont inférieurs à ceux obtenus lors de l’extraction au soxhlet. En effet, les soxhlets sont destinés à déterminer le potentiel en huile totale, et la matière est finement broyée à cet effet, afin que toute l’huile soit accessible par le solvant au moment de son extraction. Lors du pressage des graines en presse monovis, il reste une certaine quantité d’huile résiduelle dans le tourteau. Les résultats obtenus pour le pressage du chanvre, du colza, du cardon et du pastel sont concordants avec ceux obtenus en soxhlets : les graines les plus riches en huiles (colza et

pastel) ont le meilleur rendement de pressage. Pour autant, le chanvre présente le moins bon rendement d'extraction en huile (58%), alors que ceux du colza, du cardon et du pastel sont proches, compris entre 71 et 77%. Il semblerait alors que l'huile de chanvre présente une accessibilité inférieure à celle des autres graines.

Dans le cadre de ces travaux, l'intérêt du pressage en monovis était d'une part de connaître et de comparer le comportement des graines lors d'une contrainte mécanique de cet ordre et d'autre part de produire de l'huile pour la réalisation expérimentale de formulations, et pour leur analyse. De ce fait, les essais d'amélioration du rendement n'ont pas été effectués, mais de nombreuses publications font état de ce type de travaux, en particulier sur la coriandre (Sriti et al., 2011) et le neem (Faye, 2010).

Pour le pressage de la coriandre, les meilleurs résultats étaient obtenus en employant une buse de 9 mm de diamètre, et avec une distance entre la buse et la vis de 1,5 mm.

## II.2.4 Caractérisation des huiles végétales

Les caractérisations des huiles végétales ont été effectuées sur des extraits obtenus par pression à froid en presse monovis des graines.

### II.2.4.1 Profils acides gras des huiles végétales

L'analyse de la composition en acides gras de la fraction lipidique des cinq graines présentées dans le tableau 31 et la figure 38 ci-après, permet de caractériser ces huiles extraites par pression à froid.

Tableau 31 : Profils d'acides gras des huiles végétales

		Composition (g/100g d'acides gras)				
		Chanvre	Colza	Cardon	Pastel	Lin
Nom commun	Ecriture simplifiée					
Acide myristique	C 14 :0	0,09		0,14		
Acide pentadécanoïque	C 15 :0	0,04				
Acide palmitique	C 16 :0	7,20	4,10	11,2	5,00	6,10
Acide palmitoléïque				0,12		
Acide heptadécanoïque	C 17 :0	0,08		0,06		
Acide stéarique	C 18 :0	3,00	1,80	3,30	1,80	3,50
Acide oléique	C 18 :1	15,2	63,0	18,3	19,8	18,2
Acide linoléique	C 18 :2	56,5	20,0	66,4	12,9	15,5
Acide $\alpha$ -linoléique	C 18 :3	13,7	8,60			56,1
Acide $\gamma$ -linoléique	C 18 :3	2,50				
Acide arachidique	C 20 :0	0,90		0,36	1,30	
Acide eicosanoïque	C 20 :1		1,90		10,8	
Acide gadoléique	C 20 :1n9	0,37				
Acide behénique	C 22 :0	0,36		0,10		
Acide érucique	C 22 :1				18,3	

Acide nervonique	C 24 :1				3,50	
Total des acides gras insaturés		89,5	93,5	85,2	66,6	89,8

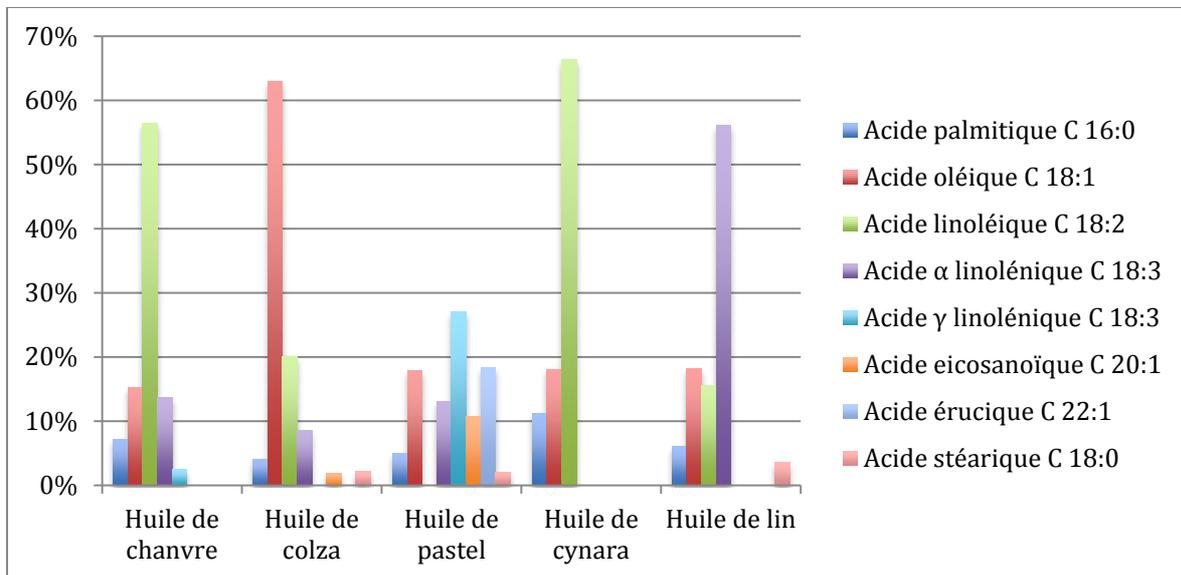


Figure 38 : Acides gras majoritaires des huiles végétales

Dans l'huile de pastel, la teneur de l'acide gras majoritaire ne représente que 26% du total des acides gras, comparativement aux autres huiles pour lesquelles la teneur en acide gras majoritaire est supérieure à 55% : les huiles de chanvre et de cardon présentent des teneurs en acide linoléique C 18 :2 de l'ordre respectivement de 55 et 65%, l'huile de colza présente une teneur en acide oléique supérieure à 60% et l'huile de lin est constituée à plus de 55% d'acide α linoléique. L'acide linoléique tire son nom de l'huile de lin, dont il est l'acide gras majoritaire.

Les cinq huiles végétales caractérisées sont majoritairement composées d'acides gras insaturés voire poly-insaturés. Ces insaturations confèrent aux acides gras des propriétés d'hydratation cutanée. Les doubles liaisons provoquent des courbures des chaînes d'acides gras, lesquelles vont pénétrer de manière plus efficace l'épiderme, et permettre une hydratation cutanée, en renforçant la barrière lipidique. Cela permet entre autres d'éviter une évaporation de l'eau contenue au sein de l'épiderme. Ces considérations concernant les bénéfices cutanés des acides gras et des huiles végétales sont décrits dans le chapitre I, I.2.2.1.

Le pendant négatif de ces insaturations est une grande sensibilité à l'oxygène de l'huile végétale, ce qui les rend facilement oxydables et provoque leur rancissement.

### II.2.5 Composition des fractions protéiques des différentes graines

Les fractions protéiques ont été caractérisées par l'analyse de leurs teneurs en acides aminés ainsi que par leur propriété physicochimique de solubilité dans différents solvants selon la classification d'Osborne, présentées dans le tableau 32 ci-après (Jarrige, 1995)..

**Tableau 32 : Solubilité des familles de protéines suivant le solvant employé**

Protéines	Solubilité								
	Eau	Solution saline	Solution saline	Acide dilué	Base diluée	Ammonia que dilué	Ethanol 80%	Ethanol absolu	Solvants neutres
Albumines	S	S							
Globulines		S							
Glutéines				S	S	S	I	I	I
Prolamines							S	I	I
Albuminoïdes				I	I	I	I	I	I
Histones	S			S	I	I			
Protamines	S					S			

Classiquement, dans les travaux antérieurs concernant des caractérisations de matières premières végétales, les dosages d'Osborne visent majoritairement à doser les albumines, globulines, glutéines et prolamines, ainsi qu'à doser la teneur en protéines insolubles contenues dans la matière.

### II.2.5.1 Caractérisation des protéines des graines selon Osborne

Le dosage d'Osborne permet de classer les protéines selon leur affinité avec un solvant. Les protéines solubles dans un solvant aqueux sont les albumines. Ce sont elles qui présentent une activité biologique (enzymes, lectines, inhibiteurs d'enzymes). Elles représentent au moins 40% des protéines du Colza. Elles sont riches en acides aminés soufrés et en lysine.

Les protéines solubles dans une solution saline de chlorure de sodium sont les globulines. Elles jouent un rôle de protéines de réserve au sein de graines, et représentent 25 à 30% des protéines du colza. Elles sont moins riches en acides aminés soufrés et en lysine que les albumines, et leur teneur en arginine est plus élevée. Les globulines des oléagineux présentent des structures complexes formées de plusieurs sous unités. Elles peuvent ainsi s'associer ou se dissocier selon les conditions du milieu dans lequel elles se trouvent.

Les prolamines, solubles dans les solutions alcooliques, sont également des protéines de réserve des céréales. Leur composition en acides aminés est déséquilibrée, elles présentent une teneur très élevée en glutamine et en proline, et très peu d'acides aminés basiques. Elles sont également pauvres en lysine.

Les glutéines, solubles dans les solutions basiques, sont un mélange de protéines de structure et de protéines de réserve. Elles présentent en général une masse molaire élevée du fait de leur structure composée de sous unités protéiques et de polypeptides liés par des ponts disulfure.

**Tableau 33 : Classification d'Osborne des quatre graines**

Graine	Chanvre	Colza	Cardon	Pastel
Albumines (% des protéines totales) <i>Phase aqueuse</i>	22,1	54,1	23,2	23,4
Globulines (% des protéines totales) <i>Phase NaCl</i>	13,4	19,8	14,5	49,8
Prolamines (% des protéines totales) <i>Phase alcoolique</i>	0,4	2,3	0,3	1,4
Glutéines (% des protéines totales) <i>Phase NaOH</i>	27,7	11,8	49,1	18,1
Fraction insoluble (% des protéines totales)	36,4	12,0	12,9	7,2

Les classifications d'Osborne de ces quatre graines sont très différentes. Dans le cadre de ces travaux, la fraction qui nous paraît présenter le plus grand intérêt est la fraction soluble dans l'eau, composée d'albumines. En effet, ce sont les albumines qui présentent les meilleures propriétés émulsifiantes. Les albumines sont majoritaires au sein de la fraction protéique du colza, dont elles représentent 54%. Suivent ensuite le pastel et le cardon, dans la fraction protéique desquelles les albumines sont présentes respectivement à 23,2 et 23,4%. Le chanvre présente seulement 7,4% d'albumines dans sa fraction protéique.

Le pastel diffère des autres graines de part sa teneur élevée en globulines, de l'ordre de 50% des protéines totales, alors qu'elle est de l'ordre de 13 à 19% pour les autres graines. Les prolamines, typiquement protéines de réserve des céréales, sont quasi absentes de toutes les graines étudiées ici.

Il est intéressant de noter la complémentarité de ces graines selon leurs fractions protéiques. En effet, les glutéines sont majoritaires chez le chanvre, les albumines le sont pour le colza, les glutéines et les albumines pour le cardon et les globulines pour le pastel. Il est cependant probable que les albumines soient majoritairement extraites en extrusion bi-vis.

#### **II.2.5.2 Dosage des acides aminés**

Les analyses des acides aminés totaux présentent l'ensemble des acides aminés dosés. Les acides aminés ont été dosés à partir des cinq graines préalablement finement broyées selon le protocole décrit dans la partie expérimentale, P.E.1.13.

L'hydrolyse chlorhydrique, employée pour ce dosage, a des conséquences sur le profil des acides aminés obtenu. Le tryptophane est entièrement hydrolysé, et ne peut pas être dosé. Il est transformé en un mélange d'alanine et d'acétoacétate, ce qui provoque une surestimation de la teneur en alanine dosée. L'asparagine est transformée en acide aspartique, et la glutamine en acide glutamique. Ainsi, pour les quatre graines, les acides aspartiques et glutamiques sont en proportions majoritaires, mais ces pourcentages correspondent en réalité à la somme « asparagine + acide aspartique » et « glutamine + acide glutamique ».

Les acides aminés sérine, thréonine, tyrosine et histidine étant quant à eux sensibles à l'oxydation, leur dosage peut être sous estimé. La méthionine et la cystéine, acides aminés soufrés, sont altérées. Dans le cas de nos graines, la cystéine n'est pas identifiée.

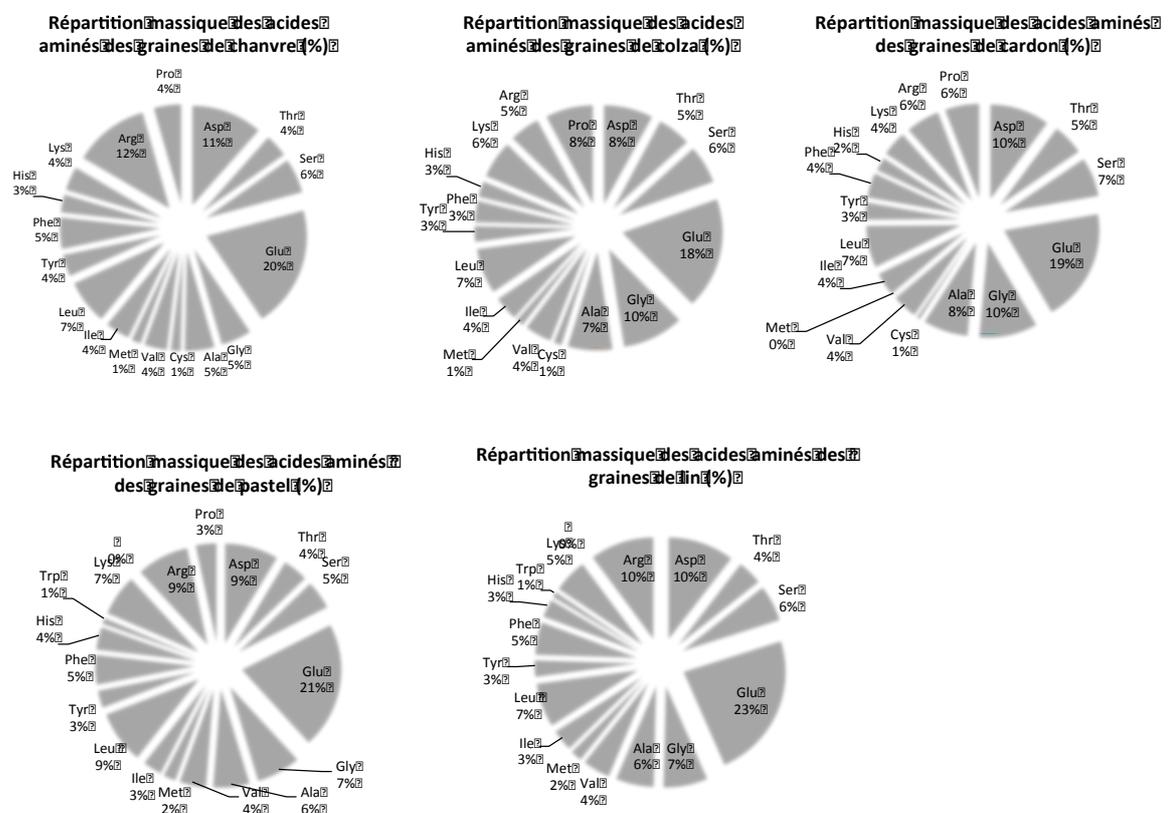


Figure 39 : Profils des acides aminés des graines étudiées

Les profils d'acides aminés de nos graines sont assez semblables. Le pourcentage élevé en acide glutamique est dû au fait qu'il prend également en compte le glutamate, transformé en acide glutamique lors de l'hydrolyse acide. Les teneurs élevées en acides aspartiques et glutamiques sont communes à toutes les protéines végétales. Le lin se détache légèrement avec un pourcentage de 23%, alors qu'il est compris entre 18 et 21% pour les autres graines. De même, la teneur en acide aspartique prend en fait également en compte l'aspartate, hydrolysé en acide aspartique.

## II.2.6 Caractérisation des activités biologiques

Les dosages des activités antioxydantes des matières végétales ne sont pas réalisés sur les graines brutes, mais sur des macérâts hydro-alcooliques (20/80), de graines entières broyées et délipidées. Le mode d'obtention des macréâts est décrit dans la partie expérimentale. La méthode de dosage est basée sur la capacité de l'extrait à capter un radical libre, la DPPH (1,1 diphényl 2 picryl hydrazil), de couleur violette intense. La réduction du radical libre est caractérisée par un changement de couleur de la solution, qui passe du violet au jaune. L'IC50 du macérât correspond à sa concentration nécessaire à la réduction de 50% du radical DPPH présent en solution. Plus l'IC50 d'un macérât est faible, meilleure est la capacité antioxydante du produit testé.

Le protocole détaillé du dosage est décrit dans la partie expérimentale (P.E.1.15.)

Tableau 34 : IC 50 des macérâts hydroalcooliques des graines

	IC 50 (mg/L) (n=3)
Cardon	19,8 ±1,2
Pastel	21,8 ±1,3
Colza	75,8 ± 0,7
Chanvre	nulle

La plante habituellement choisie comme référence lors des mesures des activités antioxydantes est le romarin. Il possède un IC 50 de l'ordre de 4,5 mg/L. L'acide ascorbique, ou vitamine C, puissant antioxydant employé dans l'industrie a un IC50 de l'ordre de 4 mg/L.

Les propriétés antioxydantes des graines de cardon et de pastel révélées par un IC50 relativement faible laissent envisager l'exploitation de ces graines ou de leurs co-produits de fractionnement pour l'obtention de fractions fonctionnelles antioxydantes. Les macérâts hydro-alcooliques de colza présentent aussi un intérêt non négligeable. Quant à ceux du chanvre, ils ne présentent aucune activité antioxydante.

## II.3 Propriétés fonctionnelles des fractions protéiques

### II.3.1 Extraction des fractions protéiques

Les fractions protéiques sont obtenues à partir des tourteaux issus du pressage des graines afin d'éviter que l'huile présente en trop grande quantité dans les graines n'empêche l'isolement efficace des protéines. Le protocole pour leur obtention est basé sur des travaux réalisés sur les graines de coton, dont le but était d'évaluer les propriétés émulsifiantes des fractions protéiques (Tsaliki et al., 2004).

Les protéines sont isolées des tourteaux par dissolution à pH basique, et sont précipitées à pH acide. Le protocole détaillé est décrit dans la partie expérimentale, P.E.5.

**Tableau 35 : Rendements d'extraction en protéines et caractérisation des fractions protéiques**

	Teneur en protéines des tourteaux (% M.S.)	Rendement d'extraction en protéines <sup>1</sup> (%)	Teneur en matière sèche de l'extrait obtenu (%)	Teneur en protéines des pseudos isolats obtenus (% M.S.)
Chanvre	35,1	95	31,49 ± 0,89	94,5 ± 1,22
Colza	33,9	90,6	24,90 ± 1,10	89,0 ± 1,0
Cardon	24,6	72	23,78 ± 0,60	88,76 ± 0,20
Pastel	36,5	59	26,93 ± 0,55	75,07 ± 0,52

<sup>1</sup>Le rendement d'extraction en protéines, est calculé en fonction de la teneur en protéines dans le tourteau employé pour l'extraction et de la teneur en protéines de l'isolat obtenu

Les rendements d'extractions les plus importants sont obtenus avec les tourteaux de chanvre et de cardon. C'est également leurs fractions protéiques qui possèdent les teneurs en protéines les plus élevées. Cependant, le terme d'isolat protéique est réservé aux fractions possédant des teneurs en protéines supérieures à 90%. Ainsi, seul l'extrait protéique de chanvre, possédant une teneur en protéines de l'ordre de 95% peut être appelé « isolat protéique de chanvre ».

Ces rendements plus élevés peuvent être reliés aux résultats obtenus dans le dosage d'Osborne. Le chanvre et le cardon possèdent en effet des teneurs élevées, respectivement 28 et 49%, de protéines du type Glutéines. Celles-ci étant solubles dans une solution basique, cela peut laisser supposer que ces protéines sont plus disponibles lors de la première étape d'extraction à pH basique des fractions protéiques. En outre, les protéines de pastel et de colza sont constituées de 18,1 et 11,8% de glutéines et ont des rendements d'extractions respectivement de 59 et 54%, pour des teneurs en protéines des extraits de 75 et 89%.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de Tsaliki et al. (Tsaliki et al., 2002) sur les graines de coton, dont l'obtention d'isolats protéiques donne des isolats ayant une teneur en protéines supérieure à 80% de la matière sèche de l'extrait obtenu. Les rendements d'extraction sont toutefois nettement supérieur dans le cadre de nos travaux. Cela peut être lié à une meilleure disponibilité des fractions protéiques dans les graines choisies, par rapport aux graines de coton.

### II.3.2 Caractérisation intrinsèque des fractions protéiques

La fraction protéique obtenue à partir du tourteau de colza a subi un dosage d'Osborne afin d'avoir plus d'informations sur la nature de l'extrait utilisé.

L'extrait protéique de colza est composé de la manière suivante :

**Tableau 36 : Classification d'Osborne de l'extrait protéique de Colza**

Classe de protéines	%
Albumines	37,6 ± 0,3
Globulines	18,5 ± 0,2

Prolamines	3,5 ± 0,1
Glutéines	3,1 ± 0,2
Protéines insolubles	33,9 ± 0,6

Pour rappel, le colza présentait la caractérisation d'Osborne suivante : 54,1% d'albumines, 19,8% de globulines, 2,3% de prolamines, 11,8% de glutéines et 12,0% de protéines insolubles. Aussi bien pour les graines que pour l'extrait protéique, les albumines et globulines sont majoritaires. Lors de leur solubilisation à pH basique, les albumines, globulines et glutéines sont partiellement extraites, mais les prolamines, solubles dans l'éthanol à 70%, absent lors du protocole d'extraction restent insolubles. Cela explique en partie l'augmentation de la part de protéines insolubles lors de leur extraction à pH basique et de leur précipitation à pH acide.

Nous pouvons supposer que si ce dosage d'Osborne avait été effectué sur les extraits protéiques issus du pastel, les globulines seraient majoritaires et la teneur en protéines insolubles aurait également augmenté. Cependant concernant les extraits issus du chanvre et du cardon, il est probable qu'ils contiennent majoritairement des glutéines.

### II.3.3 Propriétés moussantes des fractions protéiques

Par définition, une mousse consiste en une dispersion de bulles de gaz dans une phase continue liquide renfermant des protéines et obtenue par agitation mécanique. Il faut que les protéines soient solubles dans la phase aqueuse pour permettre une bonne capacité moussante mais aussi qu'elles puissent s'adsorber à l'interface gaz/liquide. Les protéines vont donc participer à la stabilisation des mousses.

Les propriétés moussantes des fractions protéiques sont effectuées selon un protocole décrit par (Tsaliki et al., 2002) et (Padmashree et al., 1987) et détaillé dans la partie expérimentale, P.E.5.

Les résultats obtenus pour les quatre graines sont compilés dans le tableau suivant :

**Tableau 37 : Capacité moussante des isolats protéiques de chanvre, colza, cardon et pastel**

Pseudo isolat protéique	Capacité moussante (en % du volume)
Chanvre	3,33
Colza	0
Cardon	1
Pastel	0

Les capacités moussantes des fractions protéiques sont nulles, pour le colza et le pastel, ou très limitées pour le chanvre et le cardon.

### II.3.4 Propriétés émulsifiantes des fractions protéiques

Les propriétés émulsifiantes des fractions protéiques sont évaluées selon la méthode décrite dans la thèse de Sylvain Forêt (Foret, 2011), inspirée de la méthode de Yasumatsu (Yasumatsu et al., 1972).

La capacité émulsionnante d'un extrait correspond au rapport du volume d'émulsion restant 30 secondes après l'agitation et du volume total du mélange avant l'agitation. Plus celui-ci est proche de 100, meilleure est la capacité émulsionnante de l'extrait testé. Les capacités émulsionnantes des fractions protéiques des graines sont rassemblées dans le tableau 38 ci après.

**Tableau 38 : Capacité émulsionnante des extraits protéiques de chanvre, cardon, colza et pastel**

Isolat protéique	Capacité émulsionnante (%)
Chanvre	93,33
Colza	100
Cardon	98,66
Pastel	100

Le colza et le pastel ont des capacités émulsionnantes de l'ordre de 100%. Ce résultat indique que dans les conditions testées, 1,25 g d'extrait protéiques permettent la stabilisation d'une émulsion comprenant 25 mL d'huile de tournesol et 50 mL d'eau.

Le cardon présente une capacité émulsionnante plus faible, mais proche de 99%, tandis que le chanvre présente la moins bonne capacité émulsionnante, de l'ordre de 93%.

Néanmoins, dans tous les cas, les extraits protéiques présentent des capacités émulsionnantes supérieures à 90%.

Nous avons également déterminé les stabilités émulsionnantes (S.E.) des extraits protéiques. Le calcul pour les déterminer est le suivant :

$$S.E. = \frac{V \text{ émulsion}_{\text{au temps } t}}{V \text{ émulsion}_{\text{à } t_0}} \times 100$$

Pour le calcul de la stabilité émulsionnante, les volumes d'émulsion sont mesurés à 5, 10, 30, 60, 90, 180, 240 et 330 minutes après homogénéisation.

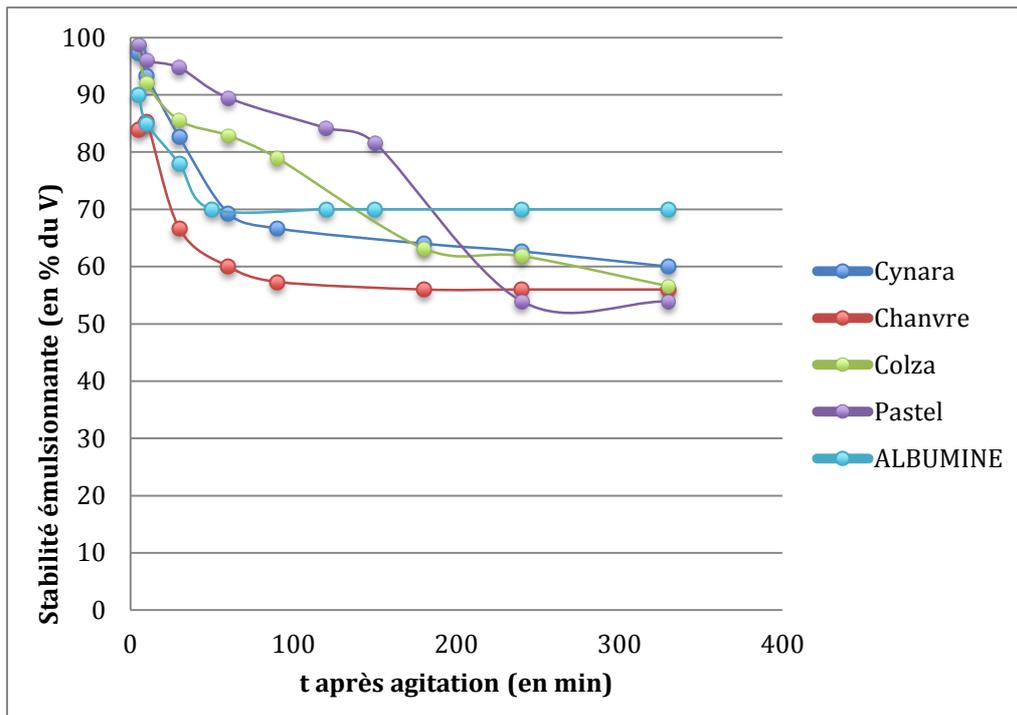


Figure 40 : Cinétiques de déstabilisation des émulsions formulées à partir des fractions protéiques de graines

Les extraits protéiques des graines de cardon, chanvre, colza et pastel présentent tous des capacités émulsifiantes intéressantes. Les extraits protéiques de graines de colza et de pastel grains plus riches en albumines et en globulines montrent des capacités émulsifiantes de 100%, et sont également ceux qui donnent des émulsions dont les cinétiques de déstabilisation sont les plus lentes. En effet, ces fractions protéiques possèdent une nette capacité de stabilisation des émulsions huile dans eau supérieure à celle de l'albumine prise comme référence. Cette propriété permet de suggérer que les protéines solubilisées lors du fractionnement aqueux en milieu basique des graines de colza et pastel pourront favoriser l'entraînement des lipides ainsi que d'autres molécules d'intérêt dans les extraits.

Le dosage d'Osborne effectué sur l'extrait protéique de Colza employé pour les essais discutés précédemment a permis de mettre en avant que ce dernier est majoritairement composé d'albumines (38%), ce qui explique sa capacité émulsifiante de l'ordre de 100% et sa stabilité émulsionnante supérieure à celle de l'albumine native, jusqu'à 100 minutes après l'agitation de l'émulsion.

Les extraits protéiques de cardon présentent une stabilité émulsionnante équivalente à celle de l'albumine alors que cette dernière est plus faible pour les extraits de chanvre. Ainsi, malgré le fait que les propriétés moussantes des pseudos-isolats soient négligeables, leurs propriétés émulsifiantes pour des émulsions huile dans eau est fortement notable.

### II.3.5 Caractérisation de la morphologie des systèmes eau-huile-protéines

La morphologie des émulsions dépend :

- des proportions relatives d'eau et d'huile

- de la concentration en protéines jouant le rôle d'émulsifiant
- du protocole expérimental employé pour fabriquer l'émulsion.

Dans la mesure où les émulsions sont des systèmes thermodynamiquement instables, il est essentiel de maîtriser la nature de la phase continue de l'émulsion. Par conséquent, il est important de savoir comment évolue le système eau-huile-protéines lorsque l'on modifie le rapport eau/huile. Pour cela, nous avons construit un diagramme de phase ternaire permettant de mettre en évidence l'évolution du type de structure formée lorsque l'on modifie le rapport eau/huile et la concentration en protéine.

Les diagrammes ternaires ont été construits pour chacun des isolats protéiques (colza, chanvre, cardon, pastel) en faisant varier trois paramètres :

- le pourcentage d'huile végétale (huile de tournesol pour chacun des diagrammes afin de ne pas introduire une variable supplémentaire, sur la qualité de l'huile)
- le pourcentage d'eau
- le pourcentage de pseudo isolat protéique

Pour chaque type d'isolat protéique, la teneur en huile végétale dans l'émulsion testée varie entre 20 et 80%, la teneur en eau varie entre 16,9 et 76,9%. Les isolats protéiques obtenus présentaient des teneurs en humidité très élevées, de l'ordre de 70%. De ce fait, les teneurs en protéines dans l'émulsion ne peuvent pas être supérieures à 24,8%. Cependant, dans la mesure où l'émulsifiant dans une formulation d'émulsion cosmétique est présent à des pourcentages compris entre 2,5 et 8% de la masse totale de l'émulsion, la fenêtre de mesure utilisée pour faire varier les teneurs en protéines nous permet d'obtenir les informations requises. Pour chaque essai réalisé, les pourcentages réels d'eau et de protéines ont été calculés en fonction de la teneur en protéines et en eau réelles dans les isolats utilisés.

Les solutions ont été réalisées à partir de 50g ou 100g, et les essais ont été conduits en duplicatas.

Les formulations ont été réalisées à l'ultraturax, à 12000 RPM, durant 2 minutes. A l'issue du mélange, la conductivité des émulsions est mesurée à l'aide d'un conductimètre, et le diamètre des gouttelettes constitutives de l'émulsion est évalué à l'aide d'un microscope optique, suivant un protocole décrit dans la partie expérimentale.

Les diagrammes de phase ont été dessinés sur la base de la formation ou non d'une émulsion ainsi que le type d'émulsion, huile dans eau ou eau dans huile, en s'appuyant sur les observations macroscopiques et microscopiques ainsi que sur la mesure de la conductivité des formulations obtenues.

Les essais ne donnant lieu à aucune émulsification (pas de dispersion des phases, aspect multiphasique dès l'arrêt de l'agitation) ont été notés 0. Les essais donnant lieu à des émulsions eau dans huile ont été notés 1 et les essais donnant lieu à des émulsions huile dans eau ont été notés 2.

Les diagrammes de phase représentant les différents types de structure susceptibles de se former en fonction du taux de protéines et du rapport eau/huile et de la valeur de la conductivité sont retrouvés en annexe A.2.

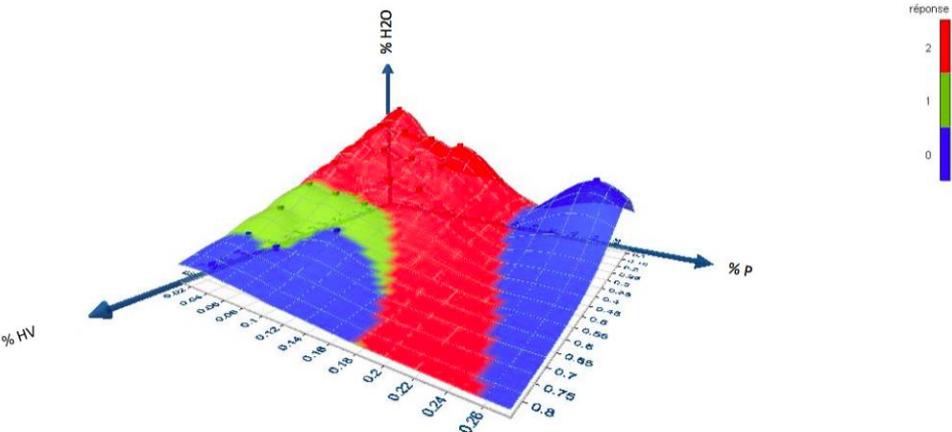


Figure 41 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Chanvre

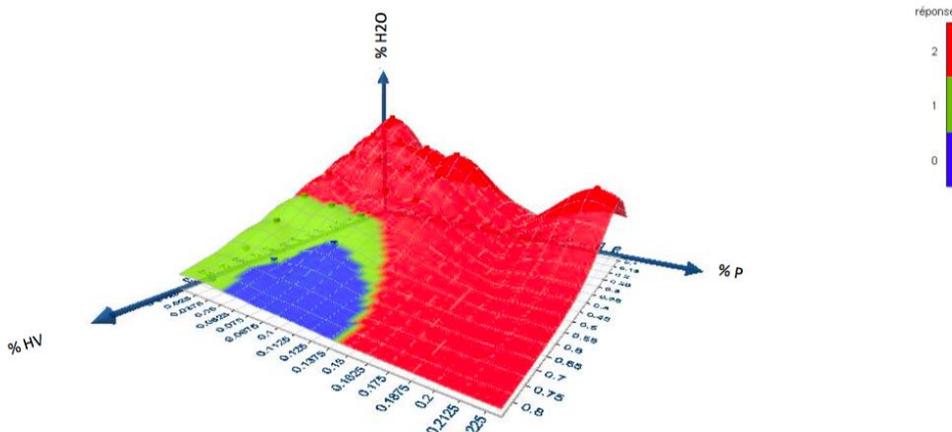


Figure 42 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Pastel

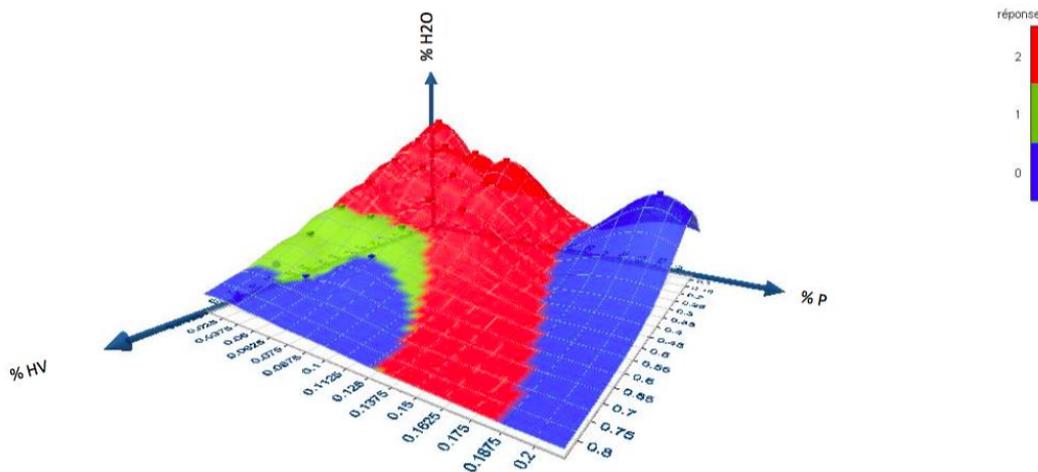


Figure 43 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Cardon

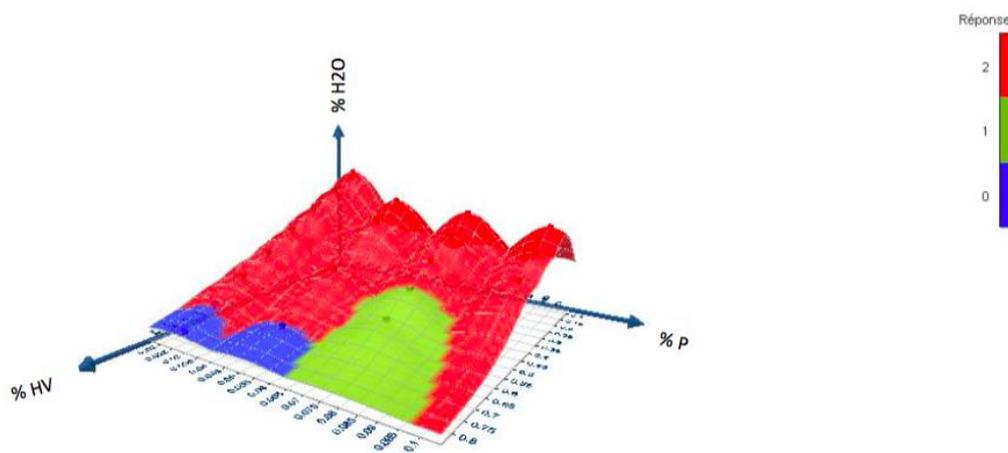


Figure 44 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Colza

La gamme de concentrations balayée avec les isolats protéiques étant limitée à 20% du total de l'émulsion, cela explique la concentration des points sur un seul quart du triangle. Les figures 41 à 44 correspondent à des représentations en trois dimensions des espaces utilisés pour les formulations. Ils permettent de mieux mettre en évidence les zones de concentrations balayées, dans la mesure où les trois axes n'ont pas tous la même échelle. Il apparaît en premier lieu que quelle que soit la graine, les faibles proportions de protéines liées à des teneurs en huile végétale élevées ne permettent pas la formation d'émulsions. Cela correspond aux zones en bleu sur les représentations 3D.

Pour le chanvre, les teneurs en protéines comprises inférieures à 18% couplées à des teneurs en huile végétale supérieures à 0,6% ne permettent pas la formation d'émulsions. Pour le pastel les teneurs en protéines comprises entre 5 et 13,75% couplées à des teneurs en huile végétale supérieures à 55% empêchent la formation d'émulsions.

Pour le cardon, les teneurs en protéines comprises entre 0 et 13,75% et supérieures à 18,75%, ainsi que des teneurs en huile végétale supérieures à 55% ne permettent pas la formation d'émulsions.

Pour le colza, la fourchette de 12,75 à 18,75% de protéines ainsi que des teneurs en huile végétale supérieures à 65% sont incompatibles.

La première conclusion qui peut être faite est que le colza semble permettre la formation d'émulsions plus riches en huile végétales comparativement aux autres graines étudiées. D'autre part, pour le chanvre et le cardon, il existe une zone supplémentaire multiphasique située à des teneurs élevées en protéines quelle que soit la teneur en huile. Les émulsions eau dans huile, en vert sur les figures, se forment pour des teneurs en eau inférieures ou égales à 50%, quelle que soit la graine utilisée. Cependant, ces zones sont situées à des endroits divers en fonction des graines : le chanvre induit la formation d'émulsions eau dans huile à des concentrations en huile comprises entre 55 et 65%, et en protéines comprises entre 5 et 18%. Pour le pastel, les teneurs en protéines comprises entre 8 et 12% et les teneurs en huile comprises entre 60 et 80% donnent lieu à des émulsions eau dans huile.

Parmi les quatre graines, le colza est celle dont l'isolat protéique donne lieu au plus grand nombre de formulations monophasiques parmi les essais réalisés. Il semblerait donc que ce soit l'isolat protéique le plus versatile en terme d'affinité avec les phases hydrophiles et lipophiles dans les émulsions, c'est effectivement le plus riche en albumines. Les isolats issus des tourteaux de chanvre et de cardon sont quant à eux plus riches en glutéines.

Il est intéressant de noter que les isolats protéiques de pastel présentent des capacités de formation d'émulsions quasi similaires à celles du colza.

Dans le cas du chanvre et du cardon, ces capacités sont plus limitées et similaires.

De manière générale, à des teneurs en protéines faibles dans l'émulsion, il apparaît qu'en fonction de l'augmentation de la teneur en huile, trois zones apparaissent successivement : la zone rouge, correspondant à des émulsions huile dans eau, puis la zone verte correspondant à des émulsions eau dans huile, et enfin la zone bleue, correspondant à l'absence de formation d'émulsions. Cependant, lorsque la concentration en protéines augmente, on observe la formation d'émulsions huile dans eau, même à des teneurs en eau relativement faibles (inférieures à 50%). Il semblerait donc que les isolats protéiques favorisent la formation d'émulsions huile dans eau. Ces derniers seraient donc de nature plutôt hydrophile.

## II.4 Fractionnement aqueux de graines

L'objectif de ces travaux était de soumettre les graines à un fractionnement aqueux avant d'effectuer un transfert d'échelle sur un procédé continu, en l'occurrence l'extrusion bi-vis permettant de produire des émulsions *in situ*.

Les graines de colza, chanvre, cardon et pastel ont subi un fractionnement aqueux en batch, afin d'évaluer leur comportement face à celui-ci, et également de jauger la nature des fractions obtenues à l'issue du fractionnement aqueux.

Les graines de lin ont été sélectionnées du fait de leurs propriétés mucilagineuses. Les mucilages correspondent à un réseau polysaccharidique, libéré lors du contact prolongé des graines avec de l'eau chauffée. L'intérêt de leur utilisation en formulation réside dans leurs propriétés rhéologiques. L'extrait obtenu sous forme de gel va contribuer à stabiliser l'émulsion, au même titre que des gommes telle que le xanthane.

Leur fractionnement aqueux est donc destiné à libérer ces mucilages. Les mucilages seront ensuite incorporés directement dans le réacteur thermo-mécano-chimique par le solvant d'extraction.

## **II.4.1 Procédé de fractionnement des graines de lin entières**

### **II.4.1.1 Extraction des mucilages de lin dans la littérature**

Le mucilage de lin peut être extrait à partir des :

- graines entières (O'Mullane and Hayter, 1993)
- graines concassées (O'Mullane and Hayter, 1993)
- coques seules (O'Mullane and Hayter, 1993)
- du tourteau (Gros et al., 2003)

Cependant, la plupart des travaux privilégient l'extraction du mucilage depuis la graine entière.

Dans la littérature, plusieurs procédés d'extraction sont décrits. Parmi eux, l'extraction sous agitation batch est la plus courante. Les procédés suivants sont également cités:

- l'extraction en continu (Zhang et al., 2009)
- l'extraction sous décharges électriques (Gros et al., 2003)
- l'extraction par micro-ondes (Geetha et al., 2009)

Certains procédés, en particulier ceux qui impliquent des enzymes et des tampons, ou des extractions par explosion à la vapeur, engendrent une dégradation des polysaccharides (Gros et al., 2003; Wanasundara and Shahidi, 1997; Wu et al., 2010). Le procédé d'extrusion bi-vis dégrade également les mucilages. Ces dégradations sont liées à des changements physico-chimiques complexes, liées à des altérations structurales, et des réactions de Maillard.

Ces procédés d'extraction de mucilages sont fréquemment réalisés en amont de procédés d'extraction des protéines ou de l'huile. La présence de mucilages lors de ces procédés peut en effet diminuer les rendements d'extraction (Gros et al., 2003).

Il est possible de cultiver du lin sur la base de teneurs en mucilage variables, sans impact sur la teneur en huile. Dans ce cas-là, le solvant d'extraction employé est l'eau. La macération aqueuse ne présente pas de conditions dénaturantes d'extraction des mucilages, mais le potentiel total d'extraction n'est pas atteint dans ces conditions-là. Il est à noter que l'extraction en milieu acide favorise la solubilité des pectines pariétales,

tandis que l'extraction en milieu basique favorise la solubilité des protéines et des hémicelluloses pariétales (Macquet, 2007) ;

L'optimisation de l'extraction du mucilage de la graine de lin par l'eau est liée aux critères suivants :

- le ratio liquide/solide (Gros et al., 2003; Zhang et al., 2009)
- la température (Fedeniuk and Biliaderis, 1994)
- la durée (Fedeniuk and Biliaderis, 1994)
- le traitement post-extraction (Fedeniuk and Biliaderis, 1994)

L'augmentation de la température et de la durée d'extraction tendent à augmenter la quantité de co-produits extraits (protéines, lipides, ...)

Une fois les mucilages extraits, la séparation liquide solide (entre les graines et l'extrait mucilagineux) peut être effectuée :

- par filtration sur laine de quartz
- sur maille métallique (Wanasundara and Shahidi, 1997)
- sur filtres (Warr et al., 2003)
- par centrifugation (Gros et al., 2003)

Les polysaccharides peuvent également être précipités à l'éthanol (Kadivar, 2001).

Une fois extraits, divers procédés peuvent être appliqués sur les mucilages afin de les purifier :

- par précipitation alcoolique (Cui et al., 1994, 1996; Fedeniuk and Biliaderis, 1994; O'Mullane and Hayter, 1993; Savoie et al., 2008; Warrand et al., 2005)
- par dialyse (Fedeniuk and Biliaderis, 1994; O'Mullane and Hayter, 1993; Warrand et al., 2005)
- par ultrafiltration (O'Mullane and Hayter, 1993)
- par chromatographie échangeuse d'ions (Cui et al., 1994; Warrand et al., 2005)
- -par purification sur argile : ce dernier procédé est destiné à déprotéiniser les mucilages (Fedeniuk and Biliaderis, 1994)

Le produit fini peut également être concentré au rotavapor (Cui et al., 1994; Fedeniuk and Biliaderis, 1994), et/ou séché dans un four ventilé, un lyophilisateur ou un atomiseur (Cui et al., 1996; Fedeniuk and Biliaderis, 1994; O'Mullane and Hayter, 1993; Warr et al., 2003).

#### **II.4.1.2 Extraction aqueuse des graines de lin entières**

Le procédé employé est détaillé dans la partie expérimentale, paragraphe P.E.2.1.

La première étape consiste en une mise en contact des graines et de l'eau, avec un ratio liquide/solide de 20, puis en une séparation liquide/solide, destinée à récupérer la phase aqueuse enrichie en mucilages.

Tableau 39 : Bilan massique de la première étape de production de mucilages

	Entrées brutes (kg)	Entrées sèches (kg)	Sorties brutes (kg)	Sorties sèches (kg)
Graines	11,0	10,1	25,0	8,5
Liquide	200,0	0	179,0	1,1
% de perte	/	/	3,3	5,1

L'extrait liquide obtenu présente une teneur en matière sèche de l'ordre de 0,61%.

Les 179 kg de liquide récupérés à l'issue de l'extraction liquide/solide sont concentrés sous vide par un facteur 7. 24,1kg d'extrait aqueux/mucilagineux est récupéré. Cependant, cette dernière fraction mucilagineuse présente une teneur en pied importante, de l'ordre de 1%, pour une teneur en matière sèche exprimée de l'ordre de 4%. La fraction mucilagineuse contiendrait donc environ 25% d'« intrants » qu'il faut éliminer.

Les mucilages concentrés sont donc filtrés sur toile avec un dispositif de filtration sous vide de type Büchner afin d'en éliminer le pied.

La fraction mucilagineuse concentrée présente une teneur en matières sèches de 3,89%. Une fois filtrée, elle présente une teneur en matières sèches de 3,81%.

Cette fraction concentrée et filtrée est finalement lyophilisée, la masse de mucilages récupérée est de 834 g ce qui correspond à un rendement de 8,2%.

Les mucilages sont finalement broyés au broyeur Fritsch avec une grille de porosité 2 mm. Les différentes étapes du fractionnement sont schématisées et résumées ci-après sur la figure 45.

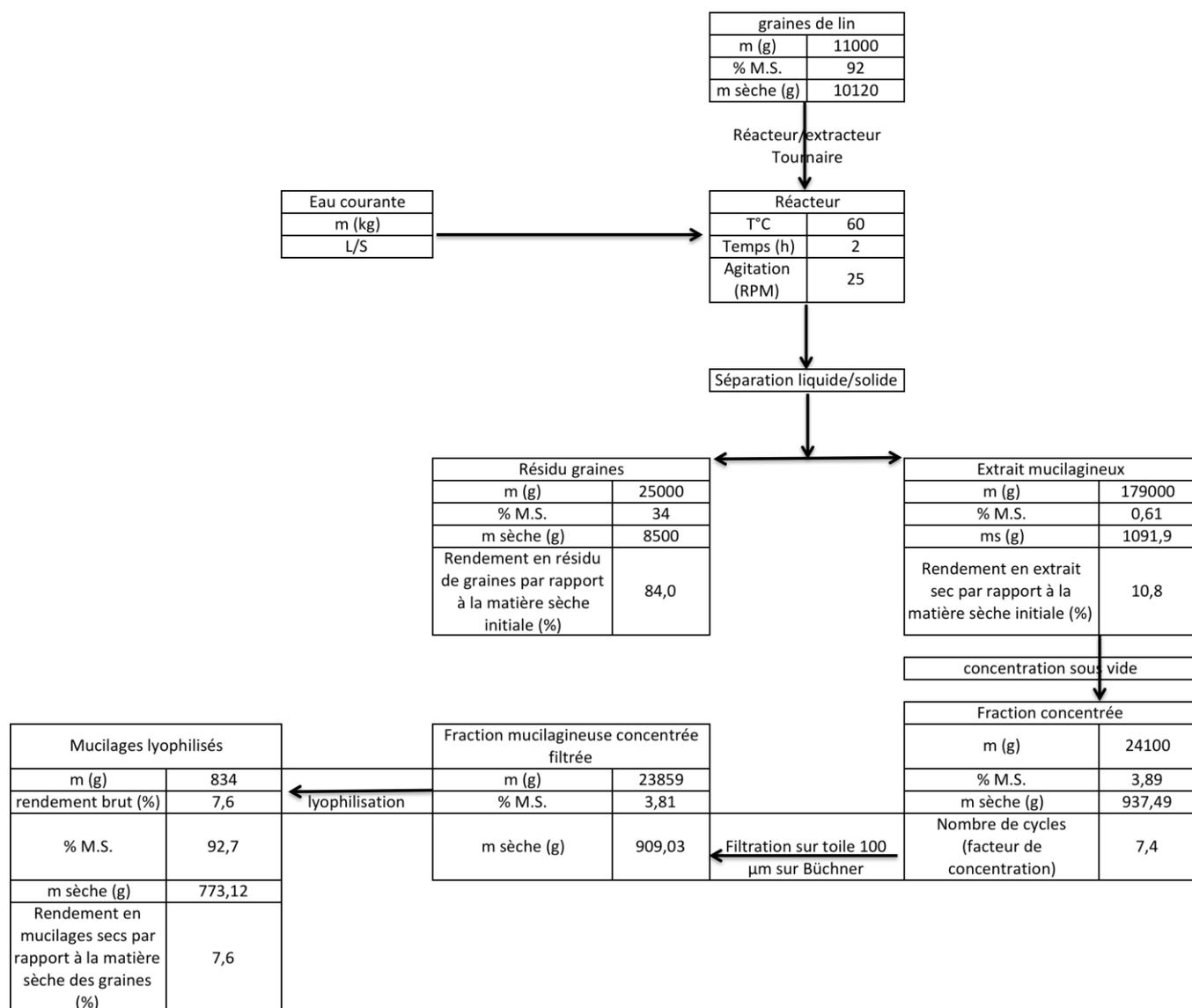


Figure 45 : Fractionnement aqueux des graines de Lin

Le rendement d'extraction en mucilages secs est de l'ordre de 7,6% par rapport à la matière sèche de la graine. Ce résultat est cohérent avec les données retrouvées dans la littérature (Fedeniuk and Biliaderis, 1994; Warrant et al., 2005; Zhang et al., 2009).

#### II.4.1.3 Caractérisation des fractions mucilagineuses

D'après la littérature, les mucilages sont caractérisés de la manière suivante (Zhang et al., 2009) :

- la teneur en protéines est déterminée par le dosage Kjeldahl de l'azote total
- la teneur en sucres totaux (DuBois et al., 1951; Wanasundara and Shahidi, 1997)
- la composition en monosaccharides par CPG-DIF

La composition en polysaccharides peut être complétée par :

- la teneur en polysaccharides acides (acides uroniques) (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973; van den Hoogen et al., 1998)
- la teneur en polysaccharides neutres (Monsigny et al., 1988)

La teneur en pentose (Wanasundara and Shahidi, 1997) est aussi un bon moyen de caractériser les propriétés du mucilage, l'arabinose et le xylose constituant la majeure partie des polysaccharides neutres, eux-mêmes représentant jusqu'à 75% du mucilage (Warrand et al., 2005).

La complexité chimique des mucilages limite l'utilisation de la viscosité cinématique pour l'évaluation de la teneur en mucilage, mais elle peut être mesurée lors des étapes d'optimisation et/ou du suivi des extractions.

Le MIV (mucilage indicator value) peut alors être calculé à partir de la formule suivante :

$$MIV = \frac{\text{Viscosité cinématique de l'extrait}(cSt) \times \text{volume d'eau}(mL)}{\text{quantité de graines}(g)}$$

La mesure de la viscosité cinématique est évaluée selon la norme NF EN ISO 3104.

La fraction mucilagineuse lyophilisée présente les caractéristiques suivantes :

**Tableau 40 : Composition des extraits mucilagineux lyophilisés**

	Teneur en matière sèche (%)	Teneur en matières minérales (% M.S.)	Teneur en lipides <sup>1</sup> (% M.S.)	Teneur en protéines <sup>2</sup> (% M.S.)	Teneur en sucres totaux <sup>3</sup> (% M.S.)
Mucilages lyophilisés obtenus lors de nos travaux	92,72 ± 0,04	15,44 ± 0,05	2,80 ± 0,04	26,94 ± 0,05	36,92 ± 0,29
Valeurs de la littérature (O'Mullane and Hayter, 1993; Rebolé et al., 2002)	/	11,3 20	10	8,7 20	91,7 >98

<sup>1</sup> la teneur en lipides des mucilages est déterminée par dosage colorimétrique (Reversat, 1976)

<sup>2</sup> la teneur en protéines est déterminée par le dosage de l'azote total (Méthode Kjeldahl)

<sup>3</sup> la teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode au phénol sulfurique (DuBois et al., 1956)

La teneur en matière minérale élevée (15,4% de la matière sèche) des mucilages n'est pas surprenante. Selon (O'Mullane and Hayter, 1993), elle peut atteindre jusqu'à 20% de la matière sèche. La teneur en protéines est conforme à celles retrouvées dans la littérature, tandis que le taux de lipides semble très faible. Cette dernière peut avoir été sous-estimée

par la méthode de dosage employée, la méthode de dosage colorimétrique des lipides étant une méthode peu conventionnelle. Il aurait peut être été pertinent d'employer une méthode analytique plus poussée, telle que la RMN, pour doser ces lipides.

De manière générale, les différences entre nos résultats et ceux observés dans la littérature peuvent être expliqués entre autres par le génotype de la graine, ses conditions de culture (humidité, ensoleillement, ...), mais également par le mode d'extraction des mucilages.

Les caractérisations ne permettent pas de boucler la composition des mucilages. La méthode de dosage des sucres totaux au phénol sulfurique étant peu fiable, il est possible que la teneur en sucres totaux ait été sous-estimée. Elle pourrait donc en réalité atteindre 54,82% de la matière sèche des mucilages.

- Dosage qualitatif des sucres totaux

L'échantillon de mucilages a été soumis à une hydrolyse à l'acide chlorhydrique et analysé par HPLC. Les résultats obtenus sont les suivants :

**Tableau 41 : Analyse des monosaccharides dans les mucilages (%)**

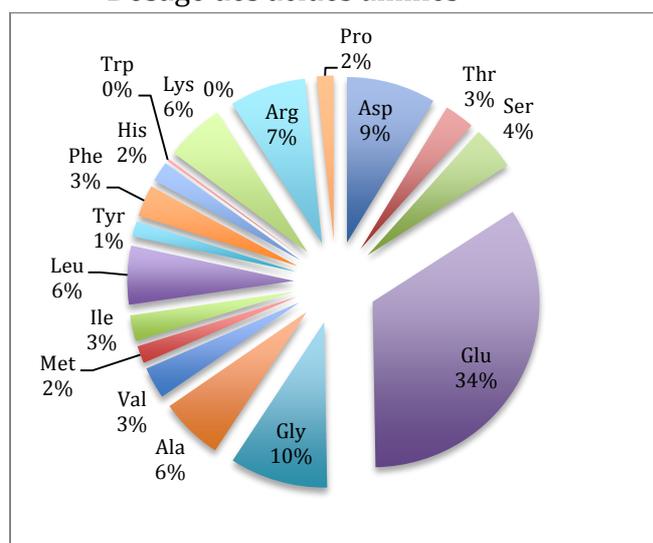
Sucres totaux (%)	Arabinose	Rhamnose	Galactose	Glucose	Xylose
34,23	4,71 ± 0,03	1,85 ± 0,47	7,69 ± 0,29	7,16 ± 0,23	12,83 ± 1,28

Au sein de ces sucres totaux, les répartitions sont les suivantes :

**Tableau 42 : Répartition centésimale de la fraction sucres**

Sucre simple	% du total des sucres totaux
Arabinose	13,8
Rhamnose	5,4
Galactose	22,5
Glucose	20,9
Xylose	37,5

- Dosage des acides aminés



**Figure 46 : Répartition massique des acides aminés dans les mucilages de lin**

Si l'on compare ce diagramme avec celui obtenu sur les graines de lin, on constate une diminution de la concentration en glycine, en arginine et en aspartate, qui passent de 10% à respectivement 7 et 9%. La teneur en serine passe de 6 à 4%. En contrepartie, la teneur en acide glutamique passe de 23 à 34%, et la teneur en glycine de 7 à 10%.

Ces différences peuvent s'expliquer par une sélectivité des protéines co-extraites avec les mucilages. Cela laisse supposer que ce sont plutôt des protéines hydrosolubles, du type albumines.

#### **II.4.2 Fractionnement aqueux des graines broyées**

Ces travaux sont une introduction au fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis, décrit dans le chapitre III suivant.

L'objectif a été :

- d'évaluer la faisabilité du procédé d'extraction aqueuse
- de comparer le comportement des graines, dont les formes et compositions variées ont une influence sur le comportement lors de leur fractionnement aqueux
- d'obtenir des rendements indicatifs, afin de transposer le procédé batch à un procédé continu, en réacteur thermo-mécano-chimique de type extrudeur bi-vis

##### **II.4.2.1 Description du protocole de fractionnement**

Le protocole employé pour cette manipulation est décrit dans la partie expérimentale, paragraphe P.E.2.2.

La manipulation a été réalisée sur les graines de colza, de chanvre, de cardon et sur un lot de graines de pastel désiliquées. Les graines de pastel toujours pourvues de leurs siliques ne sont pas adaptées à ce protocole de fractionnement aqueux en batch du fait de leur très faible densité. Elles occupent un volume nettement supérieur à celui des autres graines. De ce fait le ratio liquide/solide choisi pour le colza et adapté aux autres graines n'est pas applicable aux graines de pastel.

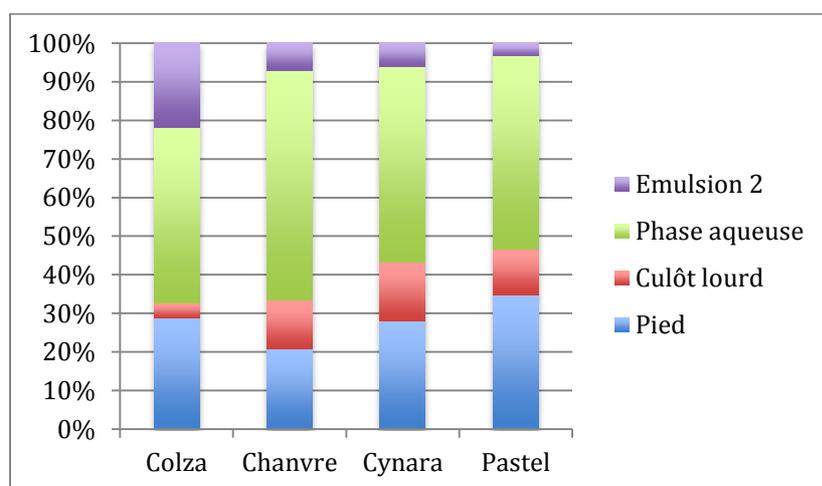
Dans tous les cas, 150g de graines finement broyées sont mises en contact avec 425g d'eau. Cela représente un ratio liquide/solide théorique de 2,8 et une teneur en solide dans le mélange de l'ordre de 26%.

##### **II.4.2.2 Répartition et caractérisation des phases pour chaque graine**

Les mêmes ratios liquide/solide, ainsi que les mêmes durées et conditions d'extraction ont été appliqués pour les graines de colza, de chanvre, de cardon et de pastel. Le tableau 43 et les figures 47 et 48 présentent la répartition des différentes phases pour chaque extrait de graine.

**Tableau 43 : Compositions et répartition des différentes phases après le fractionnement aqueux des graines**

	Colza	Chanvre	Cardon	Pastel
m <sub>G</sub> (g)	150	150	150	150
m <sub>H2O</sub> (g)	425	425	425	425
L/S	2,83	2,82	2,83	2,83
m pied (g)	189,03	120,18	138,7	172,57
% du total	32,9	20,90	28,02	34,89
% MS	40,76	48,12	47,7	41,48
m Emulsion 1	385,97	454,82	356,26	322,01
% du total	67,1	79,10	71,98	65,11
% MS	16,32	15,25	15,21	15,55
m culôt lourd (g)	24,26	71,70	91,27	58,46
% du total	4,22	12,47	15,34	11,82
% MS	38,21	44,44	33,46	44,57
m phase aqueuse (g)	297,05	342,82	301,17	247,19
% du total	51,66	59,62	50,62	49,98
% MS	5,19	5,03	4,23	5,62
m émulsion 2	143,41	40,31	35,82	16,37
% du total	24,94	7,01	6,02	3,31
% MS	52,14	70,13	54,06	46,95



**Figure 47 : Répartition de la matière brute dans les différentes phases pour le fractionnement aqueux en batches**

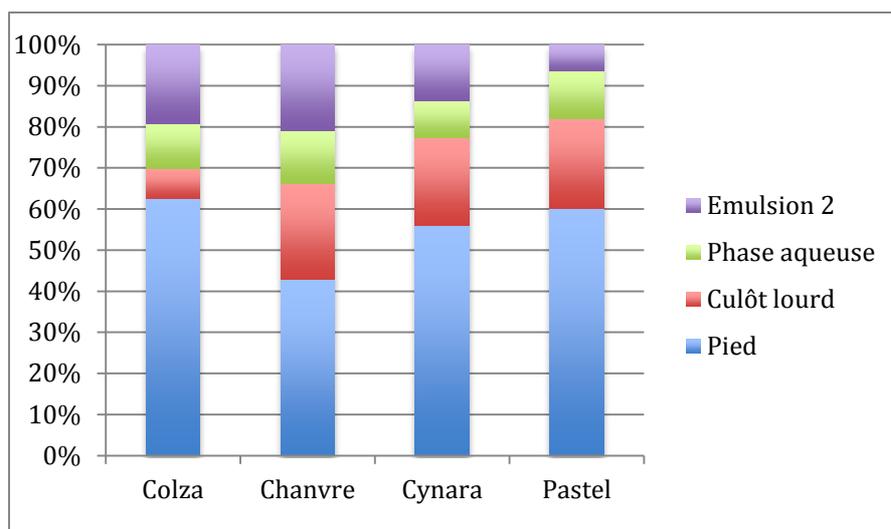


Figure 48 : Répartition de la matière sèche dans les différentes phases pour le fractionnement aqueux en batches

Il est important de noter que quelle que soit la graine traitée, les fractions obtenues sont identiques. A l'issue du mélange, une phase aqueuse plus ou moins émulsifiée est obtenue. Les particules solides correspondant aux résidus de graines sont en suspension au sein de cette phase. Une première étape de filtration donne lieu à une phase émulsifiée, et les résidus solides issus de la graine sont appelés « pied ». L'étape suivante consiste en une centrifugation de la phase émulsifiée précédemment obtenue. Pour toutes les graines traitées, trois phases sont obtenues : une phase lourde et dense, de densité supérieure à celle de l'eau, et retrouvée au fond du tube de centrifugation. Elle est appelée culot lourd. Une phase aqueuse intermédiaire est surmontée d'une phase émulsifiée de plus faible densité. Cette dernière est appelée « émulsion 2 ». Néanmoins, il est important de noter que pour le chanvre, le cardon et le pastel les quantités d'émulsion 2 sont faibles, mais également peu stables, et peu homogènes comparativement à celles obtenues avec le colza.

En termes de répartition de la matière brute décrite sur la figure 47, la différence majeure est observée dans le cas du chanvre : la phase de pied représente environ 40% du total des phases, contre plus de 50% pour le colza, le cardon et le pastel. Cette différence peut être liée au taux de gonflement des graines. Celui du chanvre est inférieur à 100%, ces graines ont donc une capacité à retenir l'eau inférieure à celle des autres graines employées. Le chanvre se détache des autres graines par un rendement en phase aqueuse émulsifiée supérieur.

La teneur en culôt lourd du colza est nettement inférieure à celle des autres graines. Cela est lié à la composition intrinsèque de la graine, qui est probablement moins riche en composés lourds hydrophile, tels que les pectines.

Dans le cas de la répartition en matière sèche, décrite sur la figure 48, le chanvre se détache des autres graines avec 40% de la matière sèche totale retrouvée dans le pied, contre des valeurs de l'ordre de 60% pour le colza, le cardon et le pastel. Le pied correspond dans ce cas-là aux particules solides de graines broyées. Le fait que le pied du chanvre représente une proportion moindre en matière sèche du total des sorties peut

être expliqué par le fait que les composés bioactifs, extractibles par l'eau, soient plus disponibles dans le cas du chanvre que pour les autres graines.

La répartition en matière sèche correspondant à l'émulsion 2 est nettement supérieure pour le colza et le chanvre (20%) que pour le cardon (15%) et le pastel (5%). L'obtention de cette émulsion 2 est le principal challenge du fractionnement aqueux des graines, ce résultat est donc important à prendre en compte lors du passage en système continu.

Ces travaux nous ont prouvé que les graines présentaient un comportement très différent : les graines de colza se détachent nettement des autres si l'on se place d'un point de vue de production d'émulsions 2. En revanche, si l'on s'intéresse plus particulièrement à la séparation liquide/solide, le chanvre semble avoir le meilleur comportement. Concernant le cardon et le pastel, ils présentent des comportements proches de ceux du colza pour la séparation liquide/solide. Le cardon présente une teneur en émulsion 2 relativement proche de celle du colza, mais le pastel est bien différent, avec seulement 5% de la matière sèche des sorties retrouvée dans l'émulsion 2.

Ces résultats laissent augurer une meilleure faisabilité lors de la transposition en procédé continu pour le colza que pour les autres graines. De ce fait, le colza sera choisi comme substrat modèle pour la mise en place des conditions du procédé, décrites dans le chapitre suivant.

## II.5 Conclusion

Les résultats présentés au cours de ce chapitre nous ont permis de mieux connaître les graines sélectionnées, qui présentent des caractéristiques très variées :

- des graines de pastel (désiliquées) et de colza riches en huile (teneurs respectives 30.8 et 39.4% M.S.)
- des graines de chanvre riches en protéines (32% M.S.)
- des graines de cardon à la composition équilibrée (20.8 % M.S. de protéines, 21.8 % M.S. de lipides et 30% de fraction pariétale)
- des graines de lin présentant la particularité de libérer une fraction mucilagineuse

Aussi, leurs profils d'acides gras très différents les uns des autres sont majoritairement composés d'acides gras insaturés et polyinsaturés, ce qui en fait un avantage pour des applications en cosmétique.

L'obtention des pseudo-isolats protéiques ainsi que l'étude de leurs propriétés fonctionnelles, et leur exploitation dans les diagrammes de phase donne également lieu à des résultats très variés, liés non seulement à la nature des protéines de chaque graine, mais également à leur disponibilité. Le tracé de diagrammes ternaires eau/huile/extrait protéique, pour le chanvre, le colza, le cardon et le pastel avait non seulement pour but de comparer les propriétés émulsifiantes des extraits protéiques, mais également d'évaluer les concentrations auxquelles ils sont utilisables en formulation. Ces résultats, couplés à ceux de la classification d'Osborne, laissent supposer que les protéines des graines de colza présentent une disponibilité supérieure à celle des autres graines étudiées ici.

Les cinq graines sélectionnées sont donc différentes mais complémentaires en termes de leurs compositions protéiques et lipidiques.

Le fractionnement aqueux appliqué aux trois graines broyées de colza, chanvre, cardon et pastel donne lieu à une phase liquide, enrichie en lipides sous forme émulsifiée, au sein de laquelle les particules solides issues de la graine sont en suspension. Une première étape de filtration permet de séparer les particules solides issues de la graine de la phase liquide. Cette phase liquide émulsifiée étant peu stable, elle est centrifugée pour donner lieu à trois phases supplémentaires :

- un culôt lourd hydrophobe
- une phase aqueuse intermédiaire
- une phase plus légère hydrophobe, dont la densité est inférieure à celle de l'eau et sous forme émulsifiée

L'obtention de ce type de phases lors de l'extraction aqueuse de graines sur des dispositifs de paillasse du type broyeur Silverson n'est pas surprenante au vu des résultats obtenus lors du fractionnement aqueux des graines de Tournesol (Evon, 2008) et de Neem (Faye, 2010).

Ici encore, les résultats pour les quatre graines testées sont très hétérogènes, mais c'est la graine de colza qui semble répondre le mieux au procédé, permettant d'obtenir des rendements d'extraction en émulsion 2 nettement supérieurs à ceux des autres graines.

Afin d'améliorer le débit de production de ces émulsions, il a été décidé de mettre en place un procédé de fractionnement aqueux continu, par extrusion bi-vis. Ces résultats sont décrits dans le chapitre suivant.

La complémentarité des graines en fonction de leurs compositions physico-chimiques variées sera exploitée, de même que les mucilages de lin entreront en jeu dans la stabilisation des émulsions obtenues.



# Chapitre III : Fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis



## III. Fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis

### III.1 Introduction

L'objectif spécifique du chapitre est de développer un procédé continu, permettant de produire des émulsions à partir de différentes graines oléoprotéagineuses, seules ou en mélanges.

Rappelons que le protocole de fractionnement aqueux des graines développé au chapitre précédent met en œuvre principalement quatre étapes :

- le broyage de la matière première, avant sa mise en contact avec le solvant
- l'extraction liquide/solide, consistant en la mise en contact sous agitation du solvant avec les graines préalablement broyées en réacteur batch agité
- la séparation solide/liquide, permettant par filtration d'obtenir un filtrât, sous la forme d'une fine émulsion huile dans eau et un résidu solide
- une seconde étape de séparation liquide/liquide destinée à séparer les phases hydrophiles et hydrophobes constituant le filtrât.

Ces travaux ont démontré la possibilité d'obtenir des émulsions à partir de graines oléagineuses, par fractionnement aqueux discontinu et de développer de nouveaux types de produits, en l'occurrence des émulsions 100% végétales. Devant l'intérêt des produits, et leurs applications multiples, mais également dans la mesure où l'étape de filtration est relativement contraignante, il a été décidé de mettre en place un procédé visant à obtenir des émulsions en continu. Le procédé choisi est le fractionnement via un réacteur-extrudeur bi-vis. Dans le cadre de nos travaux, le terme d'extrudeur, ou d'extrusion, est un abus de langage dans la mesure où l'extrusion est un procédé de fabrication lors duquel un matériau est contraint de traverser une filière, dans le but de lui donner une forme spécifique. Cette dite filière n'est pas utilisée dans le cadre de ces travaux, et l'extrudeur bi-vis est utilisé comme un réacteur thermo-mécano-chimique ouvert.

Sa grande modularité permet la mise en place de filtres au niveau de la zone de séparation liquide/solide, ce qui permet de réaliser in-situ la première étape de post-traitement suivant l'extraction batchs.

Les travaux d'extrusion ont été effectués sur un extrudeur bi-vis BC21, développé par la société CLEXTRAL.

Les émulsions obtenues pour chaque graine sont comparées entre elles, de même que les rendements d'extraction en huile végétale et en protéines. La graine de colza est utilisée en tant que substrat modèle pour ces travaux, pour des raisons de disponibilité et de coût. C'est à partir des graines de colza que les conditions d'extrusion appliquées aux autres graines ont été fixées.

Ces travaux visent également à comparer, dans des conditions identiques, le comportement de quatre graines face à un fractionnement aqueux en extrusion bi-vis.

Afin d'étudier des effets synergiques d'extraction entre les graines, des co-extrusions de deux graines sont effectuées. L'intérêt de ces travaux est de transférer le procédé développé à l'échelle d'une seule graine, à un mélange de graines. Il s'agit également de

profiter de particularités physico-chimiques de fractions extractibles d'une graine pour y entraîner et y mélanger les fractions d'une graine différente.

Le dernier volet de ces travaux d'extrusion consiste à étudier l'incorporation directe d'un actif dans la phase aqueuse employée pour l'extrusion afin d'améliorer la stabilisation des émulsions mais aussi d'ajouter une fonctionnalité supplémentaire à l'émulsion. Les actifs choisis ici sont les mucilages de lin. Plus particulièrement, dans ce volet sera étudiée l'influence de l'incorporation des mucilages sur le fractionnement aqueux et l'extraction des graines, et d'autre part, la comparaison de la stabilité des émulsions obtenues avec et sans mucilages.

## III.2 Généralités sur le fractionnement aqueux des graines oléo-protéagineuses en extrudeur bavis

### III.2.1 Principes généraux du fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis

Comme décrit dans le chapitre I, l'extrudeur bi-vis peut être utilisé en tant que réacteur thermo-mécano-chimique (TMC) continu pour le fractionnement aqueux de graines. Dans notre cas, l'extracteur bi-vis mis en œuvre est du type Clextral BC21. Ses principales caractéristiques sont rapportées dans la partie expérimentale.

Pour ce type d'essais, l'extrudeur, constitué de sept modules, est typiquement divisé en quatre zones (figure 49) :

- Une zone d'alimentation, au sein de laquelle les graines sont distribuées par le biais d'une trémie, préalablement étalonnée en fonction du débit d'entrée en graines choisi. Au sein de cette zone, les vis à double filet trapézoïdal du module 1, suivies de vis de convoyage à double filet du module 2 convoient la matière vers la zone de mélange située en aval.
- Une zone de broyage sous contrainte de cisaillement, au sein de laquelle deux séries de disques malaxeurs broient la matière et en extraient l'huile et les composés bioactifs. Des vis de convoyage à pas de vis décroissant assurent l'avancée de la matière entre les deux zones de malaxeurs.
- Une zone d'extraction liquide/solide dans laquelle l'huile et les composés bioactifs extraits des graines sont mis en contact avec l'eau, introduite par le biais d'une pompe au début du module 5. Des séries de vis de convoyage à pas décroissant assurent le transport du mélange liquide/solide vers la zone de filtration située en aval.
- La zone de séparation liquide/solide est située au niveau des modules 6 et 7. Les contrefilets présents au niveau du module 7 permettent la formation d'un bouchon dynamique de matière, qui assure la séparation solide/liquide *in situ*. En effet, le liquide rencontre le bouchon de matière présent dans le module 7 et s'écoule préférentiellement par le filtre situé au module 6. Ce module de filtration est constitué de quatre demi-coquilles percées de trous coniques de 1 mm de

diamètre à l'intérieur et de 2 mm à l'extérieur. Le solide déstructuré est récupéré à la sortie du module 7.

La température du fourreau est régulée au niveau des modules 2, 3, 4, 5 et 7 par le biais de colliers chauffants. Les modules 1 et 6 sont ouverts, respectivement pour permettre l'introduction de graines et l'écoulement du liquide. Ces deux modules ne sont pas thermorégulés.

### **III.2.2 Schéma général de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis et post-traitements**

Des paramètres opératoires communs à l'ensemble de notre étude ont été choisis pour construire le schéma de fractionnement en extrudeur bi-vis :

- La température de consigne a été fixée à 50°C afin d'éviter la dénaturation de l'huile et des composés bio-actifs tout en favorisant l'écoulement de la phase liquide
- Le débit d'alimentation en graines a été fixé à 4 kg/h
- Le débit d'entrée en solvant d'extraction, l'eau dans notre cas, a été fixé en fonction du ratio liquide/solide envisagé
- La vitesse de vis a été fixée à 250 RPM

L'efficacité d'extraction liquide/solide résulte donc des étapes :

- de broyage cisailant qui exprime l'huile et les composés bioactifs hors de la fraction structurale,
- d'extraction des molécules d'intérêt lors de la mise en contact avec le solvant dont la diffusion dans le solide est facilitée par la déstructuration préalable de ce dernier
- de séparation solide/liquide lors du pressage et de la filtration.

Il existe deux fractions différentes en sortie du procédé d'extraction thermo-mécano-chimique :

- Le filtrât, qui correspond à la fraction s'étant écoulée par le filtre
- L'extrudât, correspondant au résidu solide déstructuré.

Ces travaux ont visé à étudier et valoriser le filtrât. L'extrudât a été caractérisé d'un point de vue physico-chimique, mais sa valorisation n'a pas été explorée à ce jour, même si des pistes seront évoquées.

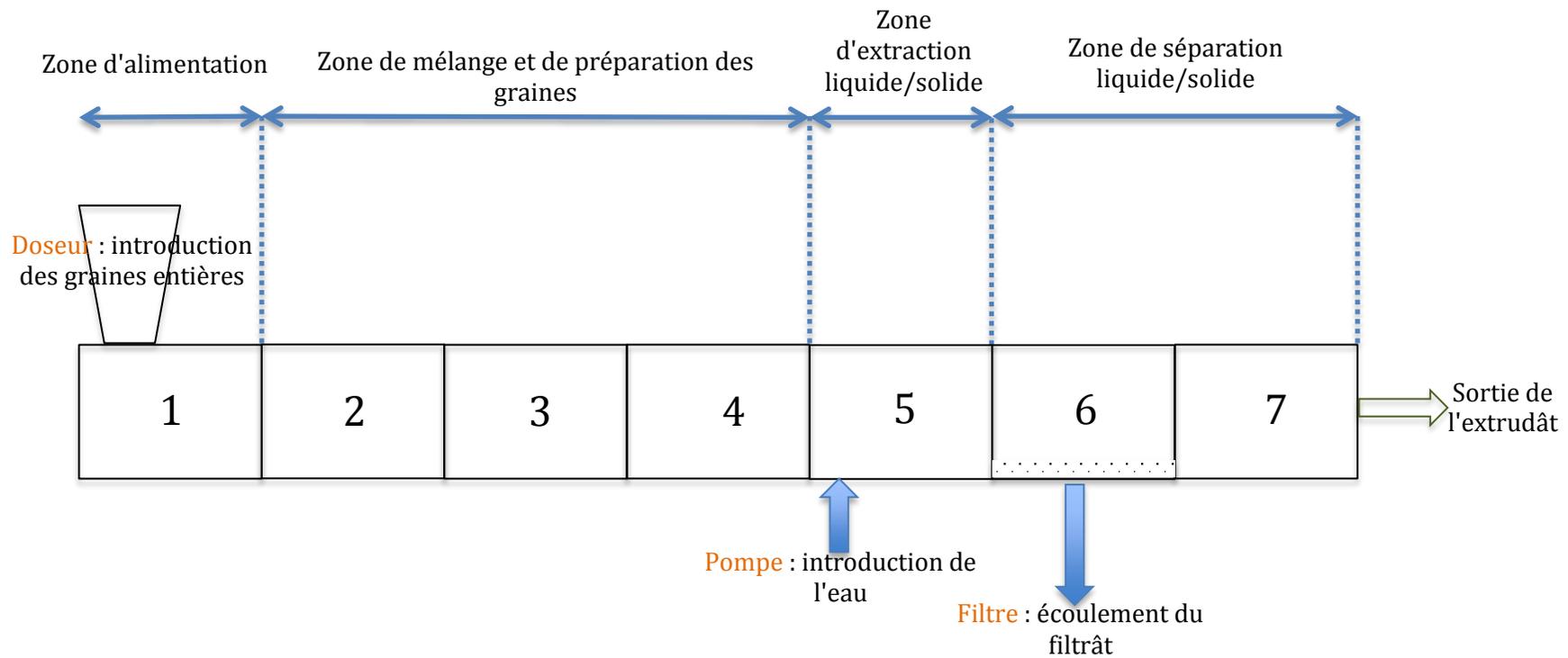


Figure 49 : Procédé général de fractionnement aqueux des graines en extrudeur bi-vis

Les post-traitements diffèrent selon les fractions produites lors de l'extrusion.

Les extrudats sont séchés 48 heures à 50°C avant analyse. Ils subissent ensuite les caractérisations chimiques suivantes : évaluation de leurs teneurs en matière sèche, en matière minérale, en protéines et en huile.

Les filtrats correspondent à une fine émulsion, présumée huile dans eau du fait de sa teneur en humidité de l'ordre de 80%. Au sein de celui-ci, des particules solides sont en suspension. Ces particules composant le « pied » correspondent à la fraction solide entraînée par le liquide lors de la séparation de phases dans l'extrudeur bi-vis. Elles sont de granulométrie inférieure à celle des pores du filtre, et ne traversent pas le bouchon dynamique.

A cause de sa composition multiphasique, le filtrat sera amené à subir dans la plupart des cas, et cela, en fonction de l'origine de la graine, un post-traitement destiné à séparer les différentes phases et à assurer ainsi sa purification.

La première étape de post-traitement consiste à isoler le pied par filtration sur toile de porosité 100 µm, sous pression réduite, sur un dispositif de type Büchner.

La phase liquide filtrée correspond à une première émulsion, qui sera appelée Emulsion 1 dans le reste du manuscrit.

Une seconde étape de post-traitement consiste à centrifuger l'émulsion 1, qui se divise alors en trois phases :

- Une phase inférieure, dite culot lourd.
- Une phase intermédiaire, dite phase aqueuse.
- Une phase hydrophobe supérieure, correspondant à une émulsion concentrée et appelée Emulsion 2.

Notons que les phases observées lors du post-traitement du filtrat sont identiques à celles observées lors du fractionnement aqueux de graines en réacteur batch agité. En revanche, les répartitions massiques sont différentes du fait de l'étape de séparation liquide/solide séparant directement le filtrat de l'extrudat en extrudeur bi-vis.

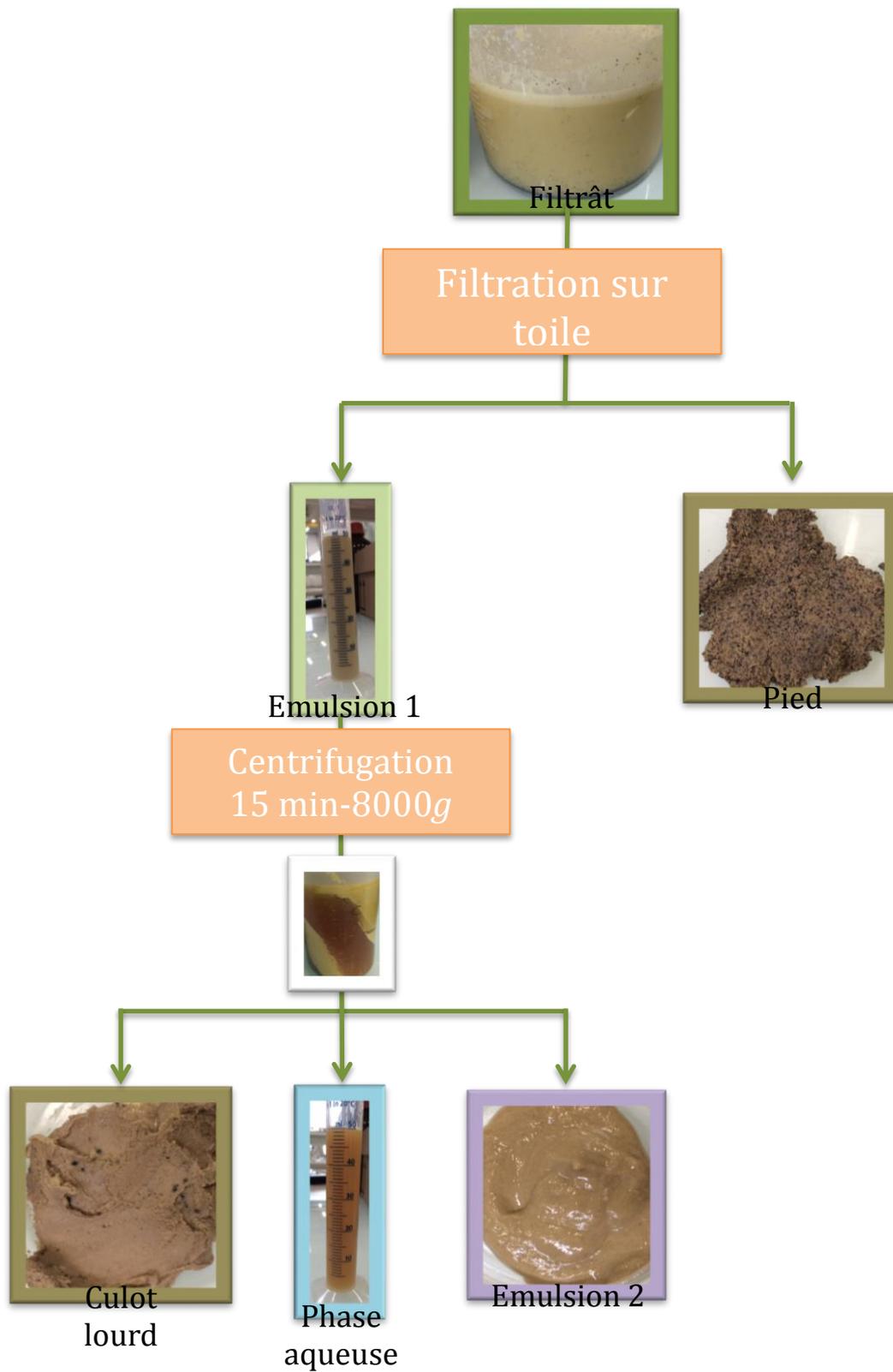


Figure 50 : Schéma de post-traitement appliqué aux filtrâts issus du fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis

### III.2.3 Description mathématique des données acquises suite au fractionnement

La durée de prélèvement étant fixée, les débits massiques de filtrâts et extrudâts sont calculés pour chaque essai. Le filtrât subit les post-traitements précédemment décrits permettant d'en séparer le pied, puis le culot lourd, la phase aqueuse et l'émulsion 1.

Les teneurs en matière sèche, matière minérale, protéines et lipides sont calculées pour chaque phase. Elles permettent de calculer ensuite les débits et rendements exprimés eux aussi en matière sèche, matière minérale, protéines et lipides.

Les abréviations retenues pour la suite de l'étude sont les suivantes :

**Tableau 44 : Abréviations correspondant aux phases de sortie d'extrusion**

Phase	Abréviation
Extrudât	Ex
Filtrât	F
Emulsion 1	Em 1
Pied	P
Culot lourd	CL
Phase aqueuse	PA
Emulsion 2	Em 2

Les débits en filtrât et en extrudât, sont mesurés directement en sortie du procédé d'extrusion.

$Q_F$  est le débit brut de filtrât, en kg/h.

$Q_{Ex}$  est le débit brut d'extrudât, en kg/h.

La formule suivante est appliquée afin de déterminer le **débit en matière sèche**  $Q_{M.S.Ex}$  de l'extrudât (kg/h):

$$Q_{M.S.Ex} = Q_{Ex} \times \%M.S.Ex$$

$Q_{Ex}$  est le débit brut de l'extrudât, en kg/h.

$\%M.S.Ex$  est la teneur en matière sèche de l'extrudât, en pourcentage.

Le **débit en protéines**  $Q_{P.Ex}$  (kg/h) dans l'extrudât est calculé de la manière suivante :

$$Q_{P.Ex} = Q_{M.S.Ex} \times \%P.Ex$$

$Q_{M.S.Ex}$  est le débit en matière sèche dans l'extrudât, en kg/h.

$\%P.Ex$  est la teneur en protéines dans l'extrudât, en pourcentage par rapport à la matière sèche.

Le **débit en lipides**  $Q_{L.Ex}$  (kg/h) dans l'extrudât est calculé de la manière suivante :

$$Q_{L.Ex} = Q_{M.S.Ex} \times \%L.Ex$$

$Q_{M.S.Ex}$  est le débit en matière sèche dans l'extrudât, en kg/h.

$\%L.Ex$  est la teneur en lipides dans l'extrudât, en pourcentage par rapport à la matière sèche.

Les rendements en matière sèche, matière minérale, protéines et lipides sont calculés grâce aux analyses physico-chimiques réalisées sur les graines employées pour l'extrusion et sur les fractions issues du procédé.

Ils sont systématiquement calculés par rapport aux teneurs en matières sèches et minérales, protéines et lipides contenus initialement dans la graine.

De ce fait, le terme de rendement d'extraction ne peut être appliqué qu'aux fractions liquides. Les teneurs en matières sèches, minérales, protéines et lipides contenues dans les solides (extrudât et pied) sont considérées comme des concentrations résiduelles, qui correspondent ainsi au rapport entre la teneur en composés dosés dans le solide de sortie et la teneur en composés dosés dans la graine entrante.

Le **rendement en matière sèche** dans la phase aqueuse  $R_{M.S.PA}(\%)$  est calculé comme suit :

$$R_{M.S.PA} = 100 \times \frac{Q_{M.S.PA}}{Q_G \times \% M.S.G}$$

$Q_{M.S.PA}$  est le débit en matière sèche de la phase aqueuse en kg/h

$Q_G$  est le débit massique de graines, en kg/h

$\% M.S.G$  est la teneur en matière sèche des graines, en %

Le **rendement en protéines** dans la phase aqueuse  $R_{P.PA}(\%)$  est calculé par rapport à la quantité de protéines initialement présente dans la graine :

$$R_{P.PA} = 100 \times \frac{Q_{P.PA}}{Q_G \times \% M.S.G \times \% P_G}$$

$Q_{P.PA}$  est le débit de protéines de la phase aqueuse en kg/h

$Q_G$  est le débit massique de graines, en kg/h

$\% M.S.G$  est la teneur en matière sèche des graines, en %

$\% P_G$  est la teneur en protéines dans la matière sèche des graines, en %

Le **rendement en lipides** dans la phase aqueuse  $R_{L.PA}(\%)$  est calculé par rapport à la quantité de lipides initialement présente dans la graine :

$$R_{L.PA} = 100 \times \frac{Q_{L.PA}}{Q_G \times \% M.S.G \times \% L_G}$$

$Q_{L.PA}$  est le débit en lipides de la phase aqueuse en kg/h

$Q_G$  est le débit massique de graines, en kg/h

$\% M.S.G$  est la teneur en matière sèche des graines, en %

$\% L_G$  est la teneur en lipides dans la matière sèche des graines, en %

La **concentration résiduelle en matière sèche** dans l'extrudât est calculée comme suit :

$$CR_{M.S.Ex} = \frac{Q_{M.S.Ex}}{Q_G \times \% M.S.G} \times 100$$

$CR_{M.S.Ex}$  est la concentration résiduelle en matière sèche dans l'extrudât, en %.

$Q_{M.S.Ex}$  est le débit en matière sèche dans l'extrudât, en kg/h.

$Q_G$  est le débit en graines en entrée de l'extrudeur, en kg/h.

$\% M.S.G$  est la teneur en matière sèche des graines, en %.

La **concentration résiduelle en protéines** dans le pied est calculée comme suit :

$$CR_{P P} = \frac{Q_{P P}}{Q_G \times \%P_P} \times 100$$

$CR_{P P}$  est la concentration en protéines dans le pied, en %.

$Q_{P P}$  est le débit en protéines dans le pied, en kg/h.

$Q_G$  est le débit d'entrée en graines dans l'extrudeur, en kg/h.

$\%P_G$  est la teneur en protéines dans les graines, en % de la matière sèche.

### III.3 Fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis

La graine de colza, décrite dans le chapitre 1, est une graine oléagineuse, présentant une grande disponibilité dans la région Midi-Pyrénées. Elle a été choisie comme substrat modèle pour développer le procédé d'extraction TMC en extrudeur bi-vis. Pour rappel, sa composition est la suivante (tableau 45) :

**Tableau 45 : Composition des graines de Colza**

Teneur en matière sèche (%)	93,4
Teneur en fibres (%/M.S.)	29,5
Teneur en protéines (%/M.S.)	18,7
Teneur en huile (%/M.S.)	39,4

#### III.3.1 Etude des conditions opératoires du fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis

La définition du profil de vis est un élément clé du procédé d'extraction TMC en extrudeur bi-vis. En effet, de ce dernier dépendent les contraintes mécaniques appliquées aux graines ; contraintes essentielles, par exemple, à la déstructuration de la matière, à la diffusion du solvant dans cette dernière et à la séparation liquide/solide. Ce dernier agit aussi, conjointement avec d'autres paramètres opératoires, sur les rendements d'extraction par son influence sur le temps de séjour et/ou le remplissage de la machine. Plusieurs profils de vis ont été testés afin de réaliser l'ensemble des opérations unitaires envisagées lors de cette étude et de remplir le double objectif « produits » suivant : déstructuration efficace de l'extrudât et obtention d'un filtrât sous forme d'émulsion d'aspect stable.

Les différentes zones de contraintes, représentées techniquement par les éléments de vis, ont été choisies en fonction de leurs impacts sur la matière végétale :

- Les disques malaxeurs monolobes (Mal0 ou DM) sont généralement employés par série de 5 ou de 10. Ils permettent d'exercer un fort effet de compression radiale, écrasant ainsi la matière contre la paroi du fourreau. Leur effet de cisaillement est très important, mais mélangent peu la matière.
- Les disques malaxeurs bilobes (Mal2) sont généralement employés par série de 5 ou de 10 (soit 2,5 ou 5 cm de longueur pour la zone en question). Ils sont responsables de forts effets de compression et de cisaillement sur la matière. Leur angle de montage, à pas direct ou inverse, permet d'avoir une action de convoyage plus importante (pas direct) ou de cisaillement plus importante (pas inverse). Les disques malaxeurs bilobes favorisent une action de mélange intime entre la matière végétale et le solvant d'extraction employé, et sont intéressants pour l'extraction de composés bioactifs au sein des cellules végétales.
- Les contrefilets sont des vis à pas inverse. Ce sont les éléments les plus restrictifs du profil de vis lors d'une extraction solide/liquide puisqu'ils permettent la formation du bouchon dynamique, qui assure le pressage de la matière végétale gorgée de solvant, entraînant ainsi l'écoulement du filtrât et la sortie de l'extrudât. Le filtrât s'écoule par une zone de filtration, située en amont des contre filets. Ici, des éléments à pas inverse, de forme conjuguée et à double filets ont été employés, ils sont notés CFC2. Ses filets présentent trois encoches en forme de demi-lune, permettant un débit de fuite de la matière comprimée par le bouchon. La matière peut ainsi traverser le contrefilet. Il est possible de jouer sur leur pas de vis et leur longueur afin d'obtenir un bouchon plus ou moins contraignant.

Le tableau 46 présente les profils testés chronologiquement lors de nos essais préliminaires.

Des observations visuelles au niveau des modules d'introduction et de sortie de l'extrudeur ont permis de donner des premières conclusions :

- L'engorgement de l'extrudeur correspond à des essais pour lesquels la matière solide et la phase liquide rencontrent des zones de contrainte telles qu'elles empêchent leur avancée le long de la vis. Dans ce cas-là, le milieu liquide est refoulé vers l'entrée de l'extrudeur.
- La remontée d'huile correspond à un profil de vis trop contraignant qui empêche l'avancée de la matière le long de la vis. L'huile extraite par la première zone de malaxeurs est alors refoulée vers l'entrée de la vis.
- Une déstructuration insuffisante correspond des essais pour lesquels la séparation liquide/solide existe mais conduit à un extrudât peu déstructuré (présence résiduelle de graines) et un filtrât très peu chargé en matière organique. Le profil peut alors être considéré comme insuffisamment contraignant.

Tableau 46 : Chronologie des profils de vis testés lors des essais préliminaires

Profil		Ratio employé	L/S	Conclusions	Modification effectuée																																																					
1	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">↓ 1</th> <th colspan="2">induthérme 2</th> <th colspan="2">induthérme 3</th> <th colspan="2">plaque/induthérme 4</th> <th colspan="4">induthérme 5</th> <th colspan="3">filtre 6</th> <th colspan="2">induthérme 7</th> </tr> <tr> <th>T2F</th><th>T2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal 0 -</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal2 90°</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th> <th>CFC2</th><th>C2F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td><td>50</td> <td>33</td><td>25</td> <td>10x5</td><td>33</td> <td>33</td><td>25</td> <td>5x5</td><td>33</td><td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td> <td>-33</td><td>33</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7		T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 -	C2F	C2F	C2F	Mal2 90°	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F	50	50	33	25	10x5	33	33	25	5x5	33	25	25	25	16	16	16	-33	33	4		Engorgement, remontée d'huile et d'eau	Remplacement des Mal2 90° par des vis de convoyage C2F
	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 -	C2F	C2F	C2F	Mal2 90°	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F																																									
50	50	33	25	10x5	33	33	25	5x5	33	25	25	25	16	16	16	-33	33																																									
2	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">↓ 1</th> <th colspan="2">induthérme 2</th> <th colspan="2">induthérme 3</th> <th colspan="2">plaque/induthérme 4</th> <th colspan="4">induthérme 5</th> <th colspan="3">filtre 6</th> <th colspan="2">induthérme 7</th> </tr> <tr> <th>T2F</th><th>T2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal 0 -</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th> <th>CFC2</th><th>C2F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td><td>50</td> <td>33</td><td>25</td> <td>10x5</td><td>33</td> <td>33</td><td>33</td> <td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td> <td>-33</td><td>33</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7		T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F	50	50	33	25	10x5	33	33	33	25	25	25	25	16	16	16	-33	33	4		Remontée Huile	Diminution du ratio liquide/solide		
	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F																																										
50	50	33	25	10x5	33	33	33	25	25	25	25	16	16	16	-33	33																																										
3	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">↓ 1</th> <th colspan="2">induthérme 2</th> <th colspan="2">induthérme 3</th> <th colspan="2">plaque/induthérme 4</th> <th colspan="4">induthérme 5</th> <th colspan="3">filtre 6</th> <th colspan="2">induthérme 7</th> </tr> <tr> <th>T2F</th><th>T2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal 0 +</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th> <th>CFC2</th><th>C2F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td><td>50</td> <td>33</td><td>25</td> <td>10x5</td><td>33</td> <td>33</td><td>33</td> <td>33</td><td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td> <td>-33</td><td>33</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7		T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F	50	50	33	25	10x5	33	33	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33	3		Déstructuration insuffisante de l'extrudât, filtrât clair	Diminution du pas de vis des contrefilets de -33 à -16		
	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F																																										
50	50	33	25	10x5	33	33	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33																																										
4	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">↓ 1</th> <th colspan="2">induthérme 2</th> <th colspan="2">induthérme 3</th> <th colspan="2">plaque/induthérme 4</th> <th colspan="4">induthérme 5</th> <th colspan="3">filtre 6</th> <th colspan="2">induthérme 7</th> </tr> <tr> <th>T2F</th><th>T2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal 0 +</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th> <th>CFC2</th><th>C2F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td><td>50</td> <td>33</td><td>25</td> <td>10x5</td><td>33</td> <td>33</td><td>33</td> <td>33</td><td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td> <td>-16</td><td>33</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7		T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F	50	50	33	25	10x5	33	33	33	33	25	25	25	16	16	16	-16	33	3		Déstructuration insuffisante	Ajout d'une zone de Mal0 à pas négatif au module 5		
	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F																																										
50	50	33	25	10x5	33	33	33	33	25	25	25	16	16	16	-16	33																																										
5	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">↓ 1</th> <th colspan="2">induthérme 2</th> <th colspan="2">induthérme 3</th> <th colspan="2">plaque/induthérme 4</th> <th colspan="4">induthérme 5</th> <th colspan="3">filtre 6</th> <th colspan="2">induthérme 7</th> </tr> <tr> <th>T2F</th><th>T2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal 0 +</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>C2F</th><th>C2F</th> <th>Mal0 -</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th><th>C2F</th> <th>CFC2</th><th>C2F</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>50</td><td>50</td> <td>33</td><td>25</td> <td>10x5</td><td>33</td> <td>33</td><td>25</td> <td>25</td><td>25</td> <td>5x5</td><td>33</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td> <td>-16</td><td>33</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7		T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F	50	50	33	25	10x5	33	33	25	25	25	5x5	33	25	16	16	16	-16	33	2-3		Engorgement Huile+Eau	Décalage de la zone de Mal0- et décalage de la pompe pour introduire l'eau après les zones de contrainte	
	↓ 1		induthérme 2		induthérme 3		plaque/induthérme 4		induthérme 5				filtre 6			induthérme 7																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F																																										
50	50	33	25	10x5	33	33	25	25	25	5x5	33	25	16	16	16	-16	33																																									

6	<table border="1"> <tr> <td colspan="2">↓</td> <td colspan="2">indutherme</td> <td colspan="2">indutherme</td> <td colspan="2">plaque/indutherme</td> <td colspan="3">indutherme</td> <td colspan="4">filtre</td> <td colspan="2">indutherme</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>15</td><td>16</td><td>17</td> </tr> <tr> <td>T2F</td><td>T2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>Mal 0 +</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>Mal0 -</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td> </tr> <tr> <td>50</td><td>50</td><td>33</td><td>25</td><td>10x5</td><td>33</td><td>25</td><td>5x5</td><td>33</td><td>33</td><td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td><td>-16</td><td>33</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>																	↓		indutherme		indutherme		plaque/indutherme		indutherme			filtre				indutherme		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-16	33	2-4	OK	Augmentation du pas des contrefilets, qui passent de -16 à -33									
	↓		indutherme		indutherme		plaque/indutherme		indutherme			filtre				indutherme																																																																										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																																																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F																																																																										
50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-16	33																																																																									
7	<table border="1"> <tr> <td colspan="2">↓</td> <td colspan="2">indutherme</td> <td colspan="2">indutherme</td> <td colspan="2">plaque/indutherme</td> <td colspan="3">indutherme</td> <td colspan="4">filtre</td> <td colspan="2">indutherme</td> </tr> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td><td>6</td><td>7</td><td>8</td><td>9</td><td>10</td><td>11</td><td>12</td><td>13</td><td>14</td><td>15</td><td>16</td><td>17</td> </tr> <tr> <td>T2F</td><td>T2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>Mal 0 +</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>Mal0 -</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td><td>C2F</td> </tr> <tr> <td>50</td><td>50</td><td>33</td><td>25</td><td>10x5</td><td>33</td><td>25</td><td>5x5</td><td>33</td><td>33</td><td>25</td><td>25</td><td>25</td><td>16</td><td>16</td><td>16</td><td>-33</td><td>33</td> </tr> </table> <p style="text-align: center;">↑ Pompe</p> <p style="text-align: center;">filtration</p>																	↓		indutherme		indutherme		plaque/indutherme		indutherme			filtre				indutherme		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33	2-4	OK Emulsion grasse et épaisse										
	↓		indutherme		indutherme		plaque/indutherme		indutherme			filtre				indutherme																																																																										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17																																																																										
T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F																																																																									
50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33																																																																									
0-1	Pas de séparation solide/liquide																																																																																									

Un faible ratio liquide/solide, compris entre 2 et 4, a été choisi pour cette étude, afin de favoriser l'émulsification et la stabilisation de l'émulsion obtenue. La vitesse des vis a été fixée à 250 RPM pour les sept profils testés.

Les profils 1 à 3 ont mis en évidence la nécessité de travailler avec une première zone de malaxeurs montés à pas positif afin d'éviter l'engorgement de l'extrudeur par l'huile exprimée. En effet, les malaxeurs à pas négatifs créent une zone de rétention du liquide au sein de l'extrudeur et favorisent sa remontée vers l'amont de la vis.

Les profils 1 et 5 pour lesquels l'introduction du solvant a été réalisée entre les deux zones de mélange ont conduit à un double engorgement par la phase lipidique extraite et le solvant d'extraction. Il est donc nécessaire de placer l'introduction du solvant en aval des zones de mélange, soit au début du module 5.

Les profils 3 et 4, qui sont caractérisés par une seule zone de malaxage, n'ont pas permis d'obtenir un extrudât suffisamment déstructuré et un filtrât suffisamment concentré, sous forme émulsifiée. Une seconde zone de malaxeurs est donc nécessaire.

Le dernier module doit comprendre une zone de contrainte mécanique, à l'origine de la séparation liquide/solide. Une modification a été effectuée entre les profils 6 et 7, en augmentant le pas de vis des contrefilets qui passent de -16 à -33. Un pas de vis plus important conduit logiquement à une plus faible déstructuration de l'extrudât.

Tous ces ajustements ont permis la mise en place de deux profils de vis pour lesquels la faisabilité de l'extraction TMC en extrusion bi-vis des graines de colza a été validée. Les profils 6 et 7 ont donc permis de réunir nos critères qui étaient l'obtention d'un extrudât sec et déstructuré et d'un filtrât sous forme émulsifiée.

Suite à ces tests préliminaires, des modifications du profil de vis ont été effectuées afin de comprendre le phénomène d'émulsification au sein de l'extrudeur bi-vis.

Les zones de broyage des graines (Mal0 à pas positif) et de séparation solide/liquide (CFC2-33) ont été fixées, seules les zones de mélange intermédiaire et le placement de l'introduction du solvant ont varié (tableau 47).

Tableau 47 : Chronologie des profils de vis testés lors des essais réalisés afin de comprendre le phénomène d'émulsification

Profil	Ratio L/S employé																	Observations																																																																																								
7	↓																	2-4	OK émulsion grasse et épaisse																																																																																							
	1		indutherme 2		indutherme 3		plaque/indutherme 4		indutherme 5			filtre 6				indutherme 7																																																																																										
	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2			C2F																																																																																						
	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33			33																																																																																						
																	0-1	Pas de séparation liquide/solide																																																																																								
8	↓																		2	Emulsion légère aqueuse																																																																																						
	1		indutherme 2		indutherme 3		plaque/indutherme 4		indutherme 5			filtre 6				indutherme 7																																																																																										
	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F					CFC2	C2F																																																																																				
	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33																																																																																								
																	0,5-1,5	Emulsions de plus en plus denses																																																																																								
																			0	Pressage huile																																																																																						
9	↓																				2	Solide gras																																																																																				
	1		indutherme 2		indutherme 3		plaque/indutherme 4		indutherme 5			filtre 6				indutherme 7																																																																																										
	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 +	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2	C2F																																																																																								
	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33																																																																																								
																	10	↓																	2	Solide moins déstructuré	1		indutherme 2		indutherme 3		plaque/indutherme 4		indutherme 5			filtre 6				indutherme 7		T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal2 +90	C2F	CFC2	C2F	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33	33																								
10	↓																	2	Solide moins déstructuré																																																																																							
	1		indutherme 2		indutherme 3		plaque/indutherme 4		indutherme 5			filtre 6				indutherme 7																																																																																										
	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal2 +90	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F				CFC2	C2F																																																																																					
	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33			33																																																																																						

<b>11</b>	↓		indutherme		indutherme		plaque/indutherme		indutherme			filtre				indutherme		2	Solide moins déstructuré		
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>			<b>6</b>				<b>7</b>					
	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal2 +90	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2			C2F	
	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33			33	
												↑ Pompe				filtration					
<b>12</b>	↓		indutherme		indutherme		plaque/indutherme		indutherme			filtre				indutherme		2	Engorgement huile + eau		
	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>		<b>4</b>		<b>5</b>			<b>6</b>				<b>7</b>					
	T2F	T2F	C2F	C2F	Mal 0 +	C2F	C2F	Mal0 -	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	C2F	CFC2			C2F	
	50	50	33	25	10x5	33	25	5x5	33	33	25	25	25	16	16	16	-33			33	
												↑ Pompe				filtration					

Les premières conclusions quant à l'influence du profil sur le pressage de la matière peuvent être énoncées, par rapport aux aspects en sortie d'extrusion des extrudâts et des filtrâts (tableau 48). Les profils 9 à 11 conduisent à des extrudâts peu déstructurés, avec la présence résiduelle de graines entières.

Le profil 8 donne un extrudât présentant un état de déstructuration intermédiaire.

Le profil 7 fournit l'extrudât le plus déstructuré, qui présente également un aspect beaucoup plus humide. Ceci est dû au fait que la matière très déstructurée absorbe fortement l'eau injectée au sein de l'extrudeur. L'aspect de l'extrudât permet également d'envisager la présence d'un effet plastifiant, dû au chauffage et à l'absorption d'eau de la matière déstructurée.

**Tableau 48 : Aspect de l'extrudât pour différents profils de vis testés**

N° du profil	7	8	10
Aspect de l'extrudât			

Ces nombreux essais de profils permettent d'émettre des conclusions quant à l'influence des trois différentes zones de contrainte sur le pressage et l'extraction des graines.

Au niveau de la première zone de contrainte les disques malaxeurs Mal0 à pas positifs permettent d'écraser partiellement les graines et de libérer la fraction lipidique. Ceci est confirmé lors des ouvertures machine, opérées sur les profils 7 et 8, dont nous discuterons ultérieurement.

Il est possible de se demander si l'utilisation de Mal2, montés à pas positif ou neutre, aurait pu représenter une alternative pour cette première zone de malaxage. Même si cette configuration n'a pas été testée, les Mal2 sont connus pour avoir un effet plus cisailant qu'écrasant, effet typique des Mal0. Leur impact sur une graine entière serait donc plus faible que celui des Mal0. Cette comparaison a pu être réalisée sur la deuxième zone de mélange (profils 8 et 11). L'extrudât issu de l'essai avec des Mal0(+) est un solide déstructuré tandis que l'extrudât issu d'un essai avec des Mal2 est un solide très peu déstructuré. Ceci laisse supposer que des Mal2 au niveau de la première zone de contrainte n'auraient pas été adaptés pour permettre une déstructuration efficace des graines.

Ainsi, les disques malaxeurs Mal0 à pas positif semblent représenter le meilleur choix pour cette première zone de contrainte.

Au niveau de la deuxième zone de contrainte, l'utilisation de malaxeurs bilobes Mal2 à 90° donne lieu à une émulsion très aqueuse et à un extrudât qui présente un aspect très gras et peu déstructuré. Ainsi, les malaxeurs bi-lobes ont un impact insuffisant sur les graines.

Les disques malaxeurs Mal0 à pas négatif permettent une déstructuration efficace du solide, observée lors de l'ouverture machine du profil 7, pour un ratio liquide/solide de 2. La diminution du ratio liquide/solide à 1 ou 0,5 ne permet plus la séparation liquide/solide : le solide est trop déstructuré et empêche la tenue du bouchon mécanique. Un essai avec un ratio liquide/solide de 0 n'a pas permis de presser l'huile. Dans ce cas encore, la matière est fortement déstructurée et l'huile est intégralement réabsorbée par la matière au lieu d'être exprimée.

La présence de disques malaxeurs Mal0 à pas positifs entraîne une déstructuration moins efficace mais néanmoins correcte de la matière. Ceci est observé lors de l'ouverture machine effectuée sur le profil 8. Le ratio liquide/solide de 2 donne lieu à une émulsion d'apparence plus fluide et moins grasse que celle obtenue avec le profil 7.

De plus, l'extrudât produit sur le profil 8 a une teneur résiduelle en huile de l'ordre de 42%, contre 35% pour l'extrudât issu de l'essai colza produit avec le profil 7. La diminution progressive du ratio liquide/solide de 2 à 0,5 donne toujours lieu à une séparation liquide/solide et à la formation d'émulsion. Un essai de pressage d'huile a été possible avec ce profil.

Les malaxeurs monolobes à pas positif sont intéressants pour permettre l'émulsification à des ratios liquide/solide bas, et permettent également le pressage de l'huile. Les disques malaxeurs monolobes à pas négatif permettent la production d'émulsions stables à un ratio liquide/solide de 2.

Les contrefilets jouent un rôle clé dans la formation du bouchon : faisant suite à une série de vis ayant un pas de vis positif, ils présentent un pas de vis négatif, qui refoule la matière en amont, formant ainsi un bouchon, qui permet d'assurer le pressage et la séparation liquide/solide entre le filtrât l'extrudât. Les profils 6 et 7 présentaient respectivement des contrefilets ayant des pas de vis de -16 et -33. Dans les deux cas, la séparation liquide/solide semblait efficace, l'émulsification avait lieu et l'extrudât était suffisamment déstructuré. Ainsi, le pas de vis n'a pas été modifié lors des essais des profils 7 à 12.

Concernant l'introduction du solvant d'extraction, elle doit être effectuée après la deuxième zone de contraintes, donc en amont du module 5, sur une matière déjà déstructurée qui a la capacité d'absorber le liquide efficacement. Pour des Mal0 à pas positif ou des Mal2 montés à 90°, aucun engorgement n'est alors constaté et la séparation liquide/solide ainsi que la formation d'émulsion restent possible.

La détermination du temps de séjour a été effectuée pour les essais réalisés sur les profils 7 et 8 à des ratios liquide/solide de 2. Le protocole employé est détaillé dans la partie expérimentale, P.E.3.4. Le colorant choisi pour l'expérience est l'érythrosine. Un échantillon de graines préalablement colorées est introduit au niveau de l'entrée solide.

Ce type d'ajout est considéré comme étant une impulsion de Dirac, ne perturbant pas le fonctionnement stable de l'extrudeur.

Les extrudats et filtrats sont ensuite prélevés toutes les 10 secondes durant 5 minutes.

Les extrudats prélevés sont séchés 24h à 50°C, puis broyés finement et analysés par spectrophotométrie. Les filtrats sont également analysés par spectrophotométrie.

La colorimétrie permet de déterminer la concentration en traceur,  $C(t)$  dans les fractions de sortie. La fonction  $C(t)$  est intégrée par la méthode des trapèzes. Cela permet de déterminer la fonction de détermination des temps de séjour,  $E(t)$ .

La courbe ayant atteint un plateau au bout de trois minutes pour les filtrats et deux minutes trente pour les extrudats, seules les quatre premières minutes ont été représentées (figure 51).

Cette manipulation permet de compléter les points précédents quant à l'incidence de la 2<sup>ème</sup> zone de malaxeurs sur le comportement de la matière dans le réacteur bi-vis.

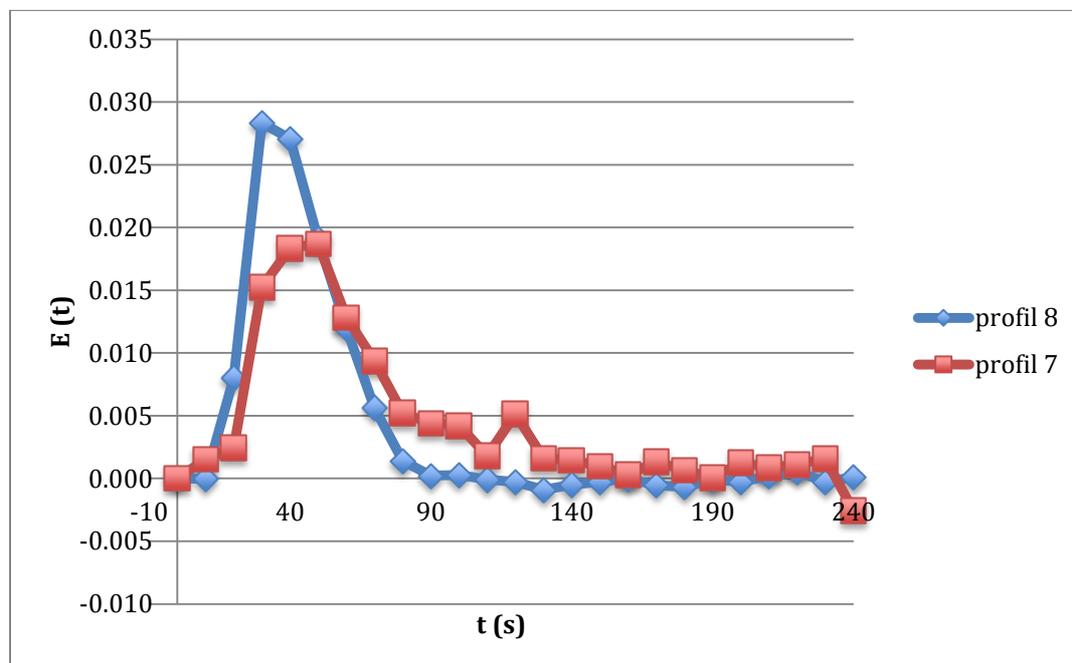


Figure 51 : Distribution du temps de séjour des extrudats (QG=4 kg/h, QE=8 kg/h, N=250 RPM)

Les extrudats des profils 7 et 8 présentent respectivement des temps de séjour de 46 et 41 secondes (figure 51). Des malaxeurs Mal0 à pas négatifs sont ainsi responsables de l'allongement du temps de séjour dans l'extrudeur.

Dans l'antériorité du laboratoire sur les déterminations de temps de séjour en extrusion bi-vis, il apparaît dans la plupart des cas que le temps de séjour de l'extrudat est supérieur au temps de séjour du filtrat. En effet, le filtrat s'écoule via le filtre tandis que le solide est retenu dans la zone des contrefilets avant d'être extrudé.

Dans notre cas, les temps de séjour des filtrats et des extrudats sont équivalents. Ceci est la conséquence d'une faible tenue mécanique de la matière dans le contrefilet. Le bouchon dynamique est peu compact. Le passage dans le contrefilet correspond alors à l'extrusion rapide du solide, non retenu par ces éléments de vis, et au pressage de ce dernier qui conduit à l'écoulement du filtrat.

Ces résultats de temps de séjour relativement courts et la proximité entre les temps de séjour des extrudâts et des filtrâts sont à relier avec l'absence de couple observée dans chacun des essais.

Remarquons que les temps de séjour mesurés dans l'extrudeur bi-vis sont très inférieurs à ceux appliqués lors du fractionnement aqueux en réacteur batchs. Dans l'hypothèse où les rendements d'obtention d'émulsions 1 et 2 s'avéraient comparables pour ces deux procédés, l'extrusion bi-vis présenterait un grand intérêt en termes de gain de temps et de limitation du nombre d'étapes du procédé.

Cette manipulation est destinée à évaluer le taux de remplissage de l'extrudeur, et également à visualiser le degré de déstructuration des graines au cours de la transformation TMC.

L'ouverture de la machine a été effectuée sur l'essai utilisant le profil 8. Le principe consiste à provoquer un arrêt d'urgence de l'extrudeur, lorsque ce dernier a atteint un état de fonctionnement stationnaire. Le fourreau est ensuite ouvert délicatement afin de pouvoir prélever la matière indépendamment sur chaque zone du profil de vis. La masse et la teneur en humidité de chaque prélèvement ont été mesurées.

Le profil 8 a été choisi du fait de sa polyvalence. En effet, il est employé aussi bien pour le pressage de graines que pour la production d'émulsions. Les répartitions massiques en solide sec et humide et la teneur en humidité du solide sont décrites sur la figure 52 ci-dessous.

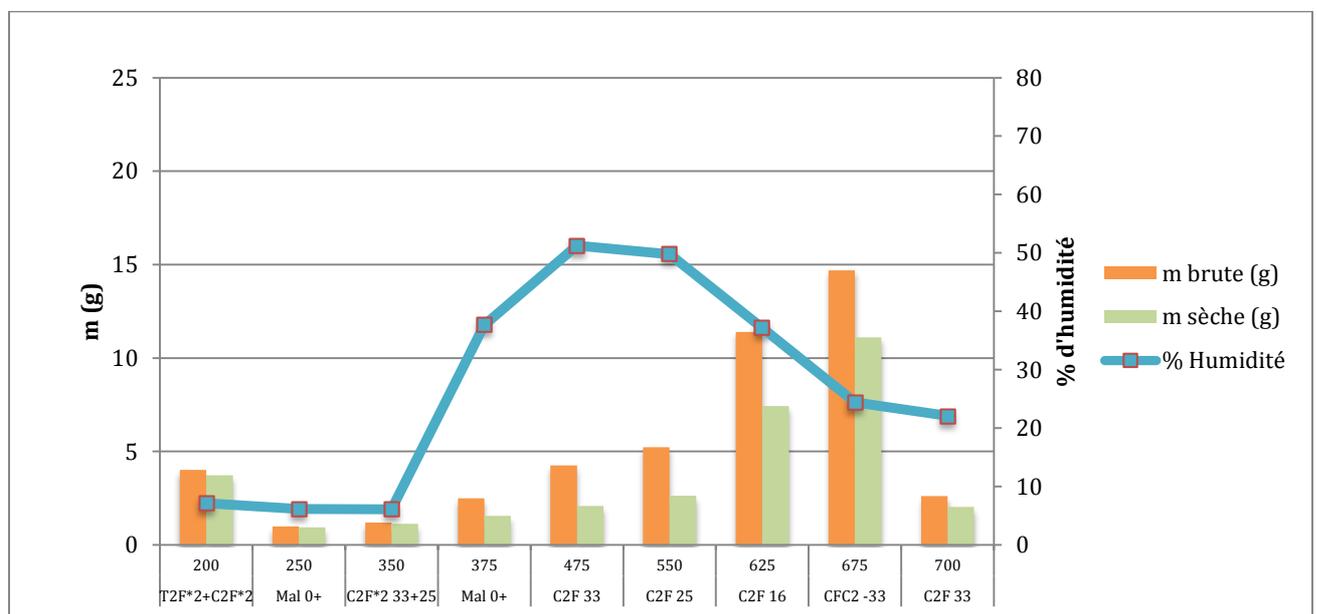


Figure 52 : Répartitions massiques en solides sec et humide et teneur en humidité du solide : profil 8

Les Mal 0 + convoient la matière vers les zones suivantes. Les Mal0+ contiennent environ 2 à 3 grammes de matière, présentant une teneur en humidité très faible, cela est lié au fait que le liquide n'a pas encore été introduit à ce stade.

A partir de la cinquième zone de prélèvements, le pas de vis des vis de convoyage diminue (33, 25 puis 16) et les pesées augmentent avec l'augmentation du pas de vis.

L'introduction d'eau se fait au niveau de la cinquième zone de prélèvements (C2F 33), ce qui explique l'augmentation flagrante pour les deux profils de la teneur en humidité de la matière prélevée à ce niveau là du profil.

La zone de contrefilets, située en aval du filtre, provoque une accumulation de matière, ce qui est confirmé sur le graphique par la nette augmentation de la pesée. En outre, le pressage provoque également une diminution de la teneur en humidité à ce niveau.

### III.3.2 Evaluation du procédé de fractionnement et caractérisation chimique des fractions produites

Les travaux précédents étaient destinés à l'évaluation de la faisabilité du fractionnement aqueux en extrusion bi-vis. Les principales conditions opératoires ont ainsi pu être mises en place.

Cette partie est consacrée à l'étude des fractions produites lors du fractionnement de la graine de colza.

Afin de déterminer les efficacités d'extraction de chacun des profils, les rendements d'extraction ont été calculés pour chaque phase liquide. Ils correspondent au rapport entre la teneur en matière sèche, protéines ou lipides dans la phase étudiée et les teneurs dans la graine initiale.

Il est important de noter que concernant les phases solides, il est plus correct d'exprimer les concentrations résiduelles. L'ensemble des résultats est regroupé dans le tableau 49. Leur exploitation sous forme d'histogrammes (figures 53 et 54) permet de conclure quant aux répartitions en matières brutes et sèches dans les différentes phases.

**Tableau 49 : Fractionnement TMC des graines de colza : conditions opératoires, répartitions massiques des différentes phases et rendements d'extraction en lipides et en protéines**

Essai n°	C01	C02	C03	C04	C05	C06
Profil de vis	6	7	8	9	10	11
Q <sub>G sec</sub> (kg/h)*	3,6	4,3	4,4	4,3	4,4	4,4
Q <sub>eau</sub> (kg/h)	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Ratio L/S	2,2	1,8	1,8	1,9	1,8	1,8
Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250
Couple moteur	0	0	0	0	0	0
Q <sub>Ex</sub> (kg/h)	4,5	5,7	4,6	4,6	4,6	4,6
% M.S.	47,9	43,3	76,8	74,4	78,8	80,0
R <sub>M.S.</sub> (%)	56,7	61,4	87,3	84,9	87,4	90,1
R <sub>P</sub> (%)	51,5	61,1	84,1	83,6	86,8	90,0
R <sub>L</sub> (%)	58,2	55,0	91,0	83,2	88,5	90,2
Q <sub>Fbrut</sub> (kg/h)	6,9	6,5	7,9	7,3	7,2	7,5
Q <sub>P</sub> (kg/h)	1,2	1,6	0,40	0,39	0,39	0,35

% M.S.	43,3	42,4	48,0	48,3	47,2	47,4
R <sub>M.S.</sub> (%)	13,4	16,2	4,7	4,7	4,4	4,1
R <sub>P</sub> (%)	9,8	13,4	10,9	4,8	4,2	4,2
R <sub>L</sub> (%)	9,3	22,7	6,2	5,6	5,4	5,2
<b>Q<sub>CL</sub></b> (kg/h)	0,39	0,39	0,15	0,20	0,18	0,15
% M.S.	34,9	29,0	29,2	27,1	29,4	32,9
R <sub>M.S.</sub> (%)	3,6	2,8	1,1	1,4	1,3	1,2
R <sub>P</sub> (%)	18,6	6,0	2,0	4,3	2,4	2,3
R <sub>L</sub> (%)	1,9	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Q<sub>PA</sub></b> (kg/h)	4,7	3,8	6,6	6,3	6,3	6,7
% M.S.	6,3	7,1	1,6	2,0	2,0	1,2
R <sub>M.S.</sub> (%)	7,9	6,6	2,5	3,1	3,1	2,0
R <sub>P</sub> (%)	17,4	14,3	5,0	6,1	4,8	3,7
R <sub>L</sub> (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Q<sub>Em2</sub></b> (kg/h)	0,65	0,76	0,35	0,44	0,36	0,26
% M.S.	76,1	69,7	51,4	55,3	44,2	40,8
R <sub>M.S.</sub> (%)	13,3	13,0	4,4	5,9	3,8	2,6
R <sub>P</sub> (%)	2,8	3,9	3,1	2,3	1,8	1,4
R <sub>L</sub> (%)	n.d.	25,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

*R<sub>M.S.</sub> est le rendement d'extraction en matière sèche, R<sub>P</sub> est le rendement d'extraction en protéines, R<sub>L</sub> est le rendement d'extraction en lipides*

*Q<sub>G sec</sub> est le débit d'entrée en graines sèches*

*Q<sub>eau</sub> est le débit d'entrée en eau*

La répartition en matière brute (figure 53) permet de dégager des conclusions sur la séparation liquide/solide dans l'extrudeur en fonction du choix du profil de vis. Pour les profils 8 à 11, la phase aqueuse est majoritaire (environ 60%), suivie par l'extrudât, tandis que les trois dernières fractions représentent moins de 10% de la matière brute introduite. Au contraire, pour le profil 7, l'extrudât représente environ 50% des sorties, suivi de la phase aqueuse, qui représente environ 30% des sorties. Le pied représente près de 15% des sorties, alors qu'il en représente moins de 5% avec les autres profils.

La séparation liquide/solide est ainsi plus efficace avec les profils 8 à 11.

La différence majeure entre le profil 7 et les quatre autres profils est située au niveau des malaxeurs. Leur montage avec un pas de vis négatif dans le profil 7 engendre une contrainte mécanique supérieure. Ainsi, la déstructuration des graines est plus efficace, et la diffusion du liquide extractant dans la matière est améliorée. Cette forte déstructuration s'accompagne de la formation de particules de faible granulométrie, qui sont entraînées par la phase liquide dans le filtrât. C'est pour cette raison que la teneur en pied est nettement plus élevée lors de l'utilisation du profil 7. De plus, le solide, fortement déstructuré, atteint les contrefilets avec une tenue mécanique affaiblie ce qui a pour conséquence de minimiser le rendement de séparation liquide/solide avec une quantité importante de fraction extrudât.

Pour les profils 8 à 11, en l'absence de déstructuration forte par la deuxième zone de malaxeurs à pas positif, c'est une contrainte mécanique supérieure qui s'applique au niveau des contrefilets sur un solide encore résistant mécaniquement. Ceci augmente le

rendement de séparation liquide/solide et conduit à des extrudâts de teneur en matière sèche supérieure à 70%.

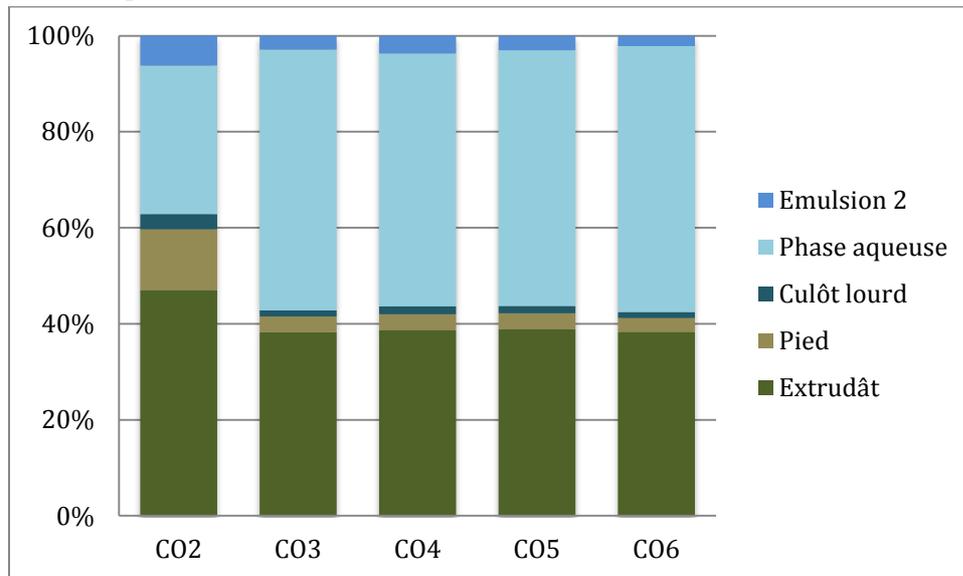


Figure 53 : Répartition massique (%) en matière brute pour le fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis

Comme dans le cas des matières brutes, la répartition en matière sèche est fortement impactée par la deuxième zone de mélange (figure 54). Nous pouvons distinguer l'essai C02 (profil 7) des autres essais (profils 8-11).

Pour les essais sur les profils 8 à 11, les sorties solides (extrudât et pied) représentent 90% de la matière sèche des fractions prélevées en sorties. Pour le profil 7, celle-ci représente moins de 80%.

La phase d'émulsion 2, qui représente l'intérêt principal des travaux, représente 15% des sorties sèches pour le profil 7. Pour les profils 8, 10 et 11 elle en représente environ 5%, alors que le profil 9 se détache puisque l'émulsion 2 représente près de 10% des sorties sèches.

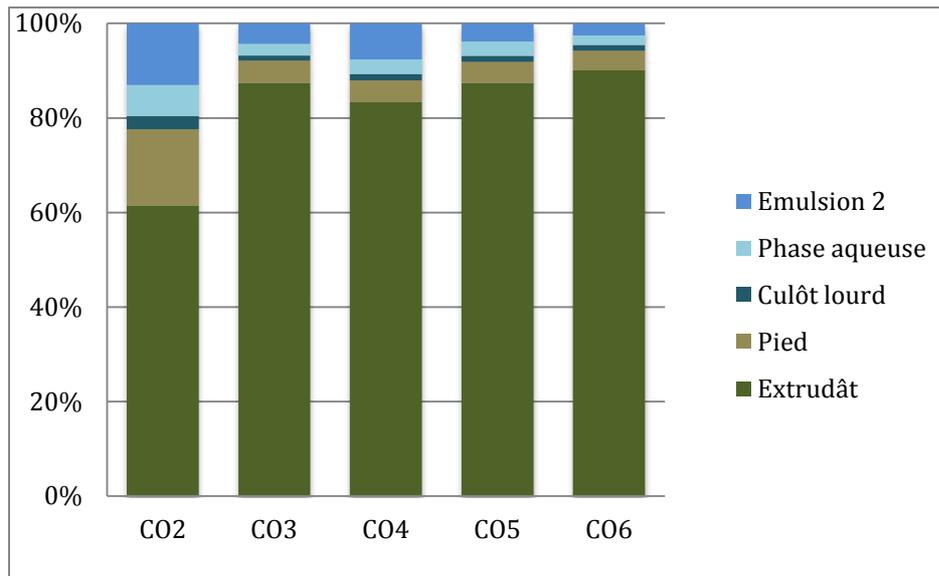


Figure 54 : Répartition massique (%) de la matière sèche pour le fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis

La forte déstructuration constatée dans l'essai C02 a conduit à une amélioration de la diffusion du solvant dans la matrice graine et par conséquent à une augmentation du rendement de solubilisation de la matière première dans la fraction liquide (phase aqueuse ou émulsion). Même si la forte déstructuration est aussi responsable d'un rendement de séparation liquide/solide inférieur et d'un entraînement important de particules solides dans le filtrât, le bénéfice qu'elle a apporté au niveau des rendements d'extraction matière dans l'émulsion 1 l'emporte.

Pour les quatre autres profils, l'extraction des graines a été moins efficace puisque la majorité de la matière sèche se retrouve au niveau de l'extrudât. Des nuances ont été détectées en fonction de la zone d'introduction du solvant et du type de malaxeurs de la deuxième zone de contrainte.

- Pour une même zone d'introduction liquide, que ce soit en amont ou en aval de la deuxième zone de contrainte, les malaxeurs monolobes montés avec un pas positif sont plus efficaces que les malaxeurs bilobes montés à 90°. La compression radiale exercée sur la matière a ainsi un effet déstructurant supérieur à celui induit par l'effet de mélange cisailant apporté par les malaxeurs bilobes. La diffusion du solvant en est améliorée et les rendements d'extraction sont incréments.
- Pour un même profil, l'introduction en amont de la deuxième zone de contrainte est bénéfique à l'extraction. Elle permet d'augmenter le temps de séjour du liquide et donc du mélange solide/liquide dans l'extrudeur, tout en améliorant la diffusion du solvant par le passage du mélange liquide/solide dans la deuxième zone de malaxeurs.
- Pour ces quatre essais, la meilleure configuration pour obtenir un extrudât suffisamment déstructuré, couplé à une progression efficace de la matière au sein de l'extrudeur est l'emploi de Mal0(+), avec une introduction de la pompe au niveau du module 4.

L'intérêt principal de ces travaux portant sur les émulsions 1, des histogrammes permettant de se focaliser sur leurs compositions ont été tracés. La figure 55 est un zoom sur les rendements en matière sèche dans les émulsions 1 pour tous les profils testés. Comme décrit précédemment, les profils 6 et 7 sont ceux permettant d'atteindre le meilleur rendement en matière sèche au sein des émulsions, c'est donc eux pour lesquels le filtrât a été le plus efficacement enrichi en composés extractibles. Dans tous les cas c'est la phase « émulsion 2 » qui concentre la plus grande partie de la matière sèche de l'émulsion 1, suivie de la phase aqueuse et du culot lourd. C'est la phase aqueuse qui représentait la plus grande partie de la masse brute de l'émulsion 1.

En se référant à des extractions analytiques réalisées pour la caractérisation des graines dans le chapitre II, nous pouvons conclure que les rendements d'extraction en matière sèche de l'émulsion 1 avoisinent, dans les cas les plus favorables, 35% des extractibles NDF. Les composés extractibles NDF, représentant la totalité de la matière non pariétale de la graine, représentent 50,7% de la graine de colza délipidée, soit environ 26% de la graine de colza brute.

Dans tous les cas, l'extraction par extrusion bi-vis n'est pas efficace pour extraire 100% des composés hydrosolubles ou des extractibles NDF. Cela est cohérent avec le fait que des protéines résiduelles sont dosées au sein de l'extrudât.

La figure 56 est focalisée sur la répartition en protéines dans les différentes fractions de l'émulsion 1. Une minorité des protéines est retenue dans l'émulsion 2. Cela nous laisse supposer que ces protéines sont résistantes à la centrifugation, donc que ce sont des protéines qui se situent à l'interface entre les phases aqueuses et huileuses composant l'émulsion 2. Ces protéines contribueraient donc à la stabilisation des émulsions.

Les profils 6 et 7 conduisent également à des phases aqueuses enrichies en protéines, ce qui peut être un atout pour des valorisations ou des extractions.

Dans tous les cas, les rendements en protéines suivent les rendements en matière sèche (figure 55 et 56).

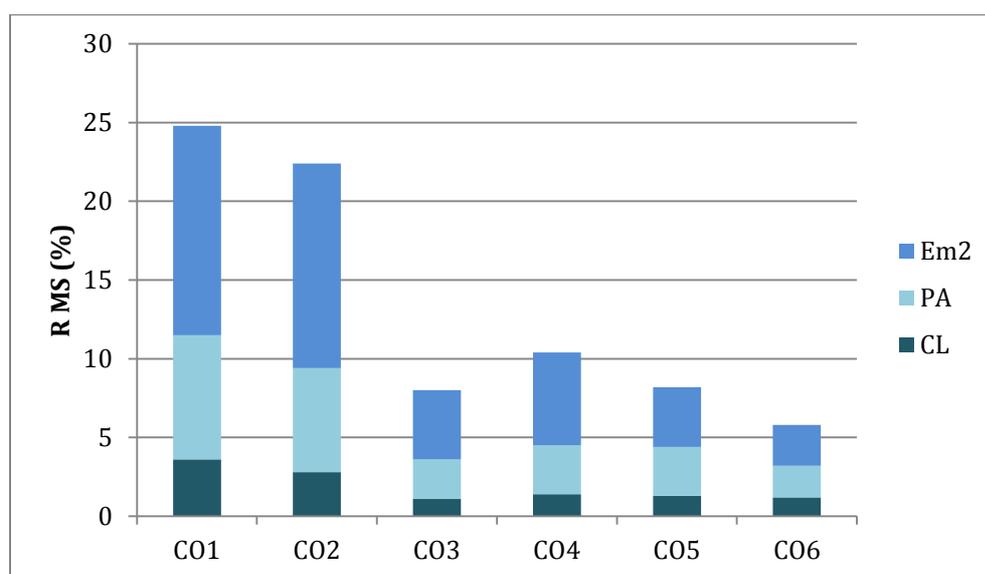


Figure 55 : Zoom sur la répartition massique en matière sèche dans les émulsions 1

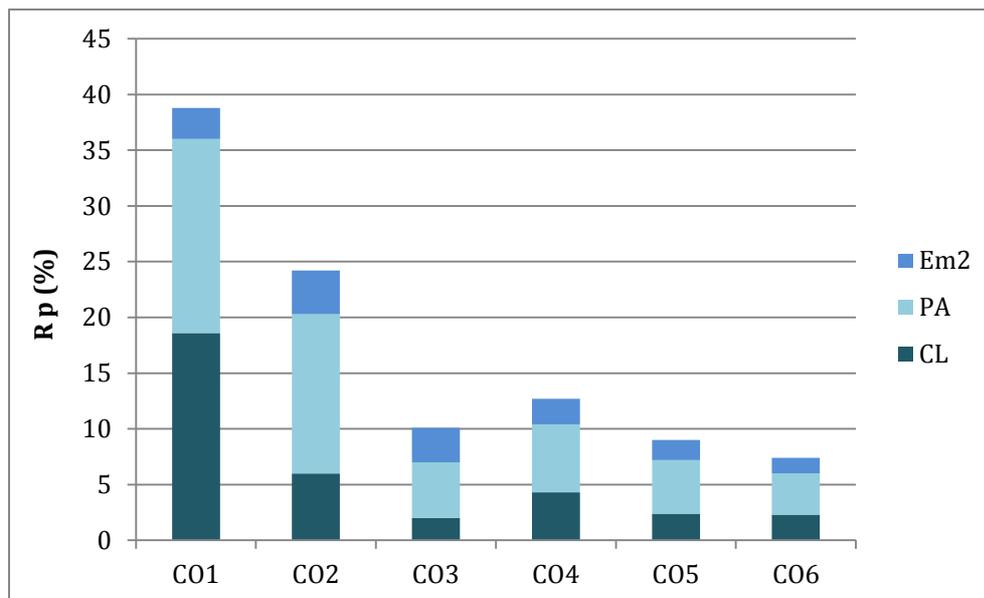


Figure 56 : Zoom sur le rendement en protéines dans les émulsions 1

Les teneurs en lipides n'ayant pas été mesurées sur la totalité des phases liquides, un histogramme « inverse » a été tracé, sur les répartitions en lipides résiduels au sein de l'extrudât et du pied (figure 57). Pour les essais C01 et C02, les teneurs résiduelles en lipides dans les extrudâts sont voisines, de l'ordre de 55 à 60%. Pour l'essai C01, nous pouvons considérer que plus de 30% des lipides présents dans la graine ont été extraits. Pour l'essai C02, cette teneur est supérieure à 20%. Pour tous les autres essais, correspondant aux profils 8 à 11, les rendements en lipides extraits dans l'émulsion 1 sont inférieurs à 20%.

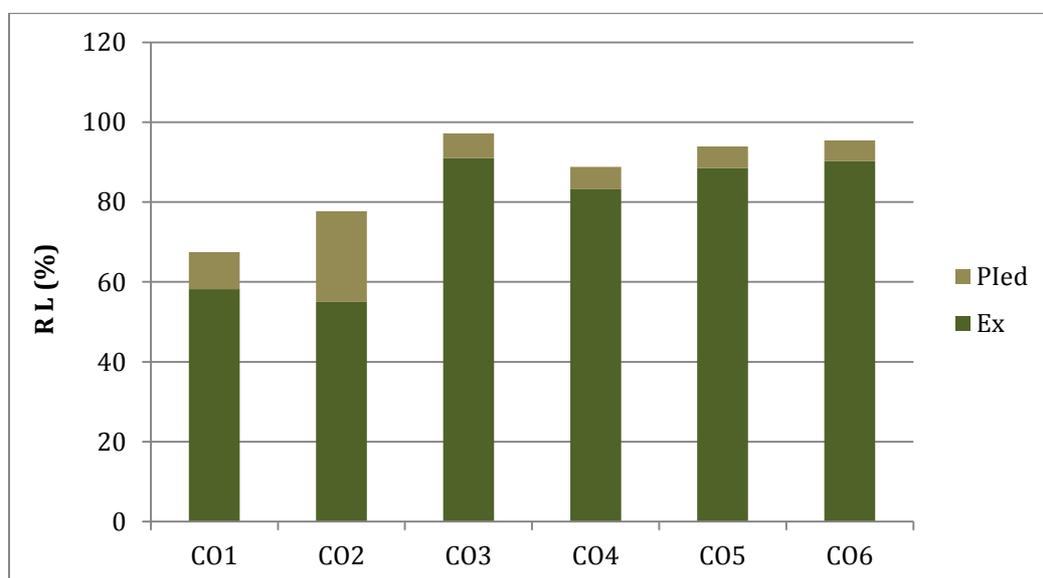


Figure 57 : Répartition en lipides dans les extrudâts et les pieds pour les différents essais

L'objectif de ces travaux de fractionnement aqueux en extrusion bi-vis était l'obtention de fractions émulsifiées. Plus particulièrement, les travaux de modification du profil de vis avaient pour but de comprendre les phénomènes d'émulsification *in situ*, liés à l'enrichissement du solvant extractant en protéines et en lipides.

Dans cette partie, les compositions des différentes fractions du procédé en familles principales de molécules sont présentées (tableau 50).

**Tableau 50 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des graines de colza : composition chimique des différentes phases**

		Essai n°	C01	C02	C03	C04	C05	C06
		Profil de vis	6	7	8	9	10	11
		Q <sub>Gsec</sub> (kg/h)*	3,6	4,3	4,4	4,3	4,4	4,4
		Débit d'eau (kg/h)	8	8	8	8	8	8
		Ratio L/S	2,2	1,9	1,8	1,9	1,8	1,8
		Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250
		Couple	0	0	0	0	0	0
Composition du filtrât		Q <sub>Ex</sub> (kg/h)	4,5	5,7	4,6	4,6	4,6	4,6
		M.S. (%)	47,9	43,3	76,8	74,4	78,8	80,0
		P (% MS)	19,6	18,6	18,0	18,4	18,6	18,7
		L (% MS)	40,4	35,0	41,7	39,2	40,5	40,0
		M.M. (% MS)	n.d.	3,8	3,6	3,6	3,6	3,3
		Q <sub>P</sub> (kg/h)	1,2	1,6	0,40	0,39	0,39	0,35
		% en masse du filtrât brut	15,1	23,8	5,3	5,1	5,0	4,6
		M.S. (%)	43,3	42,4	48,0	48,3	47,2	47,4
		P (% MS)	15,9	15,5	42,8	19,2	18,0	19,1
		L (% MS)	50,2	54,6	52,3	48,0	49,0	51,0
	M.M. (% MS)	n.d.	2,6	2,7	2,6	2,6	2,5	
	Composition de l'émulsion 1	Q <sub>Cl</sub> (kg/h)	0,39	0,39	0,15	0,20	0,18	0,15
		% en masse du filtrât brut	5,0	6,0	2,0	2,6	2,3	2,0
		M.S. (%)	34,9	29,0	29,2	27,1	29,4	32,9
		P (% MS)	41,9	40,5	32,9	59,9	36,4	35,2
		L (% MS)	27,7	40,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		M.M.(% MS)	n.d.	6,6	2,4	2,5	11,4	1,9
		Q <sub>PA</sub> (kg/h)	4,7	3,8	6,6	6,3	6,3	6,7
		% en masse du filtrât brut	61,3	57,7	87,1	81,9	82,5	86,5
		M.S. (%)	6,3	7,1	1,6	2,0	2,0	1,2
P (% MS)		48,0	40,5	37,3	36,6	29,1	35,5	
L (% MS)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		

M.M. (% MS)	n.d.	10,3	13,1	13,1	11,4	13,2
$Q_{Em2}$ (kg/h)	0,65	0,76	0,35	0,44	0,36	0,26
% en masse du filtrât brut	8,5	11,6	4,6	5,7	4,7	3,4
M.S. (%)	76,1	69,7	51,4	55,3	44,2	40,8
P (% MS)	4,7	5,5	6,9	7,2	8,9	10,2
L (% MS)	94,4	76,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
M.M. (% MS)	n.d.	1,0	0,37	0,39	0,46	0,50

M.S. est le taux de matière sèche de la phase, en %.

P (% M.S.) est le taux de protéines de la phase, en % M.S.

L (% M.S.) est la teneur en lipides de la phase, en % M.S.

M.M. (% M.S.) est la teneur en matière minérale, en % M.S.

La teneur en matière sèche et la composition des émulsions 1 en protéines sont présentées dans la figure 58.

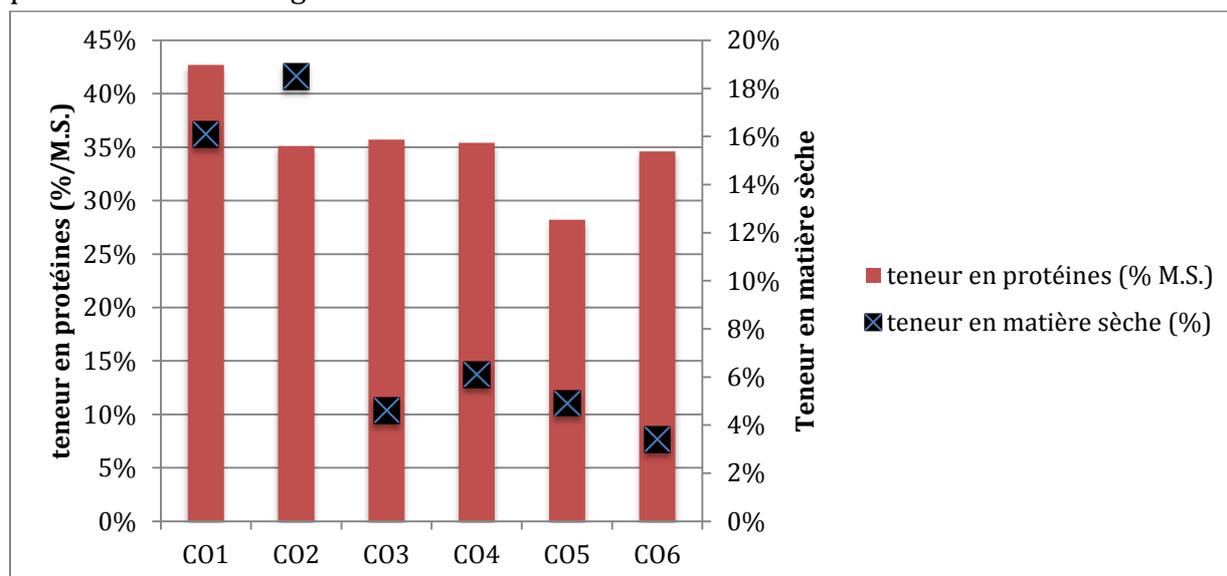


Figure 58 : Composition des émulsions 1 pour les essais effectués sur le colza

Les teneurs en matière sèche sont des témoins flagrants de l'enrichissement des émulsions 1 en composés bioactifs. Les essais CO1 et CO2 présentent des teneurs en matière sèche de l'ordre de 16% alors que cette dernière est comprise entre 4 et 6% pour les autres essais. Cela démontre un enrichissement en composés d'intérêt nettement plus important, lié à l'état de déstructuration supérieur de la matière végétale pour ces essais. Cependant, il est intéressant de noter que les teneurs en protéines par rapport à la matière sèche de l'émulsion 1 sont comprises dans une fourchette entre 28 et 42% quelque soit le profil de vis employé. Il n'y aurait ainsi que peu de variations sur la composition de la matière sèche de l'émulsion 1. Cela peut nous laisser penser qu'il n'existe pas ou peu de sélectivité quant à la nature des composés extraits, seule leur quantité totale varie en fonction du profil de vis.

Le pied est composé de particules solides imbibées d'émulsion 1. Les compositions des pieds sont équivalentes en termes de teneurs en matière sèche, lipides et protéines, quelque soit le profil employé (figure 59). Les teneurs en matière sèche sont comprises entre 40 et 50% et les teneurs en protéines sont inférieures à 20% par rapport à la matière sèche. Les teneurs en lipides sont de l'ordre de 40%/MS, et il est probable qu'un dosage des composés pariétaux par ADF-NDF aurait permis de boucler ces bilans matière, avec des teneurs en fibres totales de l'ordre de 30%.

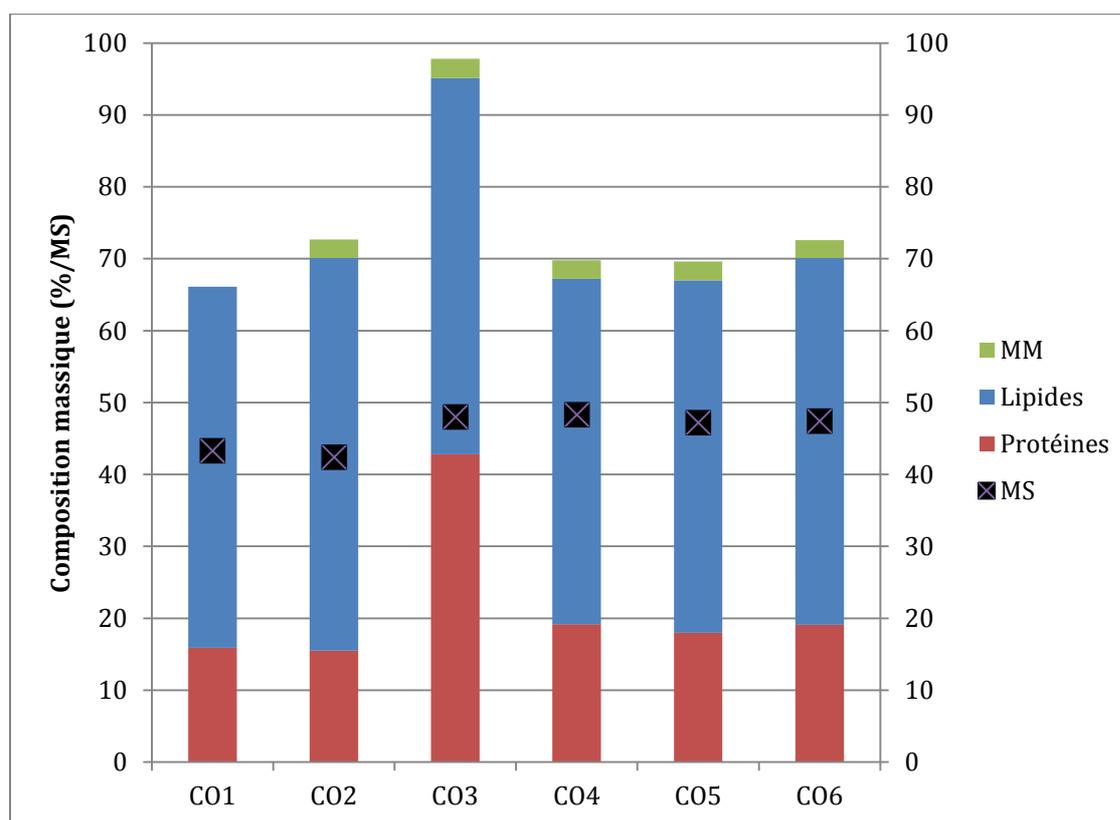


Figure 59 : Composition des pieds obtenus lors du fractionnement TMC des graines de colza sur différents profils de vis

Les extrudâts sont, de par leurs teneurs résiduelles en lipides et protéines, des témoins de l'efficacité d'enrichissement de la phase aqueuse. L'appauvrissement de l'extrudât est le reflet d'un enrichissement efficace de la phase liquide en composés bioactifs. Les essais effectués sur les profils 6 et 7 donnent les émulsions 1 les plus riches en matière sèche et en protéines (figure 58). Leurs extrudâts présentent les teneurs en matière sèche les plus basses parmi tous les profils testés (figure 60).

Les particules constituant l'extrudât sont de nature proche quel que soit le profil de vis, la différence majeure observée entre eux est leur teneur en matière sèche. Comme pour les pieds, les bilans massiques des extrudâts auraient certainement été bouclés en effectuant un dosage ADF-NDF de leurs composés pariétaux.

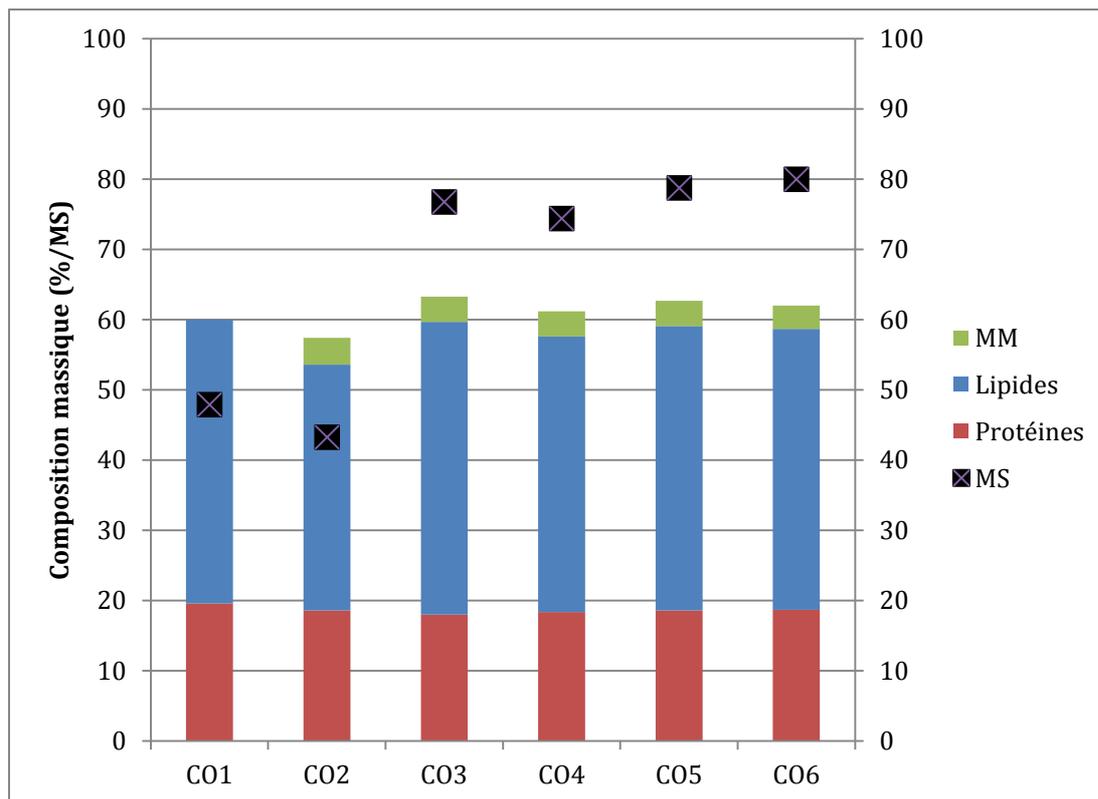


Figure 60 : Composition des extrudats obtenus lors du fractionnement TMC des graines de colza selon différents profils de vis

L'objectif des travaux de fractionnement aqueux des graines de colza est de mettre au point les conditions opératoires pour l'obtention d'émulsions par extraction aqueuse en extrudeur bi-vis. Par ce procédé, il s'avère que nous obtenons deux types d'émulsions. La première émulsion correspond au filtrât, débarrassé de son pied. La centrifugation de cette première émulsion donne lieu à une seconde émulsion, bien plus concentrée. Les conditions opératoires à respecter en extrusion bi-vis afin d'avoir les meilleurs rendements en émulsions sont donc :

- un ratio liquide/solide de 2, permettant d'obtenir des émulsions suffisamment concentrées en lipides et protéines
- un profil de vis présentant deux zones de malaxeurs et une zone de contrefilet, permettant une déstructuration efficace de la matière mais aussi une progression sans engorgement le long des vis
- une introduction d'eau en aval des zones de contrainte, qui permet une extraction aqueuse de la matière déstructurée, sans causer d'engorgement
- la présence d'un filtre en amont d'une zone de contrefilets. Ce dernier permet la formation d'un bouchon dynamique, favorisant l'écoulement du liquide via le filtre, et permettant ainsi une séparation liquide/solide in-situ.

### III.3.3 Faisabilité du pressage des graines de colza en extrudeur bi-vis

Des essais de pressage des graines de colza, c'est à dire l'extraction sans solvant de la phase lipidique, ont été effectués sur les profils 7 et 8. Le profil 7 n'a pas permis d'obtenir de résultat concluant, l'huile était entièrement réabsorbée par l'extrudât et ne s'écoulait pas par le filtre.

En revanche, le profil 8 a permis d'effectuer un pressage des graines de colza.

Le filtrât de sortie correspond à l'huile végétale, qui contient une certaine quantité de pied, séparé de l'huile dite clarifiée par centrifugation (tableau 51).

**Tableau 51 : Pressage des graines de colza en réacteur TMC : conditions employées et composition des fractions de sortie**

<b>Conditions opératoires</b>	Profil de vis	8
	$Q_{G\ sec}$ (kg/h)*	4
	$Q_{eau}$ (kg/h)	0
	Vitesse de vis (RPM)	250
	Couple moteur	0
<b>Extrudât</b>	$Q_{EX}$ (kg/h)	2,3
	M.S. (%)	89
	L (% M.S.)	16,8
	P (% M.S.)	29,5
<b>Filtrât brut</b>	$Q_F$ (kg/h)	1,7
	$T_P$ (%)	37
	L (%)	63
<b>Rendement en huile</b>	$R_G$	24,8
	$R_L$	61,9

M.S. est le taux de matière sèche de la phase, en %.

P (% M.S.) est le taux de protéines de la phase, en % M.S.

L (% M.S.) est la teneur en lipides de la phase, en % M.S.

$T_F$  est la teneur en huile du filtrât brut, en %.

$R_G$  est le rendement en huile extraite par rapport à la graine, en %.

$R_L$  est le rendement en huile extraite par rapport à l'huile contenue dans la graine, en %.

Le filtrât est constitué à 63% par des lipides, le reste étant représenté par le solide entraîné par la phase liquide par le filtre.

Le rendement d'extraction en huile, calculé par rapport à l'huile contenue dans la graine, est ainsi de l'ordre de 60%. Le rendement d'expression d'huile se situe dans la gamme des rendements mesurés par pressage en extrudeur bi-vis. Néanmoins, il est nettement inférieur à celui obtenu avec les graines de colza lors d'études précédentes. Les essais que nous avons réalisés correspondaient à des essais de faisabilité de fractionnement aqueux et non de pressage. Il est probable que l'optimisation du profil de vis permettrait d'améliorer le rendement d'expression d'huile et d'approcher les rendements consignés par la littérature (tableau 52).

**Tableau 52 : Exemples de rendement d'expression en lipides lors du pressage de différentes graines en réacteur TMC**

Graine	Rendement d'expression d'huile (%)	Référence
Colza	85	(Shahidi, 1990)
Coriandre	47-51	(Sriti et al., 2011)
Jatropha	71	(Chapuis et al., 2014)
Neem	63	(Faye, 2010)
Tournesol	75	(Evon, 2008)

### III.3.4 Reproductibilité du procédé de fractionnement aqueux des graines de colza

Des productions d'émulsions à partir de graines de colza, par extrusion bi-vis ont été effectuées plusieurs fois au cours de ce travail de thèse dans un but de caractérisations analytiques complémentaires des fractions obtenues. Ces productions ont permis de conclure quant à la stabilité ainsi qu'à la reproductibilité du procédé. Elles ont été effectuées dans des conditions équivalentes de débit d'entrée solide, de profil, de vitesse de vis, de température et de ratio liquide/solide (tableau 53).

**Tableau 53 : Débits de filtrâts et d'extrudâts pour les différentes productions**

Production	Débit de filtrât	Débit d'extrudât	Teneur en matière sèche de l'extrudât (%)
Production 1	8,3	4,0	53,5
Production 2	7,7	4,5	47,9
Production 3	6,5	5,7	43,4
Production 4	7,5	4,6	49,0
Coefficient de variation (%)	8,6	13,2	7,4

A l'exception de la production 3, les débits d'extrudât et de filtrât sont stables, avec des ratios de séparation liquide/solide compris entre 1,6 et 2,1.

Les émulsions obtenues lors des productions 3 et 4 ont été analysées par RMN à bas champ, DSC, et en microscopie optique. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre IV.

### III.3.5 Conclusion

La graine de colza a été employée comme graine modèle. Les différents essais mis en place ont permis de développer un procédé de fractionnement continu efficace, permettant de produire des émulsions et des extrudâts appauvris en lipides et en protéines.

## III.4 Extension du procédé de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis aux graines de chanvre, cynara et pastel

### III.4.1 Etude de l'extension des conditions opératoires de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis en fonction de la matière première

Trois autres graines, différant du colza par leur composition physico-chimique ont été étudiées par le même procédé de fractionnement. L'objectif était d'évaluer la faisabilité de fractionnement aqueux de ces graines et donc le potentiel de transfert de cette technologie à d'autres substrats oléo-protéagineux. Les graines retenues ont été les graines de chanvre (chènevis), cardon et pastel (pourvues de leurs siliques), dont les compositions chimiques sont rappelées dans le tableau 54.

Tableau 54 : composition des graines de chanvre, cardon et pastel

	Chanvre	Cardon	Pastel
Teneur en matière sèche (%)	93,8	92,0	93,4
Teneur en fibres (% M.S.)	29,9	38,1	58,0
Teneur en protéines (% M.S.)	26,0	20,9	22,0
Teneur en lipides (% M.S.)	36,6	24,2	11,8

Les profils, vitesse de vis et température ont pu être fixés à l'identique pour les quatre graines. En revanche, la présence des siliques des graines de pastel a été un obstacle à l'extraction de ces dernières. Ainsi, le ratio liquide/solide de 2 n'a pas pu être appliqué aux graines de pastel, les siliques absorbant une grande partie de l'eau introduite, la séparation liquide/solide n'avait pas lieu. Le ratio liquide/solide a été fixé à 4, ce qui a permis de valider la faisabilité du fractionnement pour cette graine avec cette légère adaptatio. De plus, le fractionnement aqueux du pastel a été effectué uniquement sur le profil de vis 6 tandis que les autres graines ont été étudiées sur les profils 6 et 7.

Ces essais de fractionnement ont permis de réaliser une comparaison :

- intra-matière, en comparant le comportement de chaque graine face aux deux profils
- inter-matière, en comparant le comportement de chacune des graines, dans des conditions expérimentales équivalentes.

Pour les graines de pastel, la phase de pied correspond en réalité au mélange « pied + culot lourd » des autres graines. La présence des siliques a rendu impossible la filtration du filtrât. Ce dernier a été directement centrifugé.

Concernant les phases liquides du procédé, une fraction correspondant à l'émulsion 2 est obtenue quelque soit la graine. Cependant, aussi bien pour le chanvre et le cardon que pour le pastel, la quantité d'émulsion recueillie à l'échelle des productions effectuées n'était pas analytiquement exploitable. Dans le cadre du fractionnement analytique, les phases aqueuses et émulsions 2 ont été caractérisées comme un seul produit. Une

industrialisation du procédé, notamment des productions sur des durées plus longues, permettraient d'accumuler des quantités d'émulsion 2 suffisantes pour des caractérisations et des exploitations plus poussés.

La figure 61 ci-après récapitule les différents post-traitements appliqués aux graines :

- le filtrât de pastel n'a pas pu être filtré, il a directement été centrifugé. Cela a donné lieu à deux phases : un mélange pied + culot lourd et une phase liquide : phase aqueuse + émulsion 2
- les filtrâts de chanvre, colza et cardon ont été filtrés et centrifugés. Le colza a donné lieu à trois phases distinctes : culot lourd, phase aqueuse et émulsion 2, tandis que pour le chanvre et le cardon l'émulsion 2 était présente en très faible quantité et son aspect était peu homogène, ce qui a empêché une séparation efficace entre la phase aqueuse et cette dernière émulsion.

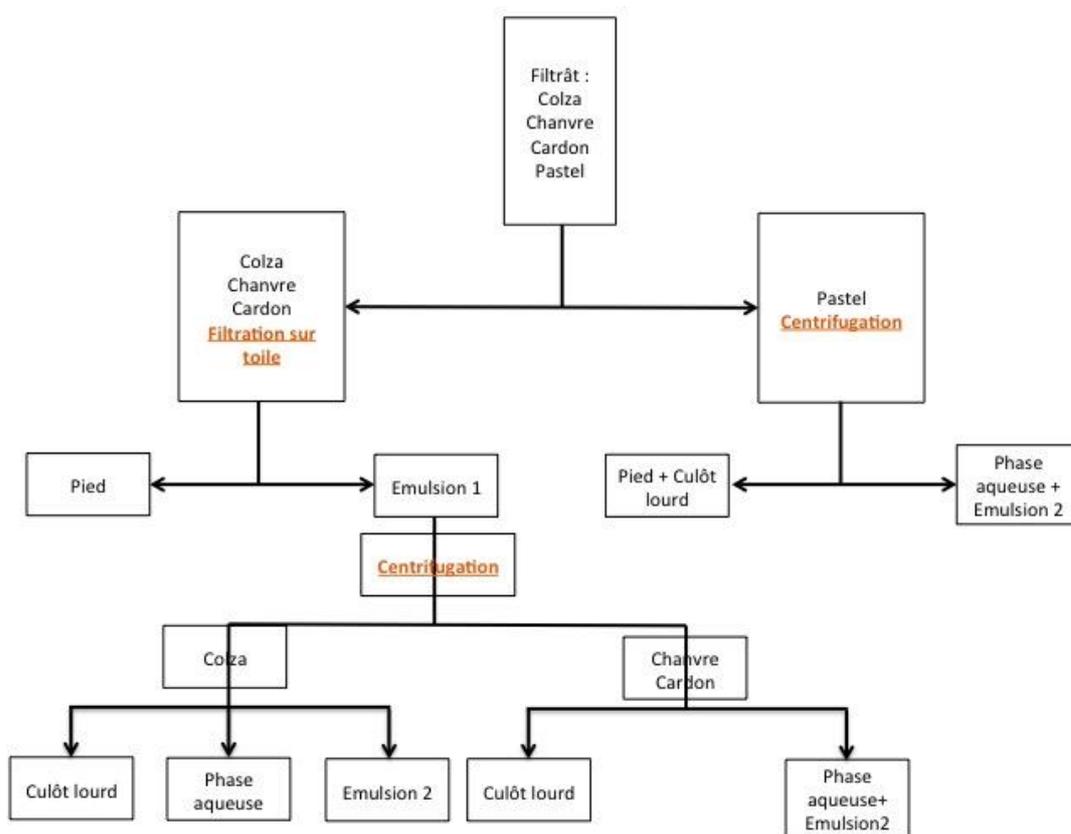


Figure 61 : Processus de post-traitements analytiques appliqués aux graines

### III.4.2 Comparaison du procédé de fractionnement aqueux pour quatre graines oléoprotéagineuses

Le tableau 55 expose les différentes données acquises lors du fractionnement des 3 nouvelles graines traitées tout en rappelant les principaux résultats issus des essais, réalisés dans des conditions similaires sur le colza (CO1 et CO2). Les graines de colza, chanvre et cardon sont comparées directement puisque traitées dans des conditions opératoires strictement identiques. La graine de pastel est discutée de façon indépendante dans la mesure où le ratio liquide/solide appliqué différait.

**Tableau 55 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des graines de chanvre, cardon et pastel : conditions opératoires, répartitions massiques des différentes phases et rendements d'extraction en lipides et en protéines**

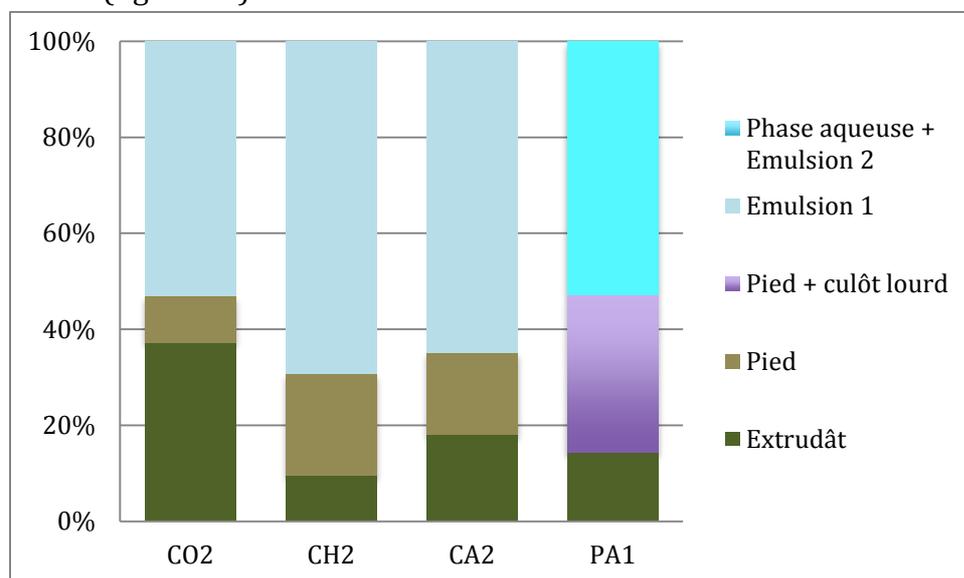
	Colza	Colza	Chanvre	Chanvre	Cardon	Cardon	Pastel
Essai n°	CO1	CO2	CH1	CH2	CA1	CA2	PA1
Profil de vis	6	7	6	7	6	7	6
Débit de graines sec (kg/h)*	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	1,8
Débit d'eau (kg/h)	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Ratio L/S	2	2	2	2	2	2	4,4
Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250	250
Couple	0	0	0	0	0	0	0
<b>Q<sub>Ex</sub> (kg/h)</b>	4,5	5,7	1,19	1,15	2,0	2,2	1,4
% M.S.	47,9	43,3	70,5	70,6	67,2	67,0	57,3
R <sub>M.S.</sub> (%)	56,7	61,4	22,5	21,8	36,3	39,9	42,8
R <sub>P</sub> (%)	51,5	61,1	13,4	12,4	34,4	26,2	21,5
R <sub>L</sub> (%)	58,2	55,0	6,3	5,8	16,7	n.d.	3,9
<b>Q<sub>Fbrut</sub> (kg/h)</b>	5,7	6,6	11,3	10,7	8,1	9,9	8,6
<b>Q<sub>P</sub> (kg/h)</b>	1,2	1,6	2,04	2,54	2,5	2,1	3,1
% M.S.	43,3	42,4	54,0	48,8	24,9	20,6	35,5
R <sub>M.S.</sub> (%)	13,4	16,2	29,4	33,1	31,5	25,6	43,6
R <sub>P</sub> (%)	9,75	13,4	42,1	45,2	n.d.	n.d.	67,1
R <sub>L</sub> (%)	9,29	22,7	30,7		n.d.	n.d.	56,4
<b>Q<sub>Cl</sub> (kg/h)</b>	0,39	0,39	1,54	1,47	0,6	1,8	
% M.S.	34,9	29,0	42,8	44,5	6,0	17,9	
R <sub>M.S.</sub> (%)	3,6	2,8	17,6	17,5	6,4	18,3	
R <sub>P</sub> (%)	18,6	6,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
R <sub>L</sub> (%)	1,9	2,3	n.d.		n.d.	n.d.	
<b>Q<sub>PA+Em2</sub> (en kg/h)</b>	5,4	4,6	7,7	6,7	5,0	6,0	5,1
% M.S.	14,7	17,5	10,7	7,1	50,1	59,7	24,7
R <sub>M.S.</sub> (%)	26,3	19,6	21,9	12,9	6,1	11,2	9,2
R <sub>P</sub> (%)	20,2	19,5	13,5	12,7	n.d.	7,6	9,7
R <sub>L</sub> (%)	30,6	20,0	n.d.	26,2	n.d.	n.d.	39,8

*R<sub>M.S.</sub> est le rendement d'extraction en matière sèche, R<sub>P</sub> est le rendement d'extraction en protéines, R<sub>L</sub> est le rendement d'extraction en lipides*

*Les phases Pied et CL n'ont pas pu être séparées pour le pastel*

*Pour le colza, la composition de la phase « PA+Em2 » a été calculée suite à la caractérisation indépendante des deux phases*

Quel que soit le profil de vis employé, il s'avère que les répartitions entre les différentes phases ainsi que leurs compositions respectives sont proches pour les 2 profils. Le pas de vis des contrefilets n'a pas démontré d'influence notable sur la séparation liquide/solide et sur la répartition des différentes phases. De ce fait, les comparaisons inter-matières ont été effectuées sur les essais réalisés avec le profil 7 pour le colza, le chanvre et le cardon. La comparaison inter-matières a permis de déceler des comportements très différents pour les quatre graines lors du fractionnement TMC que ce soit en termes de séparation liquide/solide ou tout simplement face au procédé de fractionnement aqueux en lui-même (figure 62).



**Figure 62 : Répartitions massiques brutes obtenues lors du fractionnement aqueux en réacteur TMC du colza, du chanvre, du cardon et du pastel**

A ratio liquide/solide équivalent, le chanvre présente la teneur en extrudât la plus faible ce qui suggère que cette graine conduit à la séparation liquide/solide la plus efficace. Pour le pastel, l'amélioration de la séparation liquide/solide est probablement induite par l'augmentation du ratio liquide/solide.

Concernant les teneurs en pied, elles sont supérieures pour le chanvre et le cardon. Ceci confirme l'efficacité de déstructuration et de séparation solide/liquide pour ces deux types de graines. Ces essais ont conduit aux rendements massiques les plus élevés en émulsion 1.

Les répartitions en matière sèche suivent les répartitions en matières brutes (figure 63). Pour le colza, l'extrudât représente 50% de la matière sèche des sorties, soit le double de ce qui est observé dans le cas du chanvre. Le cardon présente un comportement intermédiaire entre ces deux dernières graines. Les teneurs en pied sont supérieures pour le chanvre et le cardon.

Quelle que soit la graine, le rendement en matière sèche dans l'émulsion 1 est comprise entre 30 et 40% /MS initiale. Suite à la centrifugation de l'émulsion, la répartition en matière sèche diffère en fonction de la graine traitée. D'une part, le culot lourd est constitué par une proportion de matière sèche nettement supérieure pour le chanvre et le cardon que pour le colza. Cela peut être expliqué par le fait que le chanvre et le cardon sont plus riches en composés de hauts poids moléculaires, tels que des protéines ou des pectines. Dans la répartition de la matière sèche entre la phase aqueuse et l'émulsion 2, celle-ci est majoritairement présente au sein de l'émulsion 2. Ainsi, parmi les trois graines, le colza est celle ayant la plus grande proportion d'émulsion 2 au sein de l'émulsion 1. Le rendement en émulsion 2 est très inférieur à ceux obtenus lors du fractionnement aqueux du colza, quelle que soit la graine utilisée. Cela est lié au fait que le profil a été optimisé avec les graines de colza pour obtenir un extrudât déstructuré et un filtrât sous forme émulsifiée. L'application directe des paramètres adéquats au fractionnement aqueux de la graine de colza a permis de valider la faisabilité de fractionnement aqueux des autres types de graines. Par contre, ces paramètres auraient pu être étudiés afin d'optimiser les rendements pour chaque graine. Ceci démontre bien que le fractionnement en extrudeur bi-vis est « matière première dépendant » et que chaque nouveau substrat, même si il fait partie d'une même famille de matières premières, nécessiterait une étude d'optimisation spécifique.

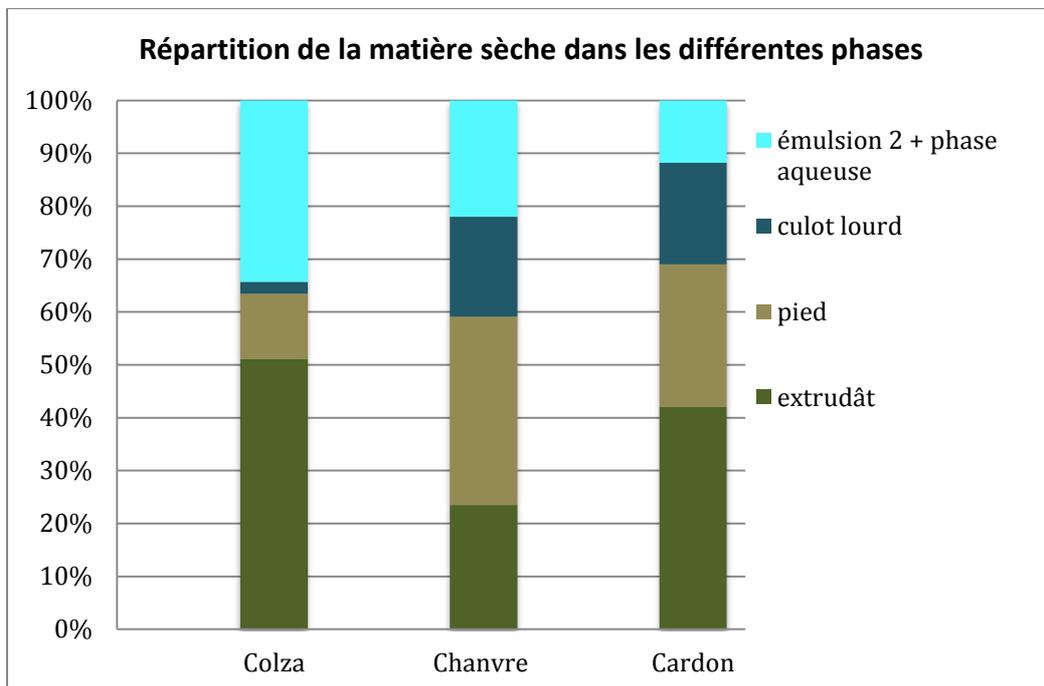


Figure 63 : Répartition de la matière sèche pour les différentes phases obtenues lors du fractionnement aqueux TMC du colza, du chanvre et du cardon

Un zoom sur la répartition de la matière sèche dans l'émulsion 1 a été effectué (figure 64). Cet histogramme nous montre clairement que les filtrâts de chanvre et de cardon ont été plus efficacement enrichis en composés d'intérêt que le filtrât de colza. Toutefois, comme

discuté précédemment, les filtrâts de chanvre et de cardon présentent des teneurs élevées en culot lourd. Le colza présente la teneur la plus élevée en phase aqueuse et émulsion 2.

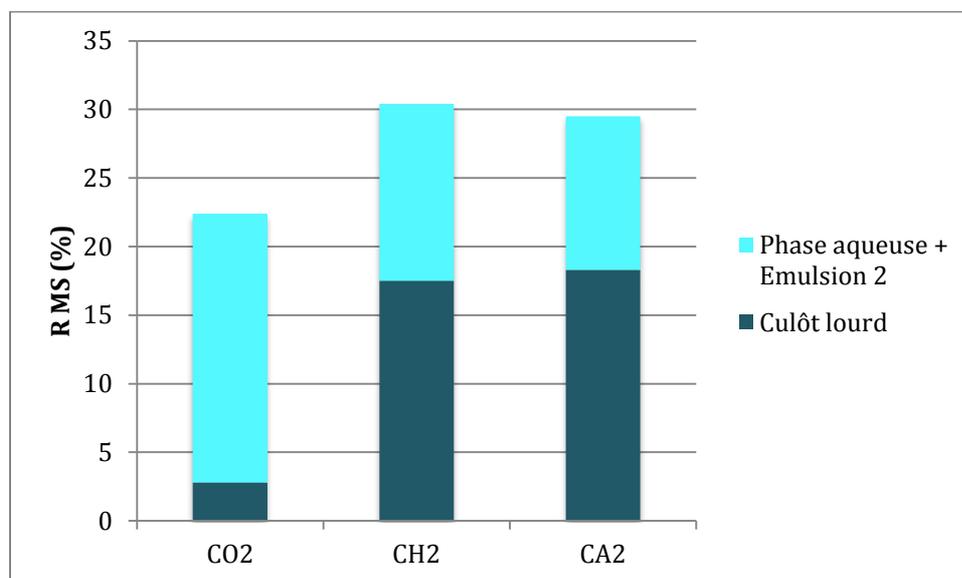


Figure 64 : Zoom sur les répartitions en matière sèche dans l'émulsion 1 obtenue lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et ducardon

Les caractéristiques chimiques des différentes fractions issues du procédé de fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis sont exposées dans le tableau 56. Néanmoins, suite à des problèmes rencontrés pour la conservation de certains extraits, les teneurs en protéines et en lipides des différentes phases n'ont pu être mesurées sur l'ensemble des fractions produites.

Tableau 56 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des graines de colza, chanvre, cynara et pastel : composition chimique des différentes phases

Essai n°	CO1	CO2	CH1	CH2	CA1	CA2	PA
Profil de vis	6	7	6	7	6	7	7
Q <sub>Gsec</sub> (kg/h)*	3,6	4,3	3,4	3,4	3,5	3,5	1,8
Q <sub>Eau</sub> (kg/h)	8	8	8,0	8,0	8,0	8,0	8,0
Ratio L/S	2,2	1,9	2,2	2,4	2,3	2,1	4
Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250	250
Couple	0	0	0	0	0	0	25
Q <sub>Ex</sub> (kg/h)	4,5	5,7	1,2	1,2	2,0	2,2	1,4
M.S. (%)	47,9	43,3	70,5	70,6	67,2	67,0	57,3
P (% MS)	19,6	18,6	13,6	13,0	19,6	13,6	8,0
L (% MS)	40,4	35,0	9,1	8,6	10,7	8,0	5,2

Composition du filtrât		<b>Q<sub>P</sub></b> (kg/h)	1,2	1,6	2,0	2,5	2,5	2,1	3,4
		% en masse du filtrât brut	15,1	23,8	18,6	22,8	24,9	20,6	36,5
		M.S. (%)	43,3	42,4	54,0	48,8	46,8	45,7	25,6
		P (% MS)	15,9	15,5	32,8	31,3	n.d.	28,0	24,4
		L (% MS)	50,2	54,6	33,8	34,2	n.d.	n.d.	15,2
	Composition de l'émulsion 1	<b>Q<sub>CL</sub></b> (kg/h)	0,4	0,4	1,5	1,5	0,6	1,8	
		% en masse du filtrât brut	5,0	6,0	14,1	13,3	6,0	17,9	
		M.S. (%)	34,9	29,0	42,8	44,5	39,5	37,5	
		P (% MS)	41,9	40,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		L (% MS)	27,7	40,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		<b>Q<sub>PA+Em2</sub></b> (kg/h)	5,35	4,56	7,7	6,8	5,0	6,0	5,1
		% en masse du filtrât brut	69,8	69,3	69,9	60,7	50,1	59,7	59,1
		M.S. (%)	16,5	17,6	10,7	7,1	4,5	6,8	3,3
		P (% MS)	42,7	34,6	14,1	6,9	12,8	14,1	16,7
		L (% MS)	11,5	12,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

M.S. est le taux de matière sèche de la phase, en %.

P (% M.S.) est le taux de protéines de la phase, en % M.S.

L (% M.S.) est la teneur en lipides de la phase, en % M.S.

M.M. (% M.S.) est la teneur en matière minérale, en % M.S.

Pour les paramètres utilisés lors de ces essais, c'est la graine de colza qui nous donne les résultats les plus intéressants, en termes de rendements et d'aspect des émulsions avec une émulsion 1 riche en matière sèche et un mélange phase aqueuse + émulsion2 de teneur en protéines de l'ordre de 35% M.S., bien supérieure aux teneurs en protéines de respectivement 7 et 14% M.S. pour le chanvre et le cardon. L'extraction aqueuse des composés bioactifs est donc la plus efficace pour le colza. Pour les autres graines, c'est l'extraction des lipides qui est la plus efficace.

L'extraction des protéines est liée à leur affinité pour le solvant d'extraction tandis que l'extraction des lipides est liée à deux phénomènes mécaniques successifs : un pressage des graines lié aux zones de contraintes qui exprime l'huile, qui est ensuite co-extraite par l'eau sous forme d'émulsion grâce à l'agitation mécanique due au mouvement des vis.

Le tableau 57 expose les ratios protéines/lipides initiaux pour les différentes graines testées. Le pastel présente un ratio supérieur à 1, c'est la seule graine pour laquelle la teneur en protéines est supérieure à la teneur en lipides. Le chanvre et le cardon ont des

teneurs en lipides légèrement supérieures celles en protéines, mais ces deux valeurs sont relativement proches. Dans le cas du colza, le ratio est proche de 0,5 : la graine contient deux fois plus de lipides que de protéines.

**Tableau 57 : Ratios protéines/lipides initiaux pour les différentes graines employées**

Graines	Colza	Chanvre	Cardon	Pastel
Ratio Protéines/lipides	0,48 19/39	0,72 26/36	0,86 21/24	1,87 22/12
Equilibre déplacé vers	Lipides	Lipides	Lipides	Protéines

Afin d'aller plus loin dans l'interprétation des résultats obtenus suite au fractionnement aqueux en réacteur TMC, ces mêmes ratios protéines/lipides ont été calculées pour les phases solides : extrudâts et pieds (tableau 58).

**Tableau 58 : Ratios protéines/lipides pour les extrudâts et les pieds**

Graine	Colza	Chanvre	Cardon	Pastel
Ratio protéines/lipides dans l'extrudât	0,49 20/40	1,50 14/9	1,83 20/11	1,53 8/5
Equilibre déplacé vers	Lipides	Protéines	Protéines	Protéines
Ratio protéines/lipides dans le pied	0,31 16/50	0,97 33/34	Non déterminé	1,6 24/15
Equilibre déplacé vers	Lipides	Equilibre atteint		Protéines

Le colza est la seule graine pour laquelle l'équilibre reste le même entre les graines et les phases solides de sortie d'extrusion. Il n'existe donc pas d'extraction préférentielle. Pour le chanvre et le cardon, l'équilibre est inversé par rapport à la composition initiale des

graines, ce qui suggère une extraction préférentielle des lipides par rapport aux protéines. Plusieurs explications sont possibles à cela :

- les graines de chanvre et de cardon sont plus riches en fibres que les graines de colza. Les protéines pourraient être liées à la structure fibreuse, et ne pas être extraites par l'eau.
- la nature même des protéines peut également influencer ce comportement. Pour rappel, la classification d'Osborne des protéines issues des graines étudiées a été évaluée dans le chapitre II.

La graine de colza est la seule dont la fraction protéique est majoritairement constituée d'albumines, protéines hydrosolubles. Cela explique donc que c'est également la seule graine pour laquelle les protéines sont majoritairement extraites par rapport aux lipides. Cette différence d'extractibilité peut aussi être liée à une structure intrinsèque de la graine pour laquelle les lipides sont plus accessibles lors de leur fractionnement aqueux. Ainsi, le colza présente une meilleure extraction des protéines supérieure à celle des lipides, alors que l'inverse se produit dans le cas des autres graines. Ces observations peuvent être reliées aux stabilités des émulsions 1. Pour le chanvre, le cardon et le pastel moins de protéines sont extraites que pour le colza, ce qui peut expliquer que leurs émulsions soient moins stables, d'autant plus que ces protéines sont de natures différentes. Le colza est graine la plus riche en albumines, protéines réputées émulsifiantes, ce qui peut également expliquer la meilleure stabilité des émulsions issues de ce procédé.

Les émulsions 2 correspondent à une version concentrée des émulsions 1. Dans le cas où l'émulsion initiale est riche en protéines, et particulièrement en albumines, ces dernières restent à l'interface entre l'huile et l'eau au moment de la centrifugation, ce qui donne lieu à un rendement élevé en émulsion 2, et à des émulsions 2 stables et de nature homogène. C'est ce qui se produit dans le cas du colza. Pour les autres graines, la quantité de protéines, et plus particulièrement d'albumines présentes, est inférieure. De ce fait, les émulsions 2 obtenues à l'issue de la centrifugation sont de qualités moindres, peu homogènes, et elles sont présentes en quantités plus faibles que dans le cas du colza.

### **III.4.3 Comparaison des procédés de fractionnement aqueux en réacteur batch agité et en extrudeur bi-vis**

Le procédé de fractionnement aqueux en batch, décrit au chapitre II, a été appliqué aux quatre graines. Rappelons ses principales caractéristiques :  $L/S=4,25$ , durée = 5 minutes, Vitesse d'agitation = 20000 RPM.

La comparaison des procédés continu et discontinu n'a pas été envisagée sur le pastel puisque les graines employées en réacteur batch étaient dépourvues de leurs siliques.

Le procédé batch donne lieu à une unique fraction solide, dénommée « pied » alors que l'extrusion bi-vis est caractérisée par la production de 2 fractions solides : « pied » + « extrudat ». Pour les fractions liquides, l'émulsion 1 est présente pour les 2 procédés. Pour le procédé batch, elle peut être fractionnée en 3 sous-phases pour les graines

étudiées : culot lourd, émulsion 2 et phase aqueuse. En extrusion, ces 3 mêmes phases sont obtenues. Néanmoins, pour le cardon et le chanvre, les quantités d'émulsion 2 produites sont négligeables et elles sont donc assimilées à la phase aqueuse. Le colza est donc le seul pour lequel une phase émulsion 2 a été produite. Les résultats de rendements en matière sèche pour chaque fraction en fonction du procédé impliqué sont exposés dans le tableau.

**Tableau 59 : Conditions opératoires et répartition massique de la matière sèche entre les fractions obtenues lors des fractionnements aqueux en batch et en extrudeur bi-vis**

Conditions opératoires	L/S	Batch			Extrusion		
		4,25			2		
		5 min			1 min		
Etat des graines	Broyées			entières			
		CO	CH	CA	CO	CH	CA
Extrudat		28,9	20,9	28,0	61,4	21,8	39,9
Pied					16,2	48,8	25,6
Emulsion 1		71,1	79,1	72,0	22,4	29,4	34,5
Culot lourd		3,7	12,5	15,3	2,8	17,5	18,3
Emulsion 2		21,9	7,0	6,0	13,0	12,9	11,2
Phase aqueuse		45,4	59,6	50,6	6,6		

Dans la mesure où les conditions opératoires appliquées pour les deux procédés, dont le ratio liquide/solide, sont très différentes, la comparaison des répartitions en matière brute n'est pas pertinente.

Les répartitions en matière sèche (tableau 59) permettent de conclure que :

- Quelle que soit la graine, le procédé discontinu conduit à des rendements d'extraction en matière sèche dans l'émulsion 1 de plus du double de ceux mesurés lors du fractionnement bi-vis. Ceci est cohérent avec les conditions opératoires mise en œuvre. Même si le fractionnement thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis agit positivement sur l'extraction en réduisant les limitations diffusionnelles, les faibles temps de séjour (inférieurs à la minute) représentent une limitation cinétique. Sous un autre angle, il est possible de dire qu'une minute d'extraction avec un faible ratio L/S, sous contrainte mécanique et thermique permet d'atteindre, selon la graine choisie, 30 à 50% du rendement d'extraction obtenu en 5 minutes pour un ratio L/S de 4,25 .
- Pour les 2 procédés, le chanvre se distingue par un rendement en émulsion 1 supérieur.
- Dans le cas du colza, la répartition en matière sèche entre l'émulsion 2 et la phase aqueuse est inversée en fonction du procédé. Dans le cas de l'extraction batch, la répartition est de 22/45, alors qu'elle est de 13/7 pour l'extrusion. Le procédé d'extrusion est donc favorable à la formation de l'émulsion 2.

- Concernant les rendements en émulsion 2, seul le colza permet une réelle comparaison des procédés. Le rendement en émulsion 2 en extrusion bi-vis représente 60% de celui obtenu en réacteur batch.
- Dans le cas du cardon et du chanvre, les rendements en émulsion 2 sont faibles en batch et quasi inexistant par fractionnement bi-vis.

Le fractionnement en extrudeur bi-vis du colza est intéressant pour la production d'une émulsion 1 mais surtout d'une émulsion 2 dans des conditions continues présentant un gain de temps et une économie de solvant. Les émulsions obtenues sont très concentrées et présentent une grande stabilité au cours du temps. Cette dernière affirmation sera justifiée dans le chapitre suivant. Pour le chanvre et le cardon, les rendements en émulsion 1 par extrusion bi-vis sont très compétitifs grâce à des conditions de séparation solide/liquide plus efficaces pour ce type de graine. Par contre, ce procédé ne permet la production d'émulsion 2 que pour des temps d'extrusion plus longs que ceux utilisés avec le colza.

Afin de croiser les avantages constatés pour chaque type de graine, la co-extrusion de graines a donc été envisagée.

### **III.5 Fractionnement simultané de graines oléo-protéagineuses : étude de la co-extrusion**

#### **III.5.1 Objectifs et choix des mélanges de graines**

D'après l'entreprise Clextral, équipementier pour les extrudeurs bi-vis, la co-extrusion est un procédé au cours duquel deux matières différentes sont extrudées afin de former un seul produit. Ce procédé est notamment utilisé pour obtenir un produit composé d'une enveloppe croustillante (de céréales par exemple), remplie d'un fourrage sucré ou salé. Ce procédé est également utilisé pour l'encapsulation d'huile végétale couplée à un composé anti-oxydant dans une matrice d'alginate (Wang et al., 2013).

Dans le cadre de l'extrusion de matières végétales, Philippe Evon a couplé l'extrusion de graines de tournesol à l'ajout de fibres végétales afin d'en améliorer le pressage (Evon et al., 2007). La faisabilité d'extraction thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis a été constatée dans nos travaux pour les graines étudiées : colza, chanvre, cardon et pastel. Et contrairement aux essais sur la graine de tournesol (Evon, 2008), il n'a pas été nécessaire d'ajouter de fibres pour permettre la formation du bouchon dynamique, les graines se suffisant à elles-mêmes. Nos conclusions sur ces travaux rejoignent ainsi celles des travaux sur la graine de Neem (Faye, 2010). Cependant, il a été décidé de mettre en place des expériences de co-extrusions de différentes graines afin d'étudier l'influence de la co-extraction de deux graines sur les extraits obtenus en termes de rendement et de composition des différentes phases, et plus particulièrement des teneurs en lipides et en protéines. L'autre objectif était d'évaluer s'il existe une sélectivité d'extraction entre les deux graines choisies.

D'un point de vue applicatif, l'intérêt de ces co-extrusions est d'obtenir des extraits enrichis en protéines et en lipides de nature différentes propres aux graines choisies et présentant une activité biologique, antioxydante en particulier. Pour cela, l'idée était d'extruder des graines sans activité antioxydante telles que le chanvre avec les graines de cardon, très antioxydantes.

Les couples de graines suivantes ont été sélectionnés :

- chanvre/cardon (CH/CA)
- colza/cardon (CO/CA)
- chanvre/colza (CH/CO)

Des mélanges 50/50 en masse des deux types de graines ont été réalisés en amont de leur introduction dans le doseur. Aucune ségrégation n'a été observée dans les mélanges.

Le profil employé est le profil 7 ayant donné les meilleurs résultats sur les graines de chanvre et de colza seules.

La consigne du doseur est déterminée par la moyenne des consignes des deux graines pour obtenir un débit de 4 kg/h.

Les post-traitements appliqués aux filtrats sont identiques à ceux des extrusions des graines de colza (figure 61).

### III.5.2 Influence de la co-extrusion sur le procédé de fractionnement et sur la composition des fractions obtenues

Dans le tableau 60 sont présentés les résultats de chaque co-extrusion en termes de rendements d'extractions et de concentrations résiduelles. A titre indicatif, les résultats obtenus lors du fractionnement aqueux du colza, du chanvre, ou du cardon sont rappelés.

**Tableau 60 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des mélanges de graines : répartitions massiques des différentes phases et rendements d'extraction en lipides et en protéines**

	CO	CH2	CA2	CH/CO	CO/CA	CH/CA
Profil de vis	7	7	7	7	7	7
$Q_{G\ sec}$ (kg/h)*	4,3	4	4	3,9	3,7	3,7
$Q_{Eau}$ (kg/h)	8,0	8	8	8	8	8
Ratio L/S	1,8	2	2	2,1	2,2	2,2
Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250
Couple	0	0	0	0	0	0
$Q_{Ex}$ (kg/h)	5,7	1,15	2,2	2,2	2,2	1,7
% M.S.	43,3	70,6	67,0	72,4	59,3	67,4
R M.S. (%)	61,4	21,8	39,9	36,8	35,5	30,4

R <sub>P</sub> (% MS)	61,1	12,4	26,2	30,4	30,2	18,1
R <sub>L</sub> (% MS)	55,0	5,8	n.d.	26,3	25,1	10,0
<b>Q<sub>Fbrut</sub></b> <b>(kg/h)</b>	4,9	10,7	9,9	9,95	10,63	10,68
<b>Q<sub>P</sub></b> (kg/h)	1,6	2,54	2,08	2,1	3,2	2,7
% M.S.	42,4	48,8	20,6	45,6	48,7	51,2
R <sub>M.S.</sub> (%)	16,2	33,1	25,6	26,8	41,8	37,1
R <sub>P</sub> (%)	13,4	45,2	n.d.	27,9	44,7	49,1
R <sub>L</sub> (%)	22,7		n.d.	31,2	55,2	34,1
<b>Q<sub>CL</sub></b> (kg/h)	0,39	1,47	1,8	0,8	0,4	0,5
% M.S.	29,0	44,5	17,9	40,4	47,0	49,1
R <sub>M.S.</sub> (%)	2,8	17,5	18,3	6,1	4,5	6,4
R <sub>P</sub> (%)	6,0	n.d.	n.d.	13,7	9,5	27,2
R <sub>L</sub> (%)	2,3		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Q<sub>PA</sub></b> (kg/h)	3,8			6,1	6,3	7,3
%M.S.	7,1			6,3	4,8	4,7
R <sub>M.S.</sub> (%)	6,6			11,2	8,2	9,1
R <sub>P</sub> (%)	14,3			23,4	14,7	5,0
R <sub>L</sub> (%)	n.d.			n.d.	n.d.	n.d.
<b>Q<sub>Em 2</sub></b> (kg/h)	0,76			0,95	0,39	0,18
% M.S.	69,7			70,9	67,8	76,8
R <sub>M.S.</sub> (%)	13,0			8,3	2,7	3,3
R <sub>P</sub> (%)	3,9			4,7	1,0	0,6
R <sub>L</sub> (%)	25,6			n.d.	n.d.	n.d.
<b>Q<sub>PA+Em2</sub></b>		6,7	6,0			
% M.S.		7,1	59,7			
R <sub>M.S.</sub> (%)		12,9	11,2			
R <sub>P</sub> (%)		12,7	7,6			
R <sub>L</sub> (%)		26,22	n.d.			

La figure 65 représente les répartitions massiques brutes dans les différentes phases pour les extrusions et les co-extrusions. La première conclusion qui apparaît concerne les séparations liquide/solide. Pour rappel, la graine de colza était celle pour laquelle la séparation liquide/solide était la moins efficace. L'ajout d'une seconde graine permet une nette amélioration de la séparation : la faible tenue mécanique du colza est compensée par

le chanvre ou le cardon. Lorsque le colza est traité seul, l'extrudât représente plus de 40% des sorties brutes. Co-extrudé avec le chanvre ou le cardon, la part de l'extrudât chute à moins de 20%.

L'effet de compensation entre les graines est aussi observé pour le pied et le culôt lourd. La teneur en pied supérieure à 20% pour le chanvre a été limitée par l'ajout du colza. Pour les co-extrusions, les teneurs en sorties solides semblent correspondre à la moyenne des teneurs respectives obtenues lors du fractionnement des graines seules.

Il ne semble donc pas exister de sélectivité d'extraction entre les graines.

En revanche, il existe un rendement en émulsion 2 pour la co-extrusion chanvre/colza équivalent à celui du colza seul alors même que le fractionnement aqueux du chanvre seul n'avait pas permis une séparation efficace entre la phase aqueuse et l'émulsion 2. Dans ce cas, un effet synergique est observé, au niveau du procédé, entre le chanvre et le colza.

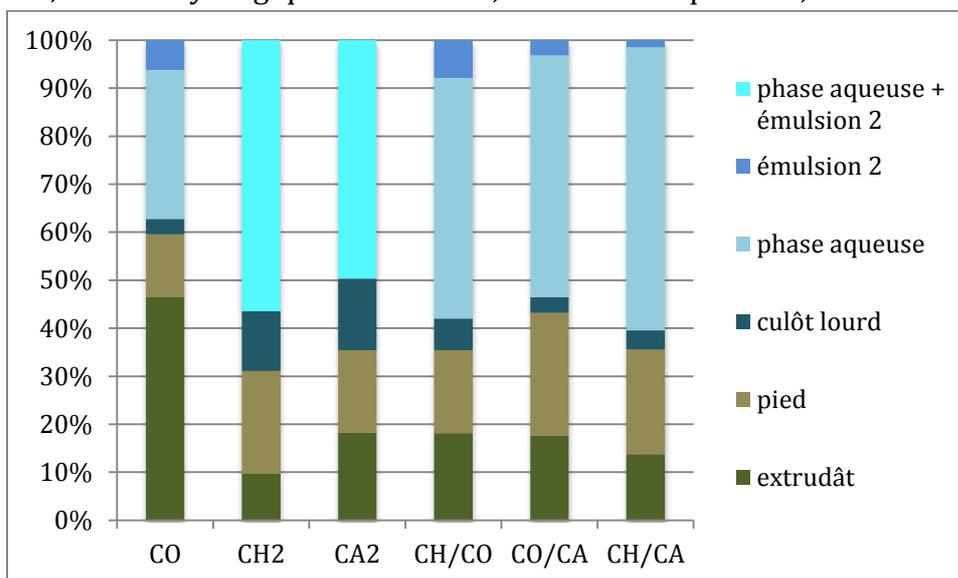


Figure 65 : Répartitions massiques brutes dans les différentes phases lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions

Concernant les répartitions en matière sèche (figure 66), nous pouvons observer que les co-extrusions équilibrent les teneurs en matière sèche des phases.

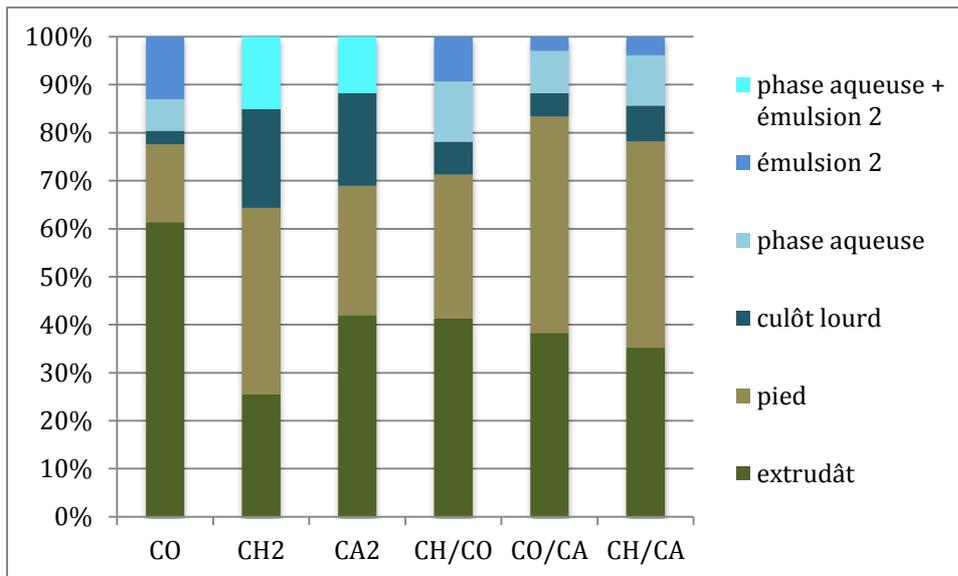


Figure 66 : Répartition de la matière sèche dans les différentes phases lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions

Comme pour les extrusions de graines seules, la phase d'intérêt est l'émulsion 1. Les figures 67 et 68 représentent les rendements en matière sèche et en protéines dans les différentes phases composant les émulsions 1.

D'un point de vue macroscopique, les émulsions 1 et 2 obtenues lors de la co-extrusion chanvre/colza étaient celles qui avaient l'aspect le plus intéressant, et la stabilité la plus importante, parmi les co-extrusions testées.

Le mélange chanvre/colza est celui pour lequel l'émulsion 1 est la plus riche en matière sèche et en protéines, ce qui explique sa plus grande stabilité. C'est également pour ce mélange que le rendement en émulsion 2 est maximisé. De ce fait, seule la co-extrusion de chanvre colza a été répétée lors de campagnes d'extrusion suivantes afin d'étudier plus précisément la qualité des émulsions obtenues.

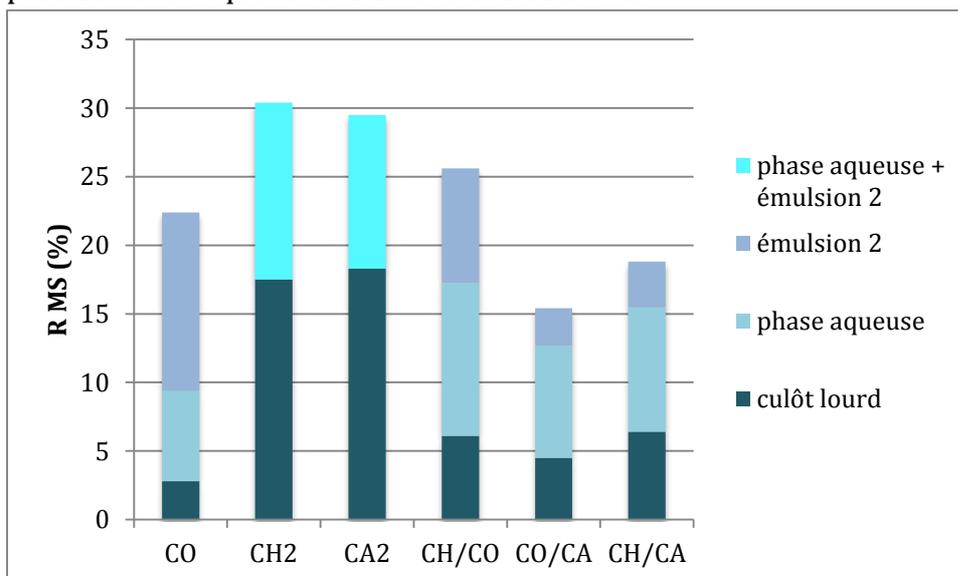


Figure 67 : Rendements en matière sèche dans les émulsions 1 lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions

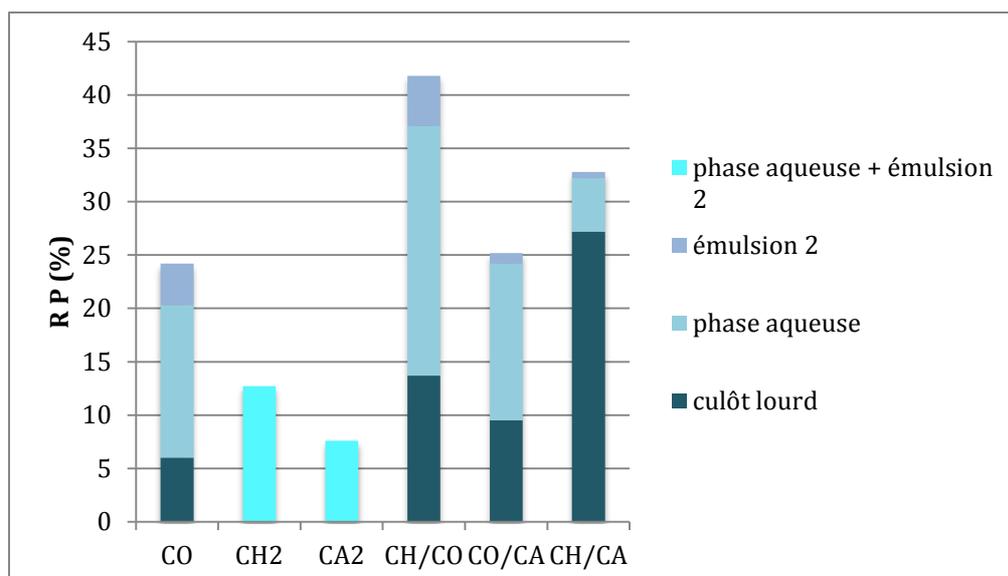


Figure 68 : Rendements en protéines dans les émulsions 1 lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions

Le tableau 61 ci-après détaille la composition chimique des différentes phases obtenues suite aux co-extrusions.

Tableau 61 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des mélanges de graines : composition chimique des différentes phases

		CH/CO	CO/CA	CH/CA
Profil de vis		7	7	7
Débit d'entrée en graines (kg/h)*		3,9	3,7	3,7
Débit d'eau (kg/h)		8	8	8
Ratio L/S		2,1	2,2	2,2
Vitesse de vis (RPM)		250	250	250
Couple		0	0	0
<b>Q<sub>Ex</sub></b> (kg/h)		2,2	2,2	1,7
M.S. (%)		72,4	59,3	67,4
P (% MS)		16,8	16,8	13,0
L (% MS)		22,3	17,7	9,2
M.M. (% MS)		4,0	n.d.	n.d.
Composition du filtrât	<b>Q<sub>P</sub></b> (kg/h)	2,1	3,2	2,7
	% en masse du filtrât brut	21	31,2	25,4
	M.S. (%)	45,6	48,7	51,2
	P (% MS)	19,9	21,2	28,8
	L (% MS)	40,7	26,2	26,2
	M.M. (% MS)	3,7	n.d.	n.d.

Composition de l'émulsion 1	$Q_{CL}$ (kg/h)	0,79	0,36	0,49
	% en masse du filtrât brut	8,0	3,5	4,6
	M.S. (%)	40,4	47,0	49,1
	P (% MS)	58,8	n.d.	n.d.
	L (% MS)	31,3	n.d.	n.d.
	M.M. (% MS)	4,1	n.d.	n.d.
	$Q_{PA}$ (kg/h)	6,1	6,3	7,3
	% en masse du filtrât brut	61,4	61,5	68,3
	M.S. (%)	6,3	4,8	4,7
	P (% MS)	47,9	35,6	12,0
	L (% MS)	n.d.	n.d.	n.d.
	M.M. (% MS)	17,0	n.d.	n.d.
	$Q_{Em2}$ (kg/h)	0,95	0,39	0,18
	% en masse du filtrât brut	9,6	3,8	1,7
	M.S. (%)	70,9	67,8	76,8
	P (% MS)	8,3	2,7	3,3
	L (% MS)	81,2	n.d.	n.d.
	M.M. (% MS)	0,75	n.d.	n.d.

\*le débit d'entrée sec est corrigé en fonction de la somme des sorties sèches ( $Q_{G\ sec} = Q_{Ex\ sec} + Q_{P\ sec} + Q_{CL\ sec} + Q_{Ph\ aq\ sec} + Q_{Em\ 2\ sec}$ ). Le débit d'entrée théorique est corrigé par la réalité expérimentale.

M.S. est le taux de matière sèche de la phase, en %.

P (% M.S.) est le taux de protéines de la phase, en % M.S.

L (% M.S.) est la teneur en lipides de la phase, en % M.S.

M.M. (% M.S.) est la teneur en matière minérale, en % M.S.

La figure 69 représente les compositions des extrudats pour les différentes co-extrusions. Les teneurs en matière sèche, moins variables et plus élevées que celles des graines seules, sont comprises entre 60 et 70%. La séparation solide/liquide au niveau du contrefilet a donc été propice à l'appauvrissement en phase liquide de l'extrudat. Les teneurs en protéines sont comparables pour les trois extrudats. Ce n'est pas le cas des teneurs en lipides, qui sont nettement plus élevées pour les mélanges chanvre/colza et colza/cardon. De plus, pour tous les mélanges, les extrudats présentent des

concentrations résiduelles en huile très faibles, de 10 à 25%. L'expression d'huile a donc été très efficace pour tous ces mélanges.

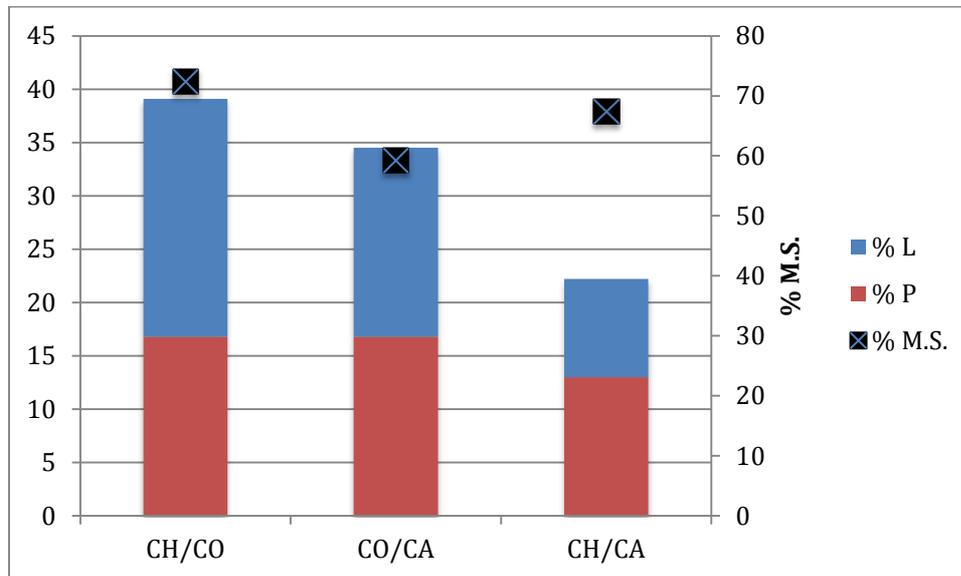


Figure 69 : Composition des extrudats pour les co-extrusions

L'émulsion 1, issue du fractionnement du mélange chanvre/colza, présente une teneur en matière sèche de 18%, et cette dernière est composée de près de 45% de protéines, 10% de lipides et 12% de matière minérale. Pour le colza seul, la teneur en matière sèche de l'émulsion 1 est aussi de 18%, et cette dernière est composée à 35% par des protéines, 15% par des lipides et 8% par de la matière minérale. Les deux émulsions 1 ont des compositions différentes. L'enrichissement supérieur de l'émulsion 1 en protéines lors de la co-extrusion peut faire partie des facteurs expliquant sa meilleure stabilité, d'autant plus qu'elle est moins riche en lipides que l'émulsion 1 issue du fractionnement du colza seul.

Pour le fractionnement chanvre/colza, l'émulsion 2 présente une teneur en matière sèche élevée, de l'ordre de 70% : matière sèche constituée à 81% par des lipides. Cette information ne permet pas pour autant de conclure que cette émulsion est de nature « eau dans huile ». En effet, l'émulsion 1 est de nature « huile dans eau », et l'émulsion 2 correspond à une concentration de cette dernière émulsion. De ce fait, à ce stade des caractérisations, l'émulsion 2 correspond à une émulsion « huile dans eau » très concentrée en phase dispersée. Sa teneur en protéines atteint les 10% de la matière sèche. Les 10% restants, non caractérisés, correspondent probablement à des composés hydrophiles co-extraits, tels que des polysaccharides ou des pectines. La combinaison de ces composés, avec les protéines, ainsi que d'éventuels phospholipides présents dans l'huile végétale, et l'agitation mécanique induite par le mouvement des vis participent à l'émulsification.

Comparativement au colza seul, l'émulsion 2 issue du mélange de graines est légèrement plus riche en protéines. Cela peut être lié à la composition initiale des graines : le mélange chanvre/colza présente une teneur en protéines supérieure à celle du colza seul.

### III.5.3 Evaluation analytique de la sélectivité d'extraction pour les différents couples de graines

La mesure est destinée à déterminer l'existence d'une sélectivité sur l'extraction des deux graines co-extrudées, donc à savoir si l'une est préférentiellement exprimée par rapport à l'autre. Le « marqueur » choisi pour cela est le profil en acides gras des huiles de ces trois graines. En particulier, et contrairement au chanvre et au colza, l'huile de cardon ne possède pas d'acide linoléique C<sub>18:3</sub>. De plus, le rapport en acides gras C<sub>18:2</sub>/C<sub>18:3</sub> diffère pour le colza et le chanvre. Chaque huile extraite par pressage à froid en presse monovis a été analysée en CPG afin de déterminer son profil en acides gras. Des mélanges modèles entre les huiles ont été préparés puis analysés. Selon le type d'huiles mélangées, des droites de régression pour la teneur en C<sub>18:3</sub> ou le ratio C<sub>18:2</sub>/C<sub>18:3</sub> ont été obtenues. Les huiles contenues dans les extrudats ont été extraites par la méthode Soxhlet. L'huile récupérée a été analysée par CPG. Les droites de régression ainsi tracées permettent de fournir la composition en huiles respectives de chaque graine dans les extrudats et donc de calculer les rendements en huile extraite, présente dans le filtrât et les compositions de ces huiles.

Ainsi, pour les extrusions contenant du cardon c'est la quantité relative en C<sub>18:3</sub> présente au sein de l'huile extraite de l'extrudat qui permet de connaître la quantité d'huile de colza ou de chanvre. Pour l'extrusion chanvre/colza c'est le rapport en acides gras C<sub>18:2</sub>/C<sub>18:3</sub> qui le permet.

Tableau 62 : Equations de régression pour les mélanges modèles chanvre/colza, chanvre/cardon et colza/cardon réalisés

Mélange modèle CH/CO			Mélange modèle CH/CA			Mélange modèle CO/CA		
%CO	%CH	C <sub>18:2</sub> /C <sub>18:3</sub> (CPG)	%CH	%CY	Teneur C <sub>18:3</sub> (CPG) (%)	%CO	%CY	Teneur C <sub>18:3</sub> (CPG) (%)
0	100	4,05	0	100	0	0	100	0
25	75	3,64	25	75	3,73	25	75	2,69
50	50	3,23	50	50	7,25	50	50	4,70
75	25	2,75	75	25	10,73	75	25	6,94
100	0	2,15	100	0	14,09	100	0	9,12
Equation de régression : $y = -0,0188x + 4,102$ R <sup>2</sup> =0,9928			Equation de régression : $y = 0,1407x + 0,124$ R <sup>2</sup> =0,9996			Equation de régression : $Y = 0,09x + 0,192$ R <sup>2</sup> =0,9979		

Parmi les graines employées pour ce procédé, le cardon semble la plus difficile à extraire, du fait de sa teneur en huile inférieure, et de sa teneur en fibres supérieure. La comparaison des répartitions en huile dans les différentes phases dans les sorties d'extrusion lors du fractionnement des graines seules montre que, pour le profil 7, le cynara est la graine pour laquelle l'extrudat est le moins efficacement appauvri en huile. En effet, l'extrudat de cynara contient encore 16% des lipides présents initialement dans

la graine, tandis que les extrudâts de chanvre et de colza ne contiennent plus que 7 à 8% des lipides initiaux.

**Tableau 63 : Composition des extrudâts et des filtrâts**

	Graines entrantes			Sorties du procédé d'extraction par extrusion bi-vis								
	G1	G2	G1/G2 calculé	Extrudât				Filtrât				
	QH <sub>G1</sub> (kg/h)	QH <sub>G2</sub> (kg/h)		QH (kg/h)	G1/G2 (CPG)	QH <sub>G1</sub> (kg/h)	QH <sub>G2</sub> (kg/h)	QH <sub>G1</sub> (kg/h)	QH <sub>G2</sub> (kg/h)	G1/G2 Calculé	Rdt G1	Rdt G2
G1=CO G2=CH	0,80	0,64	56/44	0,35	54/46	0,19	0,16	0,61	0,48	56/44	77	75
G1=CH G2=CA	0,64	0,46	58/42	0,10	0,23	43/57	0,043	0,60	0,40	60/40	93	87
G1=CO G2=CA	0,80	0,46	63/37	0,23	60/40	0,14	0,09	0,66	0,37	64/36	83	80

QH<sub>G</sub> est le débit d'entrée en huile correspondant à la graine

QH est le débit en huile contenue dans l'extrudât

G1/G2 calculé correspond au pourcentage relatif d'entrée ou de sortie en huile issue de chaque graine

G1/G1 (CPG) correspond au pourcentage relatif en huile issue de chaque graine dans l'huile de l'extrudât. Cette valeur est mesurée grâce à l'étalonnage décrit dans le tableau 14.

Les mélanges équimassiques de graines préparés avant extrusion ne présentaient pas une composition massique initiale en huile de 50/50 puisque chaque graine était constituée d'une teneur initiale en huile différente (tableau 62). Ainsi, pour le mélange CH/CO, les proportions initiales en huile sont de 56/44.

Les mesures réalisées ont permis de déterminer pour chaque cas si une ségrégation existait dans le pressage des deux graines.

Pour les trois co-extrusions, il ne semble pas y avoir de ségrégation entre les deux graines puisque l'huile extraite dans le filtrât présente la même composition relative que l'huile entrante. D'autre part, ces résultats montrent une efficacité de pressage très élevée puisque les rendements d'extraction d'huile dans le filtrât sont supérieurs à 75% quelles que soient les graines.

**Tableau 64 : Composition des huiles entrantes et contenue dans le filtrât pour les co-extrusions**

	Chanvre colza	Chanvre cynara	Colza cynara
Composition de l'huile entrante	Colza : 56% Chanvre : 44%	Chanvre : 58% Cynara : 42%	Colza : 64% Cynara : 36%
Composition de l'huile contenue dans le filtrât	Colza : 56% Chanvre : 44%	Chanvre : 60% Cynara : 40%	Colza : 64% Cynara : 36%
Déplacement de l'équilibre	Non	Légèrement vers le chanvre	Non

### III.5.4 Activité antioxydante des fractions produites

Lors de la mise en place des essais de fractionnement aqueux des mélanges de graines, décrits dans le chapitre précédent, partie III.5, l'un des objectifs était de conférer aux extraits produits une activité dont l'une des graines employées ne disposait pas. En l'occurrence, l'activité choisie est la propriété antioxydante. Pour rappel, les extraits hydroalcooliques de graines utilisées pour les travaux présentaient les propriétés antioxydantes suivantes (paragraphe II.2.6) :

Tableau 65 : Propriétés antioxydantes des extraits hydroalcooliques issus des graines

	IC 50 (mg/L) (n=3)
Cardon	19,8 ±1,2
Pastel	21,8 ±1,3
Colza	75,8 ± 0,7
Chanvre	nulle

Plus l'IC50 d'un extrait est faible, meilleure est son activité antioxydante.

Comme indiqué dans le tableau 88 ci-dessus, les graines de chanvre sont les seules parmi les fractions testées à ne pas posséder d'activité antioxydantes. Les graines de cardon présentant les meilleures activités antioxydantes, les mélanges de graines suivants ont été testés :

- Chanvre/cardon
- Colza/cardon
- Chanvre/colza

#### III.5.4.1 Activités antioxydantes des phases solides

L'activité antioxydante des extrudats et des pieds obtenus ont été effectuées sur des matières séchées à 50°C et finement broyées. Des macérations hydroalcooliques ont été faites, et l'IC50 des macérats a été mesurée à l'aide du radical DPPH. Le protocole détaillé est décrit dans la partie expérimentale, paragraphe P.E.1.15.

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 66 ci-dessous.

Tableau 66 : Valeurs des IC50 sur le radical DPPH pour les macérats obtenues avec les fractions solides de sortie d'extrusion

	IC 50 fraction issue de l'extrudat (mg/L)	IC 50 fraction issue du pied (mg/L)
Chanvre/cardon	15,6	284
Colza/cardon	65,1	141
Chanvre/colza	131	401

Comme l'on pouvait s'y attendre, l'essai sans cardon, comprenant donc une graine sans activité antioxydante et une dont l'activité antioxydante est trois fois plus faible que celle du cardon donne les extrudats et les pieds présentant l'activité antioxydante la plus faible.

Il est toutefois intéressant de noter que malgré l'absence de cardon, l'essai chanvre/colza donne un extrudat dont l'activité antioxydante n'est pas négligeable. D'autre part, parmi les extrudats, c'est l'essai chanvre/cardon qui donne la meilleure activité antioxydante, alors que celle du chanvre est nulle. L'essai colza/cardon donne un extrudat présente une activité antioxydante quasiment égale à la moyenne des activités antioxydantes des graines séparées.

Les activités antioxydantes des pieds sont faibles comparativement à celles des extrudats produits. Cela est surprenant dans la mesure où ces deux phases sont de natures proches.

### III.5.4.2 Activités antioxydantes des phases liquides

Les activités antioxydantes ont été testées sur les phases aqueuses et les émulsions 2 produites lors du fractionnement aqueux des mélanges de graines précédemment décrits. Les activités antioxydantes des phases aqueuses sont compilées dans le tableau 67 ci-dessous.

**Tableau 67 : Valeurs des IC50 sur le radical DPPH pour les phases aqueuses**

	IC50 Phase aqueuse (mg/L)
Chanvre/cardon	394,6
Colza/cardon	270,2
Chanvre/colza	293,4

La première observation concerne le fait que les activités antioxydantes des phases aqueuses sont faibles comparativement à celles des graines employées, et à celles des extrudats obtenus. Les molécules antioxydantes présentent donc peu d'affinité avec l'eau, ou nécessitent des ajustements dans les paramètres, tels que la température employée ou le pH de la phase aqueuse extractante afin d'améliorer leur extraction.

C'est le mélange des deux graines les plus antioxydantes, cardon et colza, qui donne la phase aqueuse avec la meilleure valeur de l'IC50. Même sans la présence de cardon, le mélange chanvre/colza donne une phase aqueuse dont l'IC50 est proche de celle du mélange colza/cardon.

Ces valeurs laissent envisager la possibilité de lyophiliser les extraits obtenus pour en obtenir des fractions actives antioxydantes.

Concernant les émulsions, nous avons été bloqués par le procédé habituellement employé au laboratoire, qui est particulièrement adapté aux solides ou aux liquides hydrophiles. Les essais directs sur les émulsions ont été infructueux. Nous avons alors décidé de séparer les phases grasses et huileuses des émulsions afin d'en déterminer séparément les activités antioxydantes. Les activités antioxydantes des phases aqueuses ont donné les résultats suivants :

**Tableau 68 : IC 50 des phases aqueuses des émulsions issues des co-extrusions**

	Valeur de l'IC50 (g/L)
Chanvre/Colza	9,34 ± 1,60

Colza/Cardon	12,02 ± 1,5
Chanvre/Cardon	14,76 ± 2,2

Ces activités sont très faibles, cela laisse supposer que les actifs anti-oxydants initialement présents dans les graines ne sont pas extraits lors du fractionnement aqueux. Cela peut être lié à un manque d'affinité avec la phase aqueuse, mais l'huile végétale extraite peut également lier cette extraction.

Les phases grasses ont été envoyées au laboratoire Pharma Dev de la faculté de pharmacie de Toulouse, dans l'équipe du professeur Françoise Nepveu. La méthode repose sur la comparaison des propriétés antioxydantes de deux échantillons vis à vis de leur capacité à inhiber la peroxydation lipidique en milieu micellaire.

Le pouvoir antioxydant est évalué en mesurant la capacité de l'échantillon à protéger le  $\beta$ -carotène de l'oxydation lorsqu'il est inclus dans une micelle. Il s'agit alors de révéler la capacité de l'échantillon à pénétrer la micelle et à agir comme antioxydant. La référence utilisée est la vitamine E.

Nos échantillons, en l'occurrence les phases grasses des émulsions issues des co-extrusions, ne présentent aucune activité antioxydante significative dans les conditions expérimentales utilisées.

Ainsi, si les résidus solides et les phases aqueuses présentent des propriétés antioxydantes notables, ce n'est pas le cas des émulsions obtenues.

Les résultats sur les solides et les phases aqueuses laissent envisager l'exploitation de ces fractions au vu de leurs activités biologiques.

Concernant les émulsions, il est probable que la présence de l'huile végétale empêche la co-extraction de composés antioxydants, ou en empêche leur dosage dans les conditions testées.

### III.5.5 Conclusion et avantages des co-extrusions

L'objectif de ces travaux de co-extrusion était de coupler les avantages de deux graines lors du procédé. Les graines de chanvre et cardon ont permis la séparation liquide/solide la plus efficace. Le mélange du chanvre ou du cardon aux graines de colza a permis d'atteindre une efficacité de séparation liquide/solide quasiment égale à celle atteinte pour le chanvre ou le cardon seuls. Ainsi, le chanvre et le cardon permettent de compenser la faible efficacité de la séparation liquide/solide observée pour le colza.

Les répartitions massiques brutes et sèches correspondent à une moyenne de ce qui était obtenu lors du fractionnement TMC des graines seules, ce qui est lié à l'absence de sélectivité d'extraction démontrée grâce aux analyses en GC des huiles végétales extraites des filtrats.

Les travaux menés sur la co-extrusion du mélange chanvre/colza ont conduit à l'obtention d'émulsion 2 d'aspect macroscopique homogène, comparable aux émulsions 2 obtenues avec la graine de colza seule. Les émulsions 1 issues de cette co-extrusion présentent des

stabilités macroscopiques nettement supérieures à celles obtenues lors de l'extrusion du chanvre. L'évaluation de la stabilité est détaillée et décrite dans le chapitre suivant.

Les analyses chromatographiques ont permis de conclure quant à une absence de sélectivité d'extraction des huiles végétales dans les filtrats.

En termes de rendement, l'extrusion de 4 kg/h en graines de colza conduit à un débit de sortie en émulsion 2 de l'ordre de 0,7 kg/h, tandis que, pour un même débit d'entrée, le débit en émulsion 2 pour le mélange chanvre/colza est de 0,95 kg/h. Les débits de sortie en émulsion 2 pour les mélanges sont respectivement de 0,39 et 0,18 kg/h pour les mélanges colza/cardon et chanvre/cardon. Ces débits sont très faibles comparativement à ceux obtenus pour le mélange chanvre/colza. Malgré l'absence de ségrégation lors du pressage, il semblerait que d'une part la présence de colza ne permette pas de compenser l'inefficacité du cardon en termes de qualité et de rendements d'émulsion. De même, le mélange de chanvre et de cardon ne permet pas d'obtenir des qualités notables d'émulsions 1 et des rendements significatifs en émulsion 2.

Les essais de fractionnement des mélanges colza/cardon et chanvre/cardon ont mené à des émulsions 1 peu stables, et à des émulsions 2 dont les rendements d'obtention étaient faibles. Ceci nous a permis de conclure que la présence du colza est indispensable à l'obtention d'émulsions stables et homogènes. D'autre part, dans le mélange colza/cardon, la présence de cardon permet d'améliorer la séparation liquide/solide mais les émulsions obtenues sont de qualité proches de celles du cardon, donc peu homogènes et de rendements faibles. Ainsi, travailler sur la composition initiale du mélange de graines, qui a été fixée à 50/50 lors de nos essais, pourrait permettre de cumuler les avantages de chacune que ce soit au niveau du procédé ou au niveau de la qualité des produits.

Ces résultats sont prometteurs pour différents types d'applications : la co-extrusion peut ainsi permettre de palier à des problèmes d'approvisionnement en un type de graine, mais elle peut également être employée afin de valoriser, en petite quantité, une graine rare ou onéreuse. La graine co-extrudée peut être choisie en fonction d'une propriété biologique, telle qu'un profil d'acides gras avantageux, que l'on souhaite conférer aux fractions de sortie.

### **III.6 Enrichissement des émulsions de graines oléo-protéagineuses par incorporation d'un composé actif lors du procédé de fractionnement en extrusion bi-vis : cas des mucilages de lin**

Les essais réalisés sur le fractionnement aqueux de graines seules ont mené à l'obtention de deux types d'émulsions : les émulsions 1 correspondent au filtrât débarrassé de son pied, et les émulsions 2 correspondant à la phase supérieure de l'émulsion 1 centrifugée.

Les émulsions 2 présentent des stabilités intéressantes dans le temps, tandis que les stabilités des émulsions 1 sont beaucoup plus courtes. L'objectif des travaux suivants est d'améliorer la stabilité des émulsions 1, dont le rendement d'extraction est nettement supérieur à celui des émulsions 2. Le succès de ces travaux permettrait d'obtenir un rendement élevé, de l'ordre de plusieurs kg/h, en émulsions stables, dont le post-traitement consisterait en une simple filtration du filtrât.

Les mucilages sont les fractions polysaccharidiques de graines de lin, libérées des graines par contact prolongé avec de l'eau chaude. Ces polysaccharides forment un réseau visqueux. Leur incorporation au filtrât pourra conduire à son épaissement, et le réseau se dispersera au sein de phase, en particulier autour des gouttelettes d'huile, retardant ainsi les phénomènes de coalescence.

Le procédé permettant de produire les mucilages de lin est décrit dans le chapitre II. La fraction mucilagineuse obtenue présente les caractéristiques suivantes (Tableau 69).

**Tableau 69 : Composition des mucilages de lin**

Teneur en matière sèche (%)	Teneur en matières minérales (% M.S.)	Teneur en lipides <sup>1</sup> (% M.S.)	Teneur en protéines <sup>2</sup> (% M.S.)	Teneur en sucres totaux <sup>3</sup> (% M.S.)
92,7 ± 0,1	15,4 ± 0,1	2,8 ± 0,1	26,9 ± 0,1	36,92 ± 0,3

<sup>1</sup> la teneur en lipides des mucilages est déterminée par dosage colorimétrique (Reversat, 1976)

<sup>2</sup> la teneur en protéines est déterminée par le dosage de l'azote total (Méthode Kjeldahl)

<sup>3</sup> la teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode au phénol sulfurique (DuBois et al., 1956)

### **III.6.1 Etude de la stabilisation *ex-situ* des émulsions de graines de colza par le mucilage de lin**

Les teneurs en mucilages incorporés ont été choisies d'une part en fonction des résultats de stabilisation des émulsions 1 avec les mucilages, mais également en fonction des diagrammes de phase alliant isolâts protéiques et mucilages.

Il a également fallu tenir compte de la disponibilité des mucilages pour le choix de la teneur en mucilages, la masse de mucilages lyophilisés disponibles étant limitée.

Des émulsions 1, obtenues à partir de graines de colza lors de la campagne de production n°4 ont été enrichies en mucilages. Les mélanges ont été réalisés sur des émulsions stockées à +4°C, ou -18°C, pendant 15 jours, suite à leur production en extrudeur bi-vis. Les taux d'incorporation de mucilages ont été calculés par rapport à la masse brute de l'émulsion. Les mélanges ont été réalisés par agitation à l'ultraturrax, puis centrifugées, afin d'en évaluer la déstabilisation accélérée.

Le diamètre des gouttelettes constitutives de l'émulsion a été mesuré le jour même de leur formulation.

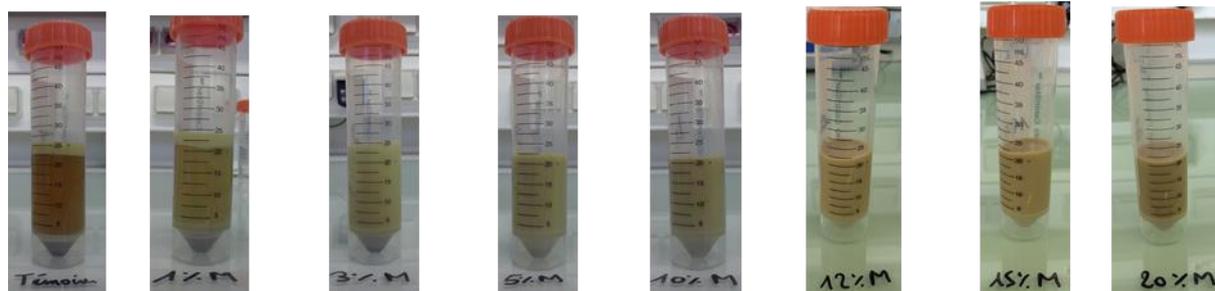


Figure 70 : Aspect des émulsions enrichies en mucilages après centrifugation

Tableau 70 : Diamètre des gouttelettes des émulsions enrichies en mucilages

Quantité de mucilages	Témoin <sup>1</sup>	1%	3%	5%	10%	12%	15%	20%
Diamètre des gouttes (μm)	3,9 ± 1,9	2,5 ± 0,9	2,0 ± 0,6	1,7 ± 0,7	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,3	0,96 ± 0,2

<sup>1</sup>Le diamètre des gouttelettes pour le témoin correspond au diamètre mesuré le jour même de la formulation des émulsions sans addition de mucilages.

L'ajout de mucilages dans l'émulsion 1 présente deux types d'influences :

- La stabilité face à la centrifugation augmente (le volume de surnageant diminue) avec l'ajout de mucilages. A partir de 10% en masse de mucilages ajoutés dans l'émulsion 1, la centrifugation n'entraîne aucune séparation de phases.
- Le diamètre des gouttelettes diminue nettement avec l'ajout de mucilages. En outre, l'écart-type diminue également lorsque la masse de mucilages ajoutés augmente. La diminution de la taille des gouttes augmente la stabilité de l'émulsion. La diminution de l'écart-type démontre une répartition plus homogène des gouttes, qui favorise également la stabilité de l'émulsion.

### III.6.2 Etude de faisabilité de l'incorporation des mucilages de lin lors du fractionnement aqueux des graines en extrudeur bi-vis

L'efficacité de l'ajout ex-situ des mucilages pour la stabilisation des émulsions 1 a été démontrée. Pour l'étude de l'incorporation de ces mucilages lors du fractionnement aqueux en extrudeur, les débits de mucilages ont été choisis en fonction du débit d'émulsion 1, de la teneur en mucilages souhaitée dans l'émulsion 1, et de la masse de mucilages disponibles.

Du fait de leur hydrosolubilité et de la séparation liquide/solide dans les contrefilets, nous avons émis l'hypothèse que les mucilages seraient très majoritairement contenus dans le filtrât.

Pour une teneur en mucilages de 5% dans l'émulsion 1, le débit d'addition de mucilages doit être de 0,295 kg/h.

**Tableau 71 : Débits d'addition de mucilages en fonction des pourcentages ciblés dans les émulsion 1**

Graine	Profil de vis	Débit d'émulsion 1 (kg/h)	% de mucilages dans l'émulsion 1 ciblé	Débit d'addition de mucilages (kg/h)
Colza	7	5,9	1	0,059
			2	0,118
			5	0,295
Chanvre/colza	7	7,7	1	0,077
			2	0,154

Deux voies distinctes d'addition de mucilages ont été envisagées :

- par un pré-mélange des graines et des mucilages « ex situ », suivi de l'introduction du pré-mélange solide dans l'extrudeur
- par introduction de mucilages sous forme liquide par l'intermédiaire d'une pompe, directement dans l'extrudeur lors du fractionnement des graines.

Les mucilages préalablement lyophilisés sont mélangés aux graines à l'aide d'un malaxeur. Une faible quantité d'eau est ajoutée afin de permettre l'enrobage des graines par le mucilage. Le mélange est ensuite séché à 50°C pour éliminer l'eau.

Ce protocole est destiné à éviter une trop grande ségrégation des graines et des mucilages dans le doseur. Pour un débit d'entrée en graines de 4 kg/h, une addition de 0,295 kg/h de mucilages est nécessaire.

Une fois introduit dans l'extrudeur, la formation du bouchon dynamique n'a pas été possible. La séparation liquide/solide n'a donc pas eu lieu : l'extrudât est gorgé d'eau et de mucilages et le filtrât ne s'écoule pas. Cette voie d'incorporation a été abandonnée

L'autre moyen d'introduction consiste à introduire les mucilages en solution dans l'eau à une concentration de 36,8 g/kg par le biais de la pompe.

Dans ce cas aussi, le bouchon dynamique n'a pas été formé et seul un extrudât gorgé de liquide a été obtenu en sortie d'extrudeur.

Afin de résoudre ce problème, deux changements ont été effectués:

- un changement de profil de vis avec un choix orienté vers le profil 6, pour lequel les contrefilets ont un pas de vis inférieur donc pour lequel la contrainte mécanique est supérieure au niveau de la zone de séparation solide/liquide
- une diminution de la quantité de mucilages introduite, en ciblant une teneur en mucilages dans l'émulsion 1 de l'ordre de 1 à 2%.

Le débit d'entrée en mucilages est alors de 0,059 kg/h.

Dans ces conditions, avec une teneur en mucilages théorique de 1% dans l'émulsion 1, la séparation liquide solide est efficace, l'extrudât présente un aspect relativement sec et le filtrât s'écoule régulièrement.

Avec les graines de colza seules, et pour une teneur en mucilages de 2% dans l'émulsion 1, l'extrudât présente une texture pâteuse, très humide, avec une teneur en humidité de l'ordre de 66%. Cela laisse à penser que le point limite de fonctionnement est atteint dans ces conditions avec un bouchon dynamique instable.

### III.6.3 Fractionnement des graines en extrudeur bi-vis en présence de mucilages de lin

Les essais d'incorporation de mucilages ont été réalisés avec le colza (essais 1 et 2) et avec le mélange chanvre/colza 50/50 (essais 3 et 4) (Tableau 72). Les taux d'incorporation de mucilages étaient de 1%/ émulsion 1 (essais CoMu1 et ChCoMu1) ou 2% (essais CoMu2 et ChCoMu2).

**Tableau 72 : Fractionnement thermo-mécano-chimique du colza, du chanvre et du mélange chanvre/colza en présence d'une solution aqueuse de mucilages : répartitions massiques et rendements d'extraction en protéines et en lipides pour les différentes phases**

Graines ou mélange de graines	Colza	Colza + mucilages 1	Colza + mucilages 2	Chanvre/colza	Chanvre/colza + mucilages 1	Chanvre/Colza + mucilages 2
N°de l'essai	CO2	CoMu1	CoMu2	CHCO	ChCoMu1	ChCoMu2
Profil de vis	7	6	6	7	6	6
Débit de graines sec (kg/h)*	4,3	3,8	3,8	3,9	3,7	3,7
Débit d'eau + mucilages (kg/h)	8,0	8,06	8,19	8	8,08	8,15
Débit de mucilages (kg/h)	n.d.	0,060	0,121	n.d.	0,078	0,160
Ratio L/S	1,8	2,1	2,2	2,1	2,2	2,2
Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250
Couple	0	0	0	0	0	0
$Q_{Ex}$ (kg/h)	5,7	3,9	5,0	2,2	1,8	1,7
$R_{M.S.}$ (%)	61,4	45,1	45,1	36,8	28,0	26,6
$R_P$ (%)	61,1	49,2	49,1	30,4	24,5	21,8
$R_L$ (%)	55,0	49,5	57,1	26,3	27,8	18,7
$Q_{Fbrut}$ (kg/h)	6,6	8,15	7,1	9,95	10,5	10,5

<b>Q<sub>P</sub></b> (kg/h)	1,6	2,3	1,9	2,1	2,8	2,8
R <sub>M.S.</sub> (%)	16,2	19,0	16,8	26,8	29,6	27,4
R <sub>P</sub> (%)	13,4	18,7	7,9	27,9	29,8	27,4
R <sub>L</sub> (%)	22,7	21,9	n.d.	31,2	29,4	22,7
<b>Q<sub>Em1</sub></b> (kg/h)	4,95	5,7	5,2	7,85	7,7	7,7
R <sub>M.S.</sub> (%)	22,4	32,2	40,7	25,6	45,3	48,0
R <sub>P</sub> (%)	24,2	36,3	31,9	41,8	56,7	67,1
R <sub>L</sub> (%)	27,9	24,9	21,4	n.d.	39,7	39,9
<b>Q<sub>CL</sub></b> (kg/h)	0,39	0,7	0,7	0,8	1,3	1,5
R <sub>M.S.</sub> (%)	2,8	5,8	5,2	6,1	14,1	14,7
R <sub>P</sub> (%)	6,0	8,5	7,9	13,7	32,1	35,6
R <sub>L</sub> (%)	2,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,3
<b>Q<sub>PA</sub></b> (kg/h)	3,8	4,5	3,7	6,1	5,8	5,4
R <sub>M.S.</sub> (%)	6,6	8,8	7,6	11,2	10,4	13,7
R <sub>P</sub> (%)	14,3	21,6	18,6	23,4	17,7	24,5
R <sub>L</sub> (%)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>Q<sub>Em2</sub></b> (kg/h)	0,76	1,0	1,0	0,95	1,2	1,3
R <sub>M.S.</sub> (%)	13,0	17,6	14,9	8,3	20,8	19,6
R <sub>P</sub> (%)	3,9	6,21	5,4	4,7	6,9	7,0
R <sub>L</sub> (%)	25,6	24,9	21,4	n.d.	39,7	39,9

A ratios liquide/solide égaux, pour chaque type de graine introduite, les essais en présence de mucilages présentent des débits de sortie d'extrudâts proches de ceux obtenus sans mucilages (figure 71). Dans le cas du colza, le débit en extrudât augmente avec l'augmentation de la quantité de mucilages, et par conséquent le débit en filtrât diminue. L'augmentation de la concentration en mucilages a ainsi un effet néfaste sur la séparation liquide/solide dans le cas du colza.

De plus, l'effet lubrifiant des mucilages favorise un entraînement supérieur des particules solides par le filtre et donc une augmentation des débits en pied.

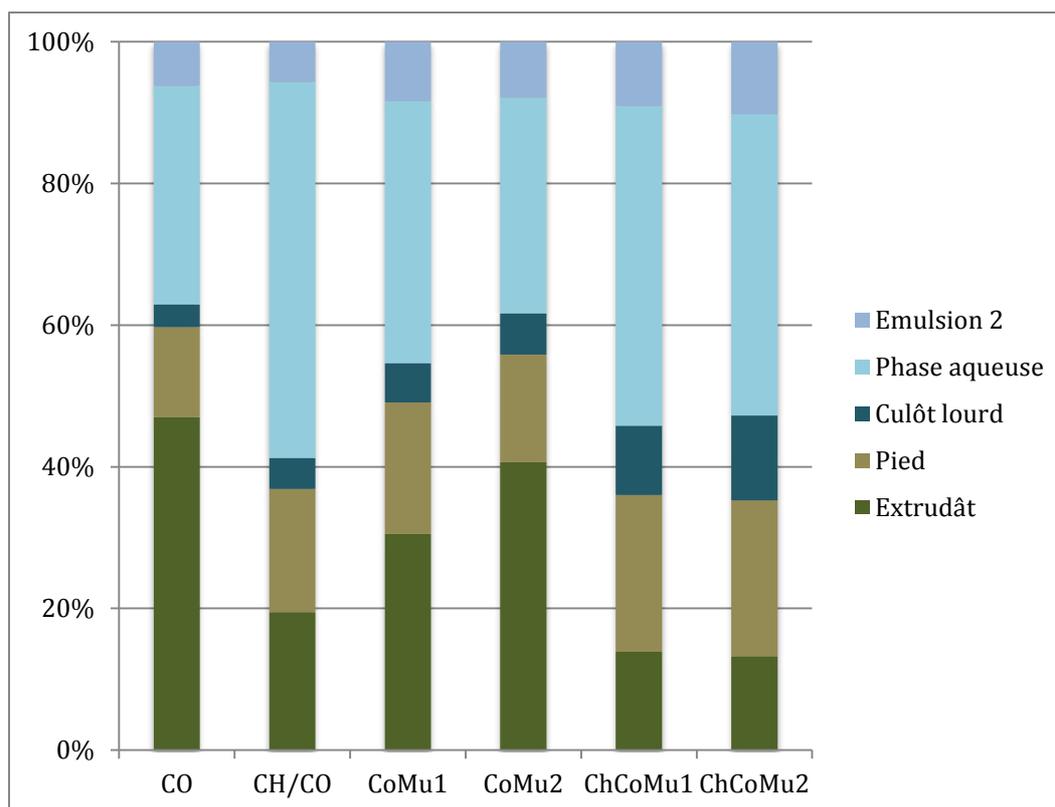


Figure 71 : Répartitions massiques brutes dans les différentes phases avec et sans introduction de mucilages

Comme lors du fractionnement des graines seules, la présence de chanvre améliore la séparation liquide/solide. L'effet du chanvre prévaut dans ce cas sur la concentration en mucilages.

Aussi bien pour le colza seul que pour le mélange chanvre/colza, l'addition de mucilages entraîne une légère augmentation de la teneur en émulsion 2 au sein du filtrat brut. Elle coïncide aussi avec une augmentation de la teneur en culot lourd qui peut être liée à une augmentation de la teneur en culot lourd qui peut être liée à une augmentation de la teneur en composés de hauts poids moléculaires dans l'émulsion 1, liée à l'ajout de mucilages.

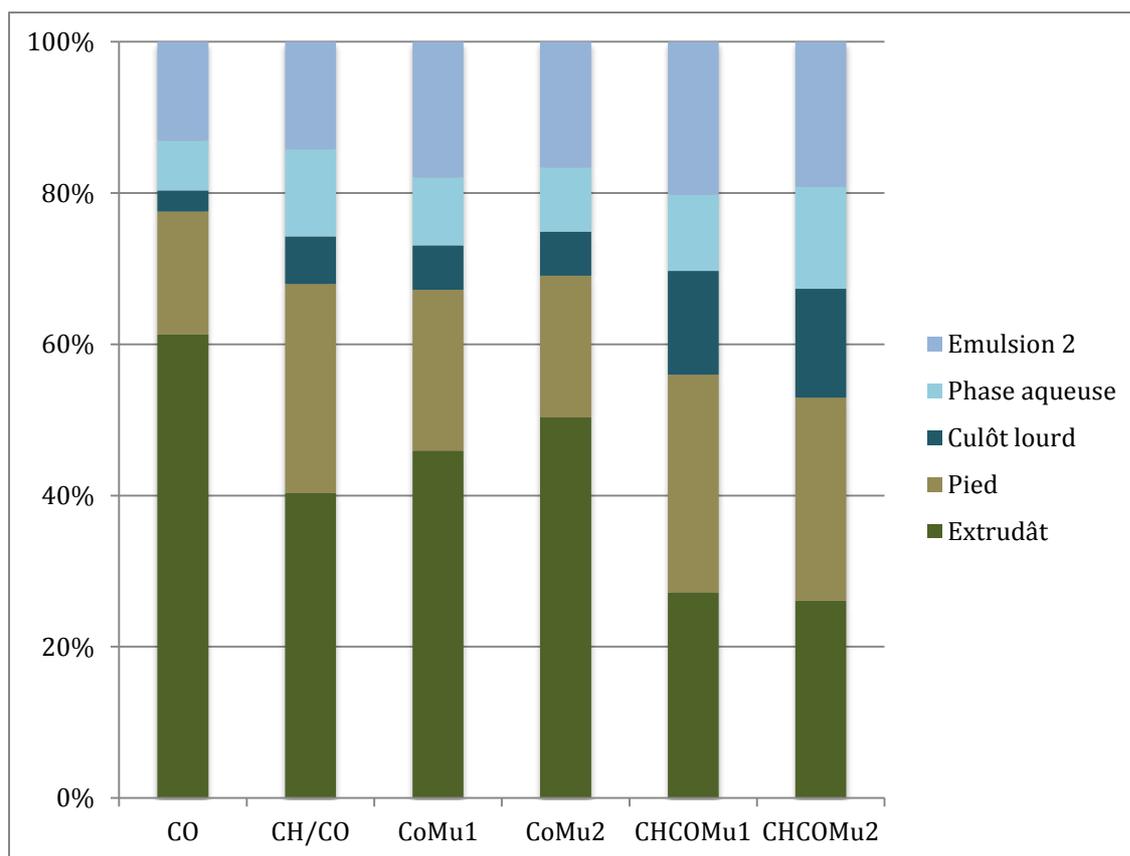


Figure 72 : Répartitions en matière sèche dans les différentes phases avec et sans introduction de mucilages

Aussi bien pour le colza seul que pour le mélange chanvre/colza, l'incorporation de mucilages diminue la quantité de matière sèche résiduelle au niveau de l'extrudât. Conformément à ce qui a été observé sur la figure 72, l'ajout de mucilages augmente la proportion d'émulsion 2, et également le rendement en matière sèche dans l'émulsion 2. Dans le cas du chanvre, la teneur en pied est également augmentée.

Le tableau 73 détaille les compositions des différentes phases obtenues pour le fractionnement du colza et du mélange chanvre/colza avec et sans mucilages.

Tableau 73 : Fractionnement thermo-mécano-chimique du colza, du chanvre et du mélange chanvre/colza en présence d'une solution aqueuse de mucilages : composition des phases obtenues lors du fractionnement des graines

		Colza	Colza + mucilages 1	Colza + mucilages 2	Chanvre/colza	Chanvre/ Colza + mucilages 1	Chanvre/ Colza + mucilages 2
		CO2	CoMu1	CoMu2	Ch/Co	ChCoMu1	ChCoMu2
	Profil de vis	7	6	6	7	6	6
	Débit de graines sec (kg/h)*	4,3	3,8	3,8	3,9	3,7	3,7

		Débit d'eau + mucilages (kg/h)	8	8,1	8,1	8	8,1	8,2	
		Ratio L/S	2	2,1	2,2	2	2,2	2,2	
		Vitesse de vis (RPM)	250	250	250	250	250	250	
		Couple	0	0	0	0	0	0	
		<b>Débit d'extrudât (kg/h)</b>	5,7	3,9	5,0	2,2	1,8	1,7	
		M.S. (%)	43,3	45,6	41,5	72,4	59,3	60,1	
		P (% MS)	18,6	20,4	20,4	16,8	17,3	17,2	
		L (% MS)	35,0	42,7	49,3	22,3	34,8	24,6	
		M.M. (% MS)	3,8	4,0	4,0	4,0	4,2	4,1	
Composition du filtrât		<b>Débit de pied (kg/h)</b>	1,6	2,3	1,9	2,1	2,8	2,8	
		% en masse du filtrât brut	23,8	28,4	26,1	21	27,0	26,7	
		M.S. (%)	42,4	34,8	34,2	45,6	39,3	36,8	
		P (% MS)	15,5	18,5	18,7	19,9	21,1	21,0	
		L (% MS)	54,6	45,2	45,2	40,7	34,8	29,0	
		M.M. (% MS)	2,6	3,4	3,7	3,7	4,2	4,5	
		<b>Débit d'émulsion 1 (kg/h)</b>	4,96	6,2	5,4	7,9	7,7	7,7	
		% en masse du filtrât brut	75,3	71,6	73,9	79,0	73,0	73,4	
		M.S. (%)	18,5	19,5	19,4	17,5	20,8	21,9	
		P (% MS)	20,3	19,1	19,7	31,1	20,2	14,9	
		L (% MS)	49,5	39,8	48,8	46,9	53,5	51,7	
		M.M. (% MS)	4,45	4,5	4,4	n.d.	6,1	6,4	
		Composition de l'émulsion 1	<b>Débit de culot lourd (kg/h)</b>	0,4	0,7	0,7	0,79	1,3	1,5
			% en masse du filtrât brut	6,0	8,4	10,0	7,9	11,9	14,5

M.S. (%)	29,0	32,0	27,5	40,4	42,5	36,3
P (% MS)	40,5	27,6	28,4	58,8	47,4	50,7
L (% MS)	40,6	25,3	n.d	31,3	n.d	n.d
M.M. (% MS)	6,6	8,4	8,0	4,1	11,2	11,0
<b>Débit de phase aqueuse (kg/h)</b>	3,8	4,5	3,7	6,1	5,8	5,4
% en masse du filtrât brut	57,7	54,6	52,6	61	55,0	51,3
M.S. (%)	7,1	7,4	7,7	6,3	6,8	9,5
P (% MS)	40,5	45,8	45,8	47,9	35,7	37,5
L (% MS)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
M.M. (% MS)	10,3	8,7	8,8	17,0	9,4	8,3
<b>Débit d'émulsion 2 (kg/h)</b>	0,76	1,0	0,96	0,95	1,2	1,3
% en masse du filtrât brut	11,6	12,50	13,6	9,5	11,1	12,3
M.S. (%)	69,7	69,7	58,4	70,9	67,5	56,7
P (% MS)	5,5	6,6	6,8	8,3	6,9	7,5
L (% MS)	76,7	55,0	55,2	81,2	66,7	71,2
M.M. (% MS)	1,0	1,1	1,1	n.d	1,1	1,2

La composition de l'émulsion 1 (figure 73) en protéines et en lipides évolue peu dans le cas du colza. Elle est toujours constituée à hauteur de 20% en protéines et 40-50% en lipides. L'addition du mucilage ne déplace ainsi pas la sélectivité du fractionnement. Dans le cas du chanvre/colza, la teneur en lipides augmente légèrement tandis que la teneur en protéines chute en présence de mucilages. Il semblerait alors que pour le chanvre/colza, les mucilages inhibent l'extraction des protéines.

Pour la composition de l'émulsion 2 (figure 74), les faibles teneurs en protéines sont conservées. Par contre, la teneur en lipides est inférieure ce qui laisse supposer que ces émulsions sont enrichies en saccharides et plus particulièrement en mucilages, ce qui était l'objectif de ces essais.

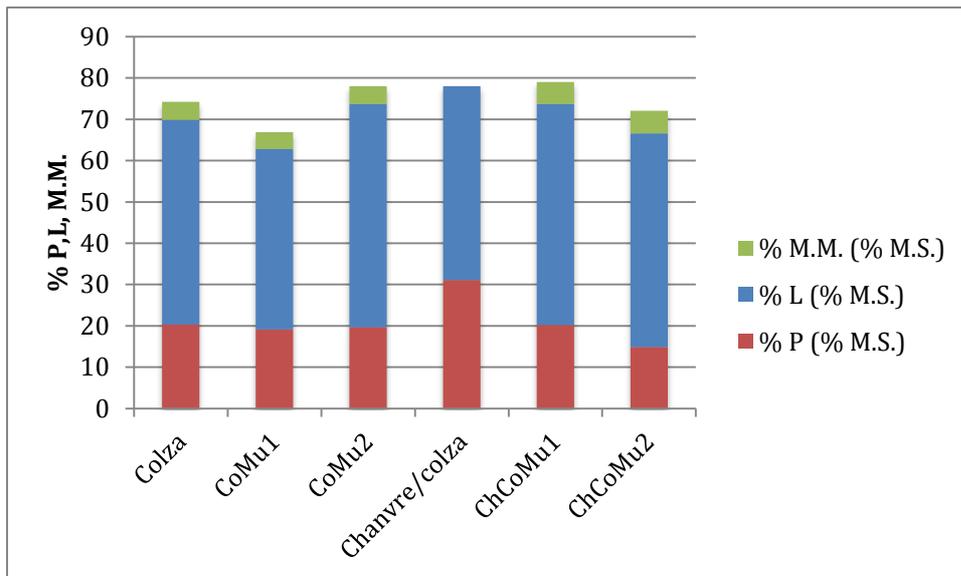


Figure 73 : Composition des émulsions 1 issues du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages

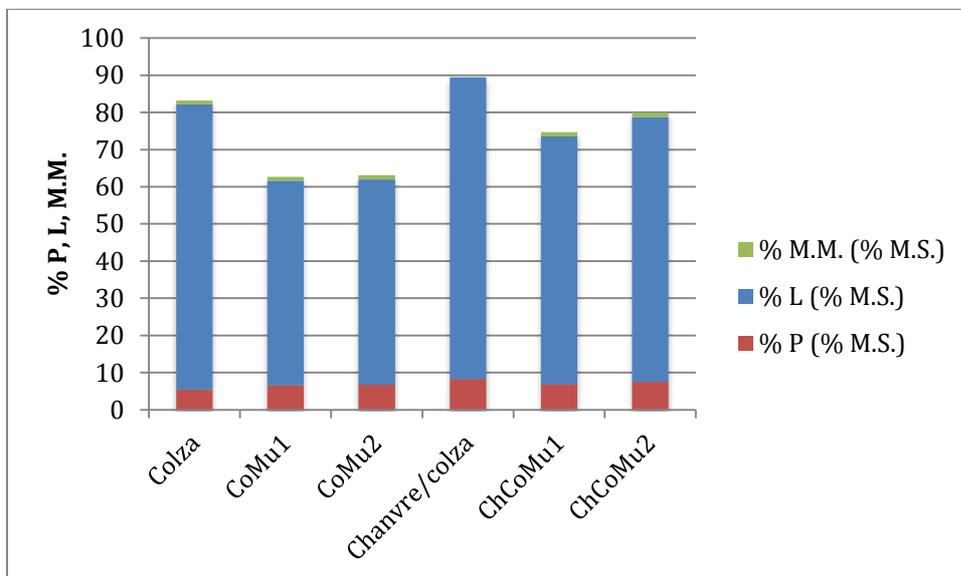


Figure 74 : Composition des émulsions 2 issues du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages

### III.6.4 Conclusion et avantages de l'incorporation de mucilages

Pour le colza ou le mélange chanvre/colza, la faisabilité de l'extraction TMC en extrudeur bi-vis en présence d'un actif incorporé dans la phase aqueuse extractante a été validée. Ce succès ouvre la voie à de nombreuses autres possibilités d'incorporations, en particulier d'actifs pour des applications cosmétiques.

Les débits en émulsions 1 sont équivalents à ceux obtenus sans mucilages, tandis que les débits en émulsion 2 sont améliorés.

Néanmoins, il est important de noter que les niveaux d'incorporation de mucilages atteints *ex situ* sont supérieurs à ceux accessibles en extrudeur bi-vis. Une trop grande

teneur en mucilages est néfaste au procédé de séparation solide/liquide dans l'extrudeur. Le point limite d'incorporation a d'ailleurs été atteint lors du deuxième essai sur le colza. La stabilité des émulsions 1 est améliorée par l'ajout de mucilages, ce point est discuté dans le chapitre suivant.

### III.7 Conclusion

Dans ce chapitre, le fractionnement aqueux ou fractionnement thermo-mécano-chimique (TMC) par extrusion bi-vis de différentes graines oléo-protéagineuses a été étudié. Les travaux ont été orientés vers la production d'émulsions. La polyvalence du procédé, développé sur un extrudeur bi-vis de type Clextral BC21 a pu être démontrée. Il a permis en effet de travailler à partir de 4 graines distinctes : le colza, le chanvre, le cardon, et le pastel. Des mélanges de graines ont également pu être introduits dans l'extrudeur, sans pour autant modifier les paramètres appliqués lors du fractionnement individuel des graines. Enfin, un actif bio-sourcé, ici des mucilages de lin a aussi pu être introduit lors du fractionnement aqueux, dans le but d'obtenir des fractions enrichies en actif et de stabiliser les émulsions produites.

Le procédé de fractionnement aqueux en réacteur TMC est un procédé continu, qui présente de nombreux avantages par rapport au procédé batch. Plus particulièrement, l'introduction des graines entières évite une étape de déstructuration physique des graines en amont de leur introduction dans le réacteur. De plus, la séparation liquide/solide se produit simultanément à la formation de l'émulsion et à son extraction par la présence d'un module de filtration au niveau de l'extrudeur. La température appliquée est de 50°C, afin de favoriser la déstructuration mécanique des graines, tout en évitant la dénaturation de l'huile végétale et des composés bioactifs, tels que les protéines et les sucres. Le ratio liquide solide employé est de 2, bien moindre que celui appliqué lors d'un fractionnement en réacteur batch (4). Le temps de séjour de la matière dans l'extrudeur est court, de l'ordre de quelques dizaines de secondes. Ces avantages permettent une intensification du procédé lors du passage du réacteur batch au réacteur-extrudeur bi-vis : limitation du nombre d'étapes unitaires, diminution de la consommation d'eau ou du solvant extractant, tout en améliorant les rendements de production des extraits. Ces résultats sont en accord avec les travaux de M. Faye sur la graine de Neem et de P. Evon sur la graine de tournesol.

Pratiquement, la condition à la validation de la faisabilité de l'essai était la sortie d'un solide déstructuré et riche en composés pariétaux, l'extrudât, et d'un liquide émulsifié, enrichi en huile et en composés hydrophiles, le filtrât, objet principal de nos travaux.

A sa sortie, le filtrât contient de fines particules solides en suspension, appelées pied, et correspondant à des résidus solides entraînés par l'émulsion par le module de filtration. Une première étape de séparation solide/liquide par filtration sur toile a donc été

nécessaire pour obtenir une première émulsion dénommée émulsion 1. Une fois centrifugée, cette dernière est constituée de trois phases :

- un culot lourd, riche en huile végétale (environ 30% M.S.) et en composés hydrophiles de haut poids moléculaire
- une phase hydrophile intermédiaire, dont la teneur en protéines peut aller jusqu'à 50% M.S. pour le colza. Ceci laisse entrevoir la possibilité de la valorisation seule de cette fraction par atomisation ou lyophilisation afin de proposer un extrait protéique sous forme de poudre.
- une phase hydrophobe de densité inférieure à celle de la phase aqueuse qui correspond à une émulsion très concentrée, appelée émulsion 2.

Lors du déroulement de ces travaux, la graine de colza a été employée comme substrat modèle, du fait de sa grande disponibilité, mais également de sa richesse en huile végétale (40% M.S.) et en protéines (20% M.S.). Les conditions opératoires ont été optimisées sur cette graine, dans le double objectif d'obtenir le rendement maximal en émulsions 1 et 2, et de produire des émulsions de la meilleure qualité possible en termes de stabilité. Pour ce faire, le profil de vis retenu était constitué de deux zones d'éléments de vis de type malaxeurs bilobes, afin de permettre la déstructuration des graines et l'expression de l'huile végétale hors de la structure fibreuse de la graine. L'introduction de l'eau, via une pompe, est effectuée en aval de ces deux zones, afin de former l'émulsion. Pour finir, une dernière zone de contrainte, constituée de vis de type contrefilets, permet l'accumulation de la matière et la création d'un bouchon dynamique qui est responsable de la séparation liquide/solide in situ. Ainsi, quatre zones distinctes sont formées au sein de l'extrudeur :

- une zone d'alimentation des graines entières
- une zone de broyage et de mélange permettant la déstructuration de la matière végétale et l'expression de l'huile
- une zone d'extraction liquide/solide et de formation de l'émulsion suite à l'introduction du solvant. L'effet mécanique induit par les vis permet d'intensifier la mise en contact entre l'huile extraite et l'eau et de favoriser l'émulsification et l'extraction des composés hydrophiles
- et une zone de séparation liquide/solide permettant l'écoulement du filtrât via le filtre et la sortie de l'extrudât.

Dans les meilleures conditions, un débit d'émulsion 1 de 4,96 kg/h et un débit d'émulsion 2 de 0,76 kg/h ont été obtenus, pour des débits respectifs d'entrée en graines et en eau de 4 kg/h et 8 kg/h.

Dans un second temps, le procédé de fractionnement aqueux en réacteur TMC a été étendu à d'autres graines : le chanvre, le cardon, et les graines de pastel non désiliquées. Si, pour le chanvre et le cardon, les conditions de fractionnement du colza ont pu être strictement transférées en termes de ratio liquide/solide et de profil, il n'en a pas été de même pour le pastel. La présence de siliques a rendu impossible toute séparation liquide/solide pour des ratios liquides/solides inférieurs à 4. Concernant le procédé de post-traitement appliqué au filtrât, les filtrâts de chanvre et de cardon ont subi les mêmes

étapes unitaires que le colza, ce qui s'est avéré impossible pour le pastel dont le filtrât a directement été centrifugé. Pour des débits d'entrée de 4kg/h en chanvre ou cardon, les débits en émulsion 2 sont faibles, respectivement 0,45 et 0,48 kg/h. Pour le pastel, des travaux sur des graines désiliquées auraient probablement permis d'obtenir des rendements en émulsions 2 intéressants puisque les compositions chimiques de ces deux graines sont proches.

Ensuite, des co-extrusions ont été mises en place afin de palier à d'éventuels problèmes d'approvisionnement en graines, mais également pour mettre en évidence des effets synergiques entre les graines. Comparativement au fractionnement du colza seul, la coextrusion d'un mélange chanvre/colza 50/50 a donné lieu à une amélioration de l'étape de séparation liquide/solide. Ce mélange a également donné lieu à des résultats positifs en termes de rendements et de stabilité d'émulsions proches de ceux obtenus lorsque le colza est employé seul.

Enfin, l'incorporation d'un actif, en l'occurrence les mucilages de graines de lin, s'est avérée efficace et faisable dans les conditions définies par les travaux préalables. Ces travaux ont permis d'atteindre le but attendu, à savoir d'améliorer la stabilité des émulsions 1. Ces dernières ont été mesurées, notamment par RMN à bas champs, et les résultats sont détaillés dans le chapitre suivant. Cela a également ouvert des perspectives pour l'introduction de nouvelles molécules qui permettraient par exemple, de conférer certaines propriétés spécifiques aux émulsions. Des actifs antioxydants ou conservateurs permettraient d'améliorer la stabilité microbiologique des extraits. Des molécules odorantes hydrophiles pourraient en outre permettre d'obtenir des fractions valorisables en cosmétique...

L'ensemble de ces travaux a donné lieu à un dépôt de brevet « procédé-produit », dont le titre est « procédé d'obtention d'émulsion stable à partir de graines entières oléoprotéagineuses, l'émulsion obtenue, et les compositions cosmétiques comprenant ladite émulsion », le 1<sup>er</sup> juin 2016. Le numéro de demande est le FR1654988.

Le tableau 74 récapitule les résultats obtenus en termes de rendements massiques. Il est notable que les meilleurs rendements d'obtention en émulsion 2, caractérisés ici par le pourcentage massique de sortie d'extrusion, ont été obtenus pour le colza. L'ajout de chanvre au colza a permis d'améliorer la séparation liquide/solide, et par la même d'augmenter les rendements de sorties en filtrât et donc en émulsion 1.

**Tableau 74 : Pourcentages massiques d'entrée de graines et d'eau et de sorties d'émulsions 1 et 2 obtenues pour les différents essais appliqués en réacteur TMC**

	% massiques			
	Entrée procédé		Sortie procédé	
	Graines	Eau	Emulsion 1	Emulsion 2
Colza	34	66	39	6
Chanvre	34	66	72	4

Cardon	34	66	69	4
Pastel	20	80	52	/
Chanvre/colza	34	66	65	8
Chanvre/cardon	34	66	59	3
Colza/cardon	34	66	66	2
Colza + mucilages 1	34	66	48	8
Colza + mucilages 2	34	66	43	8
Chanvre/colza + mucilages 1	34	66	64	10
Chanvre/colza + mucilages 2	34	66	64	10

Parmi les perspectives, le procédé pourrait être étendu à des matières végétales de composition proche de celle de la graine de colza, notamment la graine de pastel désiliquée. Ces deux graines font d'ailleurs partie de la même famille, celle des Brassicaceae. A cette fin, il sera nécessaire d'adapter les conditions opératoires pour chaque nouvelle graine testée puisque nous avons pu, lors de ces essais, démontrer à la fois la faisabilité globale du transfert mais aussi sa nécessité d'adaptation à la matière.

Il est également possible d'envisager d'effectuer des transferts d'échelle vers des extrudeurs de plus grande taille, afin d'augmenter les débits d'obtention en émulsions.

Concernant les extrudats, leur valorisation représenterait une perspective envisageable. Les différents essais réalisés, en particulier sur le colza, ont fourni une gamme de solides présentant des teneurs en humidité et des états de déstructuration variés. Les effets de plastification observés dans certains cas laissent envisager des valorisations en tant que matériaux thermo-moulables.

# Chapitre IV : Caractérisations physico-chimiques des émulsions et applications dans des formulations cosmétiques



## IV. Caractérisations physico-chimiques des émulsions et applications dans des formulations cosmétiques

### IV.1 Introduction et contexte

Le chapitre III est consacré à la description du procédé continu mis en œuvre pour l'obtention *in situ* d'émulsions, à partir des graines de colza, de chanvre, de cardon et de pastel. Les meilleurs résultats en termes de rendements et de qualité d'émulsions ayant été obtenus à partir des graines de colza, et du mélange de graines de chanvre et de colza, ce sont ces émulsions que nous avons choisies de caractériser plus spécifiquement. Les essais d'incorporation de mucilages ayant été fructueux lors du fractionnement aqueux continu du colza et du mélange chanvre/colza, la caractérisation de ces dernières émulsions est également décrite ici.

Une première partie de ce chapitre est consacrée aux caractérisations chimiques des émulsions, avant d'aborder une partie dédiée à l'étude de leur stabilité, par microscopie optique, DSC et RMN à bas champs. Une dernière partie est dédiée à des formulations de produits finis cosmétiques, obtenus à partir des émulsions de colza.

### IV.2 Caractérisation des émulsions

Les émulsions caractérisées dans ce chapitre ont été obtenues par fractionnement aqueux des graines en extrusion bi-vis, suivant le protocole décrit dans le chapitre III. Pour rappel, les émulsions « 1 » correspondent au filtrât, ayant subi une étape supplémentaire de filtration destinée à le débarrasser de son pied. Les émulsions « 2 » correspondent à des versions concentrées des émulsions 1, elles sont obtenues par centrifugation de celles-ci. Les émulsions 1 correspondent à des émulsions légères et très aqueuses, tandis que les émulsions 2 sont grasses et denses.

Les compositions des émulsions (teneur en matière sèche, en protéines, en lipides et en matière minérale) ont été réalisées dans la semaine suivant leur formulation.

Pour rappel, les graines de colza et de chanvre présentent les caractérisations suivantes, décrites dans le tableau 75 ci-après.

Tableau 75 : Composition des graines de Colza, de Chanvre et du mélange Chanvre/Colza

	Colza	Chanvre	Mélange Chanvre/Colza
Teneur en matière sèche (%)	93,40 ± 0,50	93,73 ± 0,43	93,56
Teneur en protéines (% M.S.)	18,72 ± 0,02	26,00 ± 1,49	22,4

Teneur en lipides (% M.S.)	39,4 ± 0,5	36,57 ± 0,33	37,9
Teneur en fibres (% M.S.)	48,8	47,2	48
Teneur en matière minérale (% M.S.)	3,67 ± 0,08	3,80 ± 0,01	3,7

Les manipulations de suivi de stabilité des émulsions (microscopie optique, DSC) ont été effectuées sur plusieurs semaines. Les émulsions ont été stockées à +4°C entre les analyses.

#### IV.2.1 Composition des émulsions sans ajout de mucilages

##### IV.2.1.1 Caractérisation des Emulsions « 1 »

Les émulsions 1 correspondent au filtrât débarrassé de son pied par filtration. Il s'agit donc d'une phase aqueuse majoritaire, enrichie lors du procédé de fractionnement aqueux par extrusion bi-vis en huiles et en composés bioactifs extraits des graines utilisées.

Le tableau 76 ci-après détaille la composition des émulsions 1 issues du fractionnement aqueux des graines de colza et du mélange chanvre/colza.

**Tableau 76 : Composition des émulsions 1 de colza et de chanvre/colza**

		Colza	Chanvre/Colza
Teneur en humidité (%)		81,50	82,5
Teneur en matière sèche (%)		18,50	17,5
Composition de la matière sèche (% M.S.)	Teneur en protéines	20,3	31,1
	Teneur en lipides	49,5	46,9
	Teneur en matière minérale	4,5	7,5
	Autres composés (sucres, pectines,...)	25,7	14,5

Composition ramenée à l'émulsion brute :

**Tableau 77 : Composition des émulsions 1 ramenées à la matière brute de l'émulsion**

	Colza	Chanvre/Colza
Teneur en humidité (%)	81,5	82,5
Teneur en protéines dans l'émulsion brute (%)	3,8	5,4
Teneur en lipides dans l'émulsion brute (%)	9,2	8,7
Teneur en matière minérale dans l'émulsion brute (%)	0,8	1,3
Teneur en autres composés dans l'émulsion brute (%)	2,9	2,5

Ces émulsions sont majoritairement composées d'eau : 81,5% pour l'émulsion issue du fractionnement des graines de colza, et 82,5% pour les émulsions issues du fractionnement du mélange chanvre/colza. La différence majeure dans leur composition se situe au niveau de la teneur en protéines, de l'ordre de 31,1% pour l'émulsion du mélange chanvre/colza contre 20,3% pour l'émulsion issue du colza seul.

Les graines de chanvre étant plus riches en protéines (26% M.S.) que les graines de colza (18,72 % M.S.), il n'est pas étonnant que les émulsions du mélange chanvre/colza soient plus riches en protéines que les émulsions issues des graines de colza seules.

La teneur en lipides des deux émulsions est comparable.

En outre, la teneur en composés « non identifiés » de l'émulsion de colza est supérieure à celle du mélange chanvre/colza. Ces composés peuvent être des sucres ou des pectines, mais également des lipides, qui auraient pu ne pas être extraits lors des extractions par solvants appliquées aux émulsions.

Les teneurs en huile et en eau de ces émulsions nous amènent donc à conclure qu'il s'agit d'émulsions huile dans eau. Cette hypothèse a été confirmée par les observations en microscopie optique, dans lesquelles ont été observées des gouttelettes d'huile dispersées au sein d'une phase aqueuse. Ces résultats sont présentés plus loin dans le chapitre.

#### IV.2.1.2 Caractérisation des Emulsions « 2 »

Les émulsions « 2 » sont obtenues par centrifugation des émulsions 1 précédemment décrites. Leur caractérisation est détaillée dans le tableau 78 ci-après.

**Tableau 78 : Composition des émulsions 2 de colza et de chanvre/colza**

		Colza	Chanvre/Colza
Teneur en humidité (%)		30,3	29,2
Teneur en matière sèche (%)		69,7	70,9
Composition de la matière sèche (%)	Teneur en protéines	5,5	8,3
	Teneur en lipides	76,7	81,3
	Teneur en matière minérale	1,0	0,8
	Autres composés (sucres, pectines,...)	16,7	9,7

**Tableau 79 : Composition des émulsions 2 de colza et de chanvre/colza ramenées à la matière brute de l'émulsion**

	Colza	Chanvre/Colza
Teneur en humidité (%)	30,3	29,2
Teneur en protéines dans l'émulsion brute (%)	3,9	5,9
Teneur en lipides dans l'émulsion brute (%)	53,5	57,6
Teneur en matière minérale dans l'émulsion brute (%)	0,7	0,5

Teneur en autres composés dans l'émulsion brute (%)	11,7	6,9
---	------	-----

Ces émulsions sont des émulsions huile dans eau très concentrées, contenant plus de 50% de lipides. La faible teneur en eau, de l'ordre de 30% pour chacune, peut nous laisser penser qu'il s'agit d'émulsions eau dans huile. Cependant, les observations effectuées en microscopie optique montrent de très nombreuses gouttelettes, assez resserrées, dispersées au sein d'une phase. De plus, la granulométrie de ces gouttelettes étant équivalentes à celles des émulsions 1, cela permet de confirmer que l'émulsion 2 est une version concentrée de l'émulsion 1.

En terme de composition, elles présentent des teneurs en matière sèche et en humidité équivalentes. La composition de la matière diffère entre le colza et le mélange chanvre/colza au niveau des teneurs en protéines, légèrement supérieures dans le cas du chanvre/colza (8,3% M.S. contre 5,5% M.S. pour le colza), et des teneurs en lipides, également supérieures dans le cas du chanvre/colza (82,5% contre 76,7% pour le colza). La teneur plus élevée en protéines dans l'émulsion chanvre/colza est liée au fait que le mélange chanvre/colza présente une teneur en protéines supérieure à celle des graines de colza seules. Cependant, cela n'est pas vérifié pour les lipides : les graines de colza seules sont plus riches en lipide que le mélange chanvre/colza, mais l'émulsion 1 de chanvre/colza est plus riche en lipides que l'émulsion 1 de colza. Cela peut être expliqué par le fait que l'ajout de graines de chanvre entraîne un effet synergique sur l'extraction des lipides, qui est alors plus efficace. Cela est également envisageable pour les protéines. Comme cela a été démontré dans le chapitre précédent, l'ajout de chanvre entraîne une amélioration de la séparation liquide/solide, par rapport aux essais où la graine de colza était traitée seule. L'amélioration de la séparation liquide/solide est liée à un meilleur pressage. Il est alors envisageable que le meilleur pressage provoque un meilleur entrainement des lipides au sein du filtrât.

Leur plus grande stabilité comparée à celle des émulsions 1 est liée d'une part au fait qu'elles sont beaucoup plus concentrées en lipides. L'eau est présente en moins grande quantité et a donc moins de risques de provoquer une déstabilisation de l'émulsion. Il est également envisageable que les protéines qui restent dans l'émulsion 2 lors de la centrifugation de l'émulsion 1 soient des protéines présentes à l'interface entre l'eau et l'huile, résistant à la centrifugation et présentant des propriétés émulsifiantes efficaces.

#### IV.2.1.3 Comparaison des émulsions

La figure 75 ci-après compare les compositions des émulsions 1 et 2, issues du fractionnement aqueux du colza seul ou du mélange chanvre/colza.

Aussi bien pour le colza que pour le mélange chanvre/colza, la centrifugation de l'émulsion 1 permettant d'obtenir l'émulsion 2 provoque une multiplication par un facteur 3,5 de la concentration en matière sèche.

Concernant la teneur en protéines, elle est divisée par 3,7 aussi bien lors de la centrifugation de l'émulsion 1 du colza, que lors de la centrifugation de l'émulsion 1 issue du mélange chanvre/colza.

En revanche, les teneurs en lipides sont multipliées par 5,1 dans le cas du colza, et par 6,3 dans le cas du mélange chanvre/colza.

Ainsi, la centrifugation appliquée à l'émulsion 1 entraîne une concentration des protéines dans la phase aqueuse, seules les protéines contribuant à la stabilisation de l'émulsion 2 sont concentrées au sein de cette dernière.

Cette même centrifugation consiste donc en une concentration de l'huile, de densité inférieure à celle de l'eau, au-dessus de la phase aqueuse. Elle est accompagnée de protéines situées à l'interface entre l'huile et l'eau, probablement du type albumines. En effet, ce sont les protéines qui sont réputées pour avoir les meilleures propriétés émulsifiantes, et ce sont également les protéines majoritairement dosées lors du dosage d'Osborne du colza.

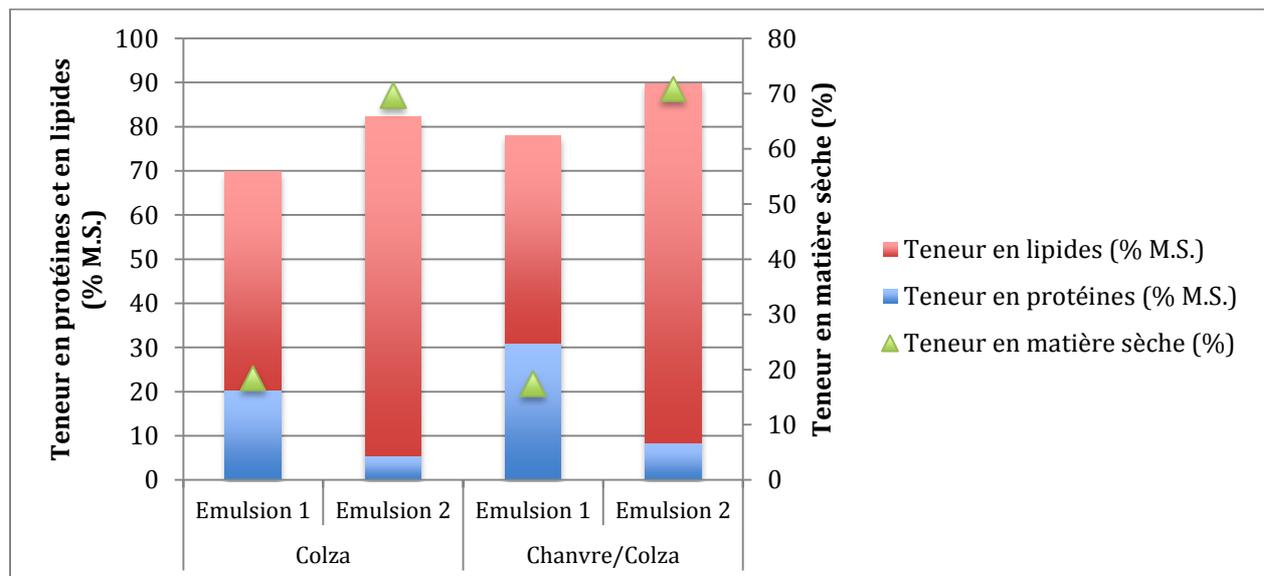


Figure 75 : Comparaison des émulsions 1 et 2

## IV.2.2 Composition des émulsions avec ajout de mucilages

### IV.2.2.1 Introduction

Les mucilages ont été produits par macération aqueuse à chaud des graines de lin. Le liquide aqueux enrichi en mucilages obtenu a ensuite été filtré, concentré et lyophilisé. Le protocole d'obtention des mucilages est décrit dans le chapitre II.

La description détaillée des essais d'incorporation de mucilages en extrusion bi-vis est décrite dans le chapitre III. Les mucilages lyophilisés sont dilués dans de l'eau, et c'est ce

mélange d'eau et de mucilages qui est utilisé pour le fractionnement aqueux en extrusion bi-vis des graines de colza et du mélange chanvre/colza.

L'objectif de cette manipulation est de démontrer d'une part dans de faisabilité d'incorporation *in situ* d'actifs au sein des émulsions obtenues, mais également l'amélioration *in situ* de la stabilité des émulsions.

Aussi bien pour le colza seul que pour le mélange chanvre/colza, les mucilages ont été introduits à deux pourcentages différents dans la phase aqueuse.

Comme lors du fractionnement aqueux sans mucilages du colza et du mélange chanvre/colza, deux types d'émulsions ont été obtenues : les émulsions 1 et les émulsions 2.

Pour l'essai « colza + mucilages 1 », l'objectif était d'introduire 1% de mucilages dans l'émulsion 1. Pour ce faire, 0,059kg/h de mucilages ont été introduits dans le réacteur bi-vis, ce qui correspond à une concentration de 0,74% dans la phase aqueuse extractante.

Pour l'essai « colza + mucilages 2 », l'objectif était d'introduire 2% de mucilages dans la phase aqueuse. Pour ce faire, 0,118 kg/h de mucilages ont été introduits, ce qui correspond à une concentration de 1,48% dans la phase aqueuse extractante du réacteur.

#### **IV.2.2.2 Caractérisation des Emulsions « 1 » en présence de mucilages**

Les mucilages ont été produits par macération aqueuse à chaud des graines de lin. La phase aqueuse enrichie en mucilages obtenue a ensuite été filtrée, concentrée et lyophilisée. Le protocole d'obtention des mucilages est décrit dans le chapitre II.

La description détaillée des essais d'incorporation de mucilages en extrusion bi-vis est décrite dans le chapitre III. Les mucilages lyophilisés sont dilués dans de l'eau, et c'est ce mélange d'eau et de mucilages qui est utilisé pour le fractionnement aqueux en extrusion bi-vis des graines de colza et du mélange chanvre/colza. L'intérêt de cette manipulation résidait d'une part dans un test de faisabilité d'incorporation *in situ* d'actifs au sein des émulsions obtenues, mais également dans le fait d'améliorer *in situ* la stabilité des émulsions.

Aussi bien pour le colza seul que pour le mélange chanvre/colza, les mucilages ont été introduits à deux pourcentages différents dans la phase aqueuse.

Comme lors du fractionnement aqueux sans mucilages du colza et du mélange chanvre/colza, deux types d'émulsions ont été obtenues : les émulsions 1 et les émulsions 2.

Pour l'essai « colza + mucilages 1 », l'objectif était d'introduire 1% de mucilages dans l'émulsion 1. Pour ce faire, 0,059kg/h de mucilages sont introduits, ce qui correspond à une concentration de 0,74% dans la phase aqueuse extractante. Pour l'essai colza + mucilages 2, l'objectif était d'introduire 2% de mucilages dans la phase aqueuse. Pour ce faire, 0,118 kg/h de mucilages sont introduits, ce qui correspond à une concentration de 1,48% dans la phase aqueuse.

Le tableau 80 ci-après décrit la composition des émulsions 1 de colza obtenues lors de l'ajout de mucilages dans la phase aqueuse extractante.

**Tableau 80 : Composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages**

		Colza + mucilages 1	Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)		80,5	80,6
Teneur en matière sèche (%)		19,5	19,4
Composition de la matière sèche (%)	Teneur en protéines	19,1	19,7
	Teneur en lipides	39,8	48,8
	Teneur en matière minérale	4,5	4,4
	Autres composés (sucres, pectines,...)	36,6	27,1

**Tableau 81 : Composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion**

	Colza + mucilages 1	Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)	80,5	80,6
Teneur en protéines dans l'émulsion brute (%)	3,7	3,8
Teneur en lipides dans l'émulsion brute (%)	7,8	9,5
Teneur en matière minérale dans l'émulsion brute (%)	0,9	0,9
Teneur en autres composés dans l'émulsion brute (%)	7,1	5,2

Si l'on compare la composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages à celles sans ajout de mucilages, on peut constater que la teneur en matière sèche de l'émulsion est légèrement augmentée avec l'ajout de mucilages : sans mucilages, la teneur en matière sèche est de l'ordre de 18,50%, et elle passe à 19,48 et 19,40% lors des ajouts de mucilages. Cependant, la différence est faible, et pas significative.

Si l'on compare les compositions de la matière sèche, les teneurs en protéines sont équivalentes, avec ou sans mucilages. Concernant la teneur en lipides, elle est de l'ordre de 49,5% de la matière sèche sans mucilages. Lors du premier essai avec mucilages, elle passe à 39,8, puis remonte à 48,8% de la matière sèche lors du deuxième essai. Il semblerait qu'à des faibles concentrations les mucilages présents dans la solution aqueuse limitent l'extraction de l'huile lors du fractionnement en extrusion bi-vis.

Du fait de la plus faible concentration en lipides dans l'émulsion 1 lors de l'ajout de mucilages, la teneur en composés non identifiés est nettement plus élevée dans ce cas-là : sans mucilages, elle est de l'ordre de 26%, tandis qu'avec mucilages elle est de l'ordre de 37% puis 27%. Si l'on compare les valeurs des concentrations résiduelles en lipides dans les extrudats avec et sans mucilages (chap III), nous observons une concentrations résiduelle de 55,0 % M.S. pour le colza sans mucilages, et 49,5 et 57,1 % M.S. lors de l'ajout respectivement de 0,74 et 1,48% de mucilages respectivement dans la phase aqueuse.

L'extraction des lipides semble être limitée par la présence des mucilages dans la phase extractante.

Pour l'essai chanvre/colza + mucilages 1, l'objectif était d'introduire 1% de mucilages dans l'émulsion 1. Pour ce faire, 0,077 kg/h de mucilages sont introduits, ce qui correspond à une concentration de 0,96% dans la phase aqueuse extractante. Pour l'essai chanvre/colza + mucilages 2, l'objectif était d'introduire 2% de mucilages dans la phase aqueuse. Pour ce faire, 0,154 kg/h de mucilages sont introduits, ce qui correspond à une concentration de 1,93% dans la phase aqueuse.

**Tableau 82 : Composition des émulsions 1 de chanvre/colza avec ajout de mucilages**

		Chanvre/Colza + mucilages 1	Chanvre/Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)		79,2	78,1
Teneur en matière sèche (%)		20,8	21,9
Composition de la matière sèche (%)	Teneur en protéines	20,2	14,9
	Teneur en lipides	53,5	51,7
	Teneur en matière minérale	6,1	6,4
	Autres composés (sucres, pectines,...)	20,2	27,0

**Tableau 83 : Composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion**

	Chanvre/Colza + mucilages 1	Chanvre/Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)	79,2	78,1
Teneur en protéines dans l'émulsion brute (%)	4,2	3,3
Teneur en lipides dans l'émulsion brute (%)	11,1	11,3
Teneur en matière minérale dans l'émulsion brute (%)	1,3	1,4
Teneur en autres composés dans l'émulsion brute (%)	4,2	5,9

Comme pour les émulsions 1 de colza, la teneur en matière sèche est augmentée dans les émulsions 1 de chanvre/colza lors de l'ajout de mucilages dans la solution d'extraction aqueuse. L'augmentation est ici plus importante que dans le cas du colza. La teneur en matière sèche de l'émulsion 1 sans mucilages est de l'ordre de 17,51%, et passe à 20,8 et 21,9% lors de l'ajout de mucilages.

La teneur en protéines dans la matière sèche est diminuée, elle passe de 31,6% sans mucilages à 20,2% et 14,9% pour les émulsions avec mucilages. La teneur en lipides est augmentée de 4 à 6% lors de l'ajout de mucilages. La teneur en composés non identifiés est également très diminuée. La présence des mucilages semble diminuer la capacité d'extraction aqueuse en protéines.

Les teneurs en sucres libres des émulsions 1 sans et avec ajout de mucilages ont été mesurées afin d'évaluer l'augmentation de la teneur en sucres dans l'émulsion 1 liée à l'ajout de mucilages.

**Tableau 84 : Concentration en sucres libres dans les émulsions 1 avec et sans mucilages**

Concentration (mg/L)	Colza	Colza + mucilages	Chanvre/colza	Chanvre/Colza + mucilages
Arabinose	226,4 ± 15,1	196,4 ± 3,6	299,9 ± 3,5	197,8 ± 1,8
Galactose	430,8 ± 55,8	741,3 ± 3,6	186,0 ± 2,1	531,9 ± 17,0
Glucose	444,1 ± 39,8	785,0 ± 6,2	213,4 ± 9,4	259,9 ± 11,0
Xylose	231,9 ± 5,6	262,9 ± 4,2	265,6 ± 17,4	231,5 ± 10,0
Total	1333,1 ± 116,2	1985,5 ± 18,5	964,8 ± 6,6	1221,1 ± 39,8

Pour rappel, les mucilages lyophilisés étaient dilués dans l'eau, et injectés sous forme liquide par la pompe, reliée à l'extrudeur bi-vis au niveau du module 5. Le protocole détaillé de la manipulation est décrit au chapitre III.3.

Avant l'ajout de mucilages, l'émulsion 1 de Colza était plus riche en sucres libres (1,3 g/L) que l'émulsion 1 de chanvre/colza (0,96 g/L). Cela est lié à la composition initiale des graines et à la disponibilité des sucres et autres composés hydrosolubles de la graine, les graines de colza étant plus riche en composés hydrosolubles que les graines de chanvre. Dans le cas du fractionnement aqueux des graines de colza, l'ajout de mucilages a permis d'augmenter la teneur en sucres libres totaux de l'émulsion 1 de 48,9%. Pour le mélange chanvre/colza, l'ajout de mucilages permet d'augmenter la teneur en sucres libres totaux de l'ordre de 26%.

Dans les deux cas, ce sont essentiellement le galactose et le glucose qui voient leurs teneurs augmenter lors de l'ajout de mucilages. Pour rappel, la fraction mucilagineuse caractérisée dans le chapitre II, paragraphe II.4.1.3, est composée des sucres suivants :

**Tableau 85 : Composition des sucres de la fraction mucilagineuse**

Sucre simple	% du total des sucres totaux
Arabinose	13,8
Rhamnose	5,4
Galactose	22,5
Glucose	20,9
Xylose	37,5

Au vu de la composition des mucilages, et en particulier du fait que le xylose semble y être majoritaire, il aurait été logique que le taux de xylose augmente le plus au sein des émulsions 1 lors de l'ajout de mucilages. Ce n'est cependant pas le cas. Le xylose semble présenter une accessibilité moindre par rapport aux autres sucres lors du fractionnement aqueux et de la mise en contact avec les graines.

En revanche, les sucres dont les taux augmentent le plus lors de l'ajout de mucilages sont le galactose et le glucose. Cela est cohérent dans la mesure où ils sont les deux autres sucres majoritaires.

### IV.2.2.3 Caractérisation des Emulsions « 2 » en présence de mucilages

Les émulsions 2 obtenues lorsque les mucilages lyophilisés ont été mélangés à la phase aqueuse extractante présentent les compositions détaillées dans les tableaux 86 à 88 ci-dessous.

**Tableau 86 : Composition des émulsions 2 de colza avec ajout de mucilages**

		Colza + mucilages 1	Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)		35,1	41,6
Teneur en matière sèche (%)		69,7	58,4
Composition de la matière sèche (%)	Teneur en protéines	6,6	6,8
	Teneur en lipides	55,0	48,9
	Teneur en matière minérale	1,1	1,1
	Autres composés (sucres, pectines,...)	37,3	43,2

**Tableau 87 : Composition des émulsions 2 de colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion**

	Colza + mucilages 1	Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)	35,1	51,6
Teneur en protéines dans l'émulsion brute (%)	4,2	3,3
Teneur en lipides dans l'émulsion brute (%)	11,1	11,3
Teneur en matière minérale dans l'émulsion brute (%)	1,3	1,4
Teneur en autres composés dans l'émulsion brute (%)	4,2	5,9

**Tableau 88 : Composition des émulsions 2 de chanvre/colza avec ajout de mucilages**

		Chanvre/Colza+ mucilages 1	Chanvre/Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)		32,5	43,3
Teneur en matière sèche (%)		67,6	56,7
Composition de la matière sèche (%)	Teneur en protéines	6,9	7,5
	Teneur en lipides	66,7	71,2
	Teneur en matière minérale	1,0	1,2
	Autres composés (sucres, pectines...)	25,3	20,1

**Tableau 89 : Composition des émulsions 2 de chanvre/colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion**

	Chanvre/Colza + mucilages 1	Chanvre/Colza + mucilages 2
Teneur en humidité (%)	32,5	43,3

Teneur en protéines dans l'émulsion brute (%)	4,7	4,3
Teneur en lipides dans l'émulsion brute (%)	45,1	40,4
Teneur en matière minérale dans l'émulsion brute (%)	0,7	0,7
Teneur en autres composés dans l'émulsion brute (%)	17	11,3

Les émulsions de colza et de chanvre/colza les moins concentrées en mucilages (« mucilages 1 ») présentent des teneurs en matière sèche comparables à celles des émulsions 2 sans mucilages. Les émulsions les plus concentrées en mucilages voient leurs teneurs en matière sèche diminuer. Ce phénomène n'était cependant pas observé dans le cas des émulsions 1. Ces résultats montrent que l'augmentation de la concentration en mucilages augmente la résistance de l'émulsion 1 à la centrifugation, et diminue ainsi non seulement les rendements en émulsions 2, mais également leur concentration. Les teneurs en lipides et en protéines de l'émulsion 2 sont plus faibles lors de l'extraction en présence de mucilages.

L'ajout de mucilages permet d'augmenter la stabilité des émulsions 1.

#### IV.2.2.4 Comparaison des émulsions « 1 » et « 2 »

La figure 76 ci-après synthétise les compositions des 8 émulsions obtenues lors du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages. Les teneurs en matière sèche sont équivalentes pour les émulsions 1 quelle que soit la graine ou le mélange de graines traitées, et quelle que soit la teneur en mucilages incorporée. Dans le cas des émulsions 2, la teneur en matière sèche est supérieure aussi bien pour le colza seul que pour le mélange chanvre/colza lors du premier essai avec les mucilages. Il semblerait donc que l'augmentation de la concentration en mucilages entraîne une diminution de la teneur en matière sèche des émulsions 2.

Les teneurs en protéines sont équivalentes dans les deux émulsions 1 issues du fractionnement aqueux du colza en présence des deux concentrations de mucilages, et elles sont divisées par 3 dans les émulsions 2 par rapport aux émulsions 1.

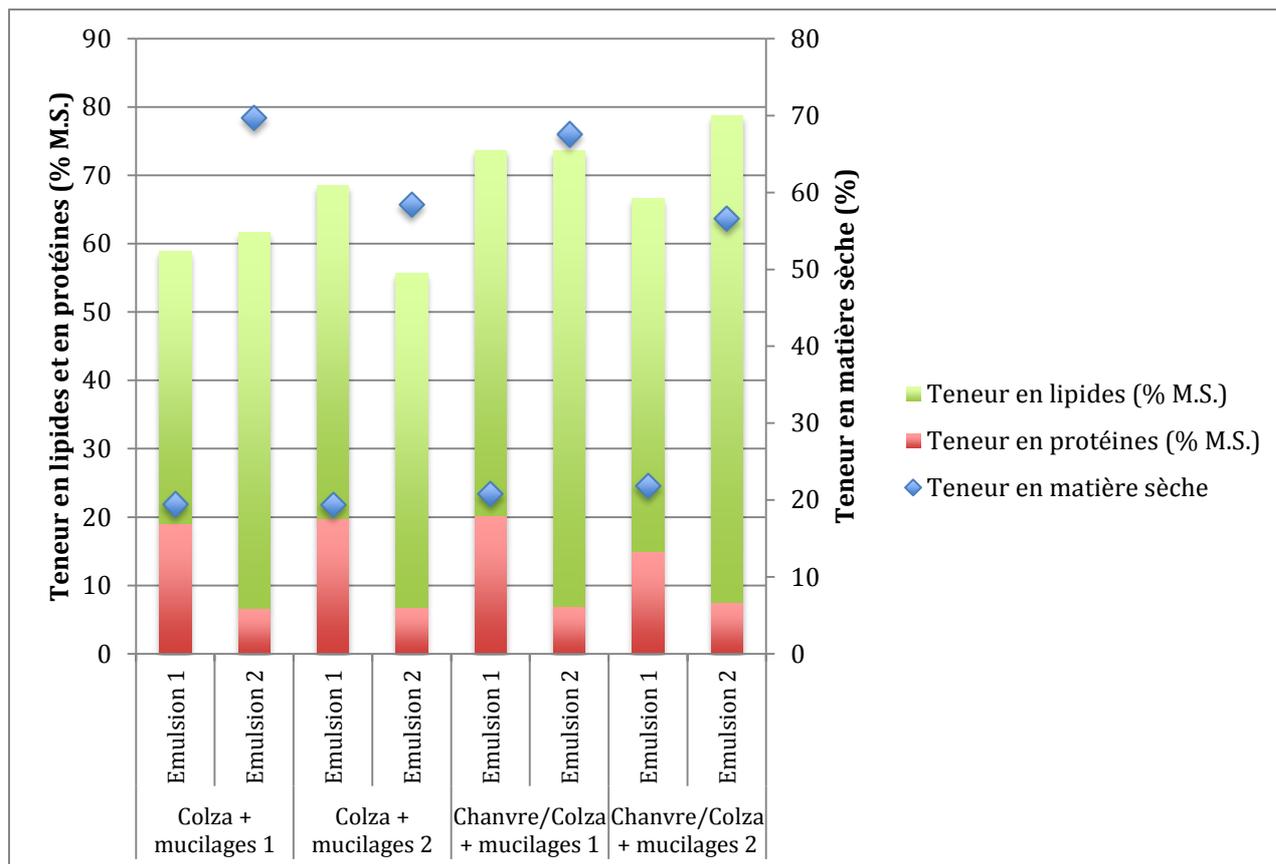


Figure 76 : Composition des émulsions 1 et 2 issues du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages

#### IV.2.3 Etude des émulsions par microscopie optique

Les analyses de microscopie optique avaient pour objectifs :

- D'estimer le diamètre moyen des gouttelettes
- De visualiser d'éventuels phénomènes de coalescence
- De juger de la stabilité et de la qualité des émulsions

Le tableau ci dessous répertorie les diamètres de gouttelettes mesurés au cours des 11 jours suivant la production des émulsions. Les moyennes sont calculées à partir de la mesure du diamètre de 100 gouttelettes. Les mesures sont effectuées en microscopie optique, en grossissement X40.

La figure 77 ci-après correspond au suivi en microscopie optique du diamètre des gouttelettes des émulsions de Colza.

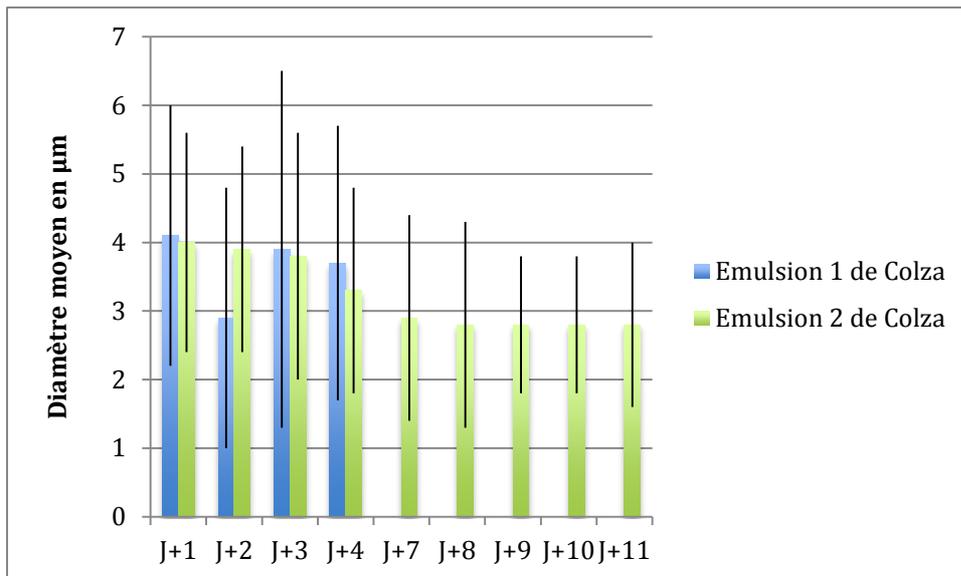


Figure 77 : Suivi du diamètre des émulsions de Colza en microscopie optique

Les diamètres des gouttelettes dans les émulsions 1 et 2 sont très proches. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle l'émulsion 2 est une version concentrée de l'émulsion 1, dans laquelle les gouttes d'huile sont plus proches les unes des autres.

D'autre part, les observations macroscopiques confirment que la stabilité de l'émulsion 1 de colza est limitée à une semaine, tandis que les émulsions 2 ont une plus grande stabilité dans le temps.

La constance du diamètre des gouttelettes même après décantation de l'émulsion nous permet d'envisager le fait que les gouttelettes se rapprochent, soit pour ensuite flocculer, soit pour aboutir à des phénomènes de crémage. Dans les deux cas la conséquence de ces phénomènes est la rupture de phases, observée au bout de sept jours pour les émulsions 1.

La figure 78 ci-après correspond au suivi en microscopie optique du diamètre des gouttelettes des émulsions de Chanvre/Colza.

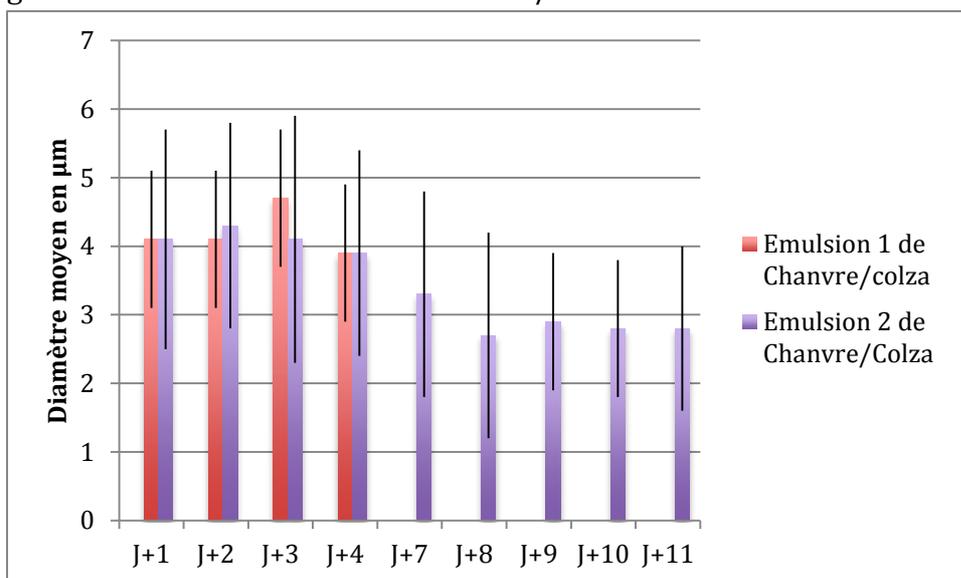
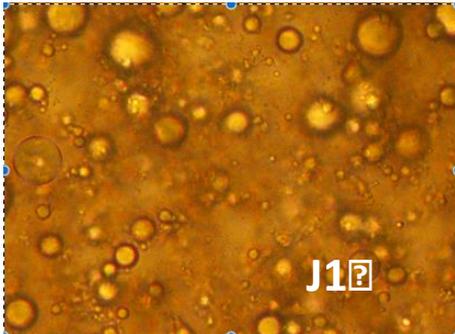


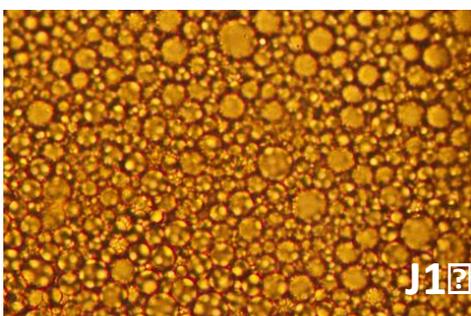
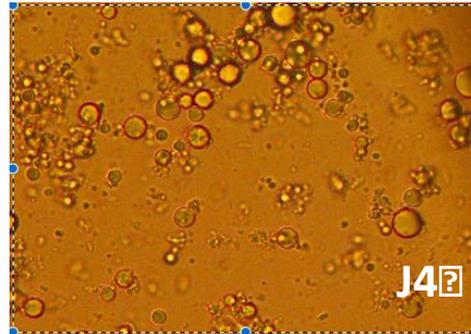
Figure 78 : Suivi du diamètre des gouttelettes des émulsions de Chanvre/colza en microscopie optique

Si le suivi du diamètre des gouttelettes de l'émulsion 1 s'arrête au bout de 4 jour, c'est parce qu'au jour 7, celle-ci avait décanté.

La comparaison des diamètres des émulsions de colza et de chanvre/colza montre des diamètres équivalents dans les deux cas entre les émulsions 1 et 2. Cela confirme le fait que la centrifugation qui permet d'obtenir l'émulsion 2 a pour effet de concentrer en surface la phase grasse, qui reste suspendue et concentrée au sein d'une phase aqueuse. D'autre part, la stabilité des émulsions 1 de colza semble être inférieure à celle des émulsions 1 de chanvre/colza : les premières décantent entre le quatrième et le septième jour après leur obtention, tandis que les secondes sont encore stables à J+7.



**Emulsion 1 Colza**



**Emulsion 2 Colza**

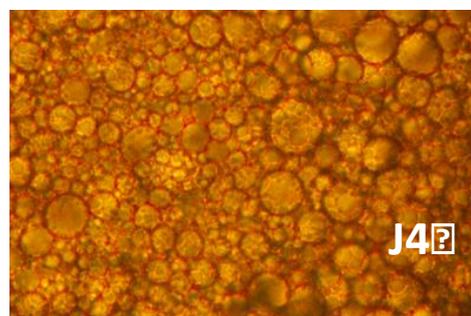
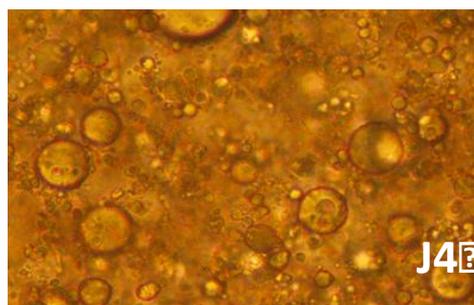
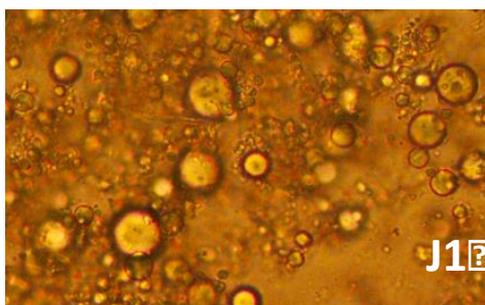
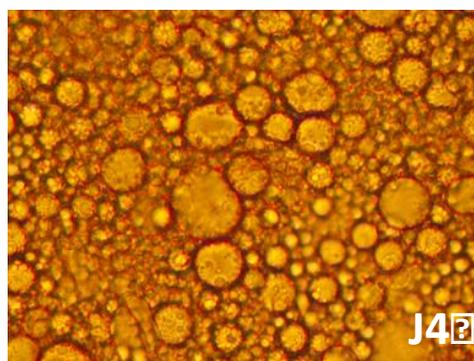
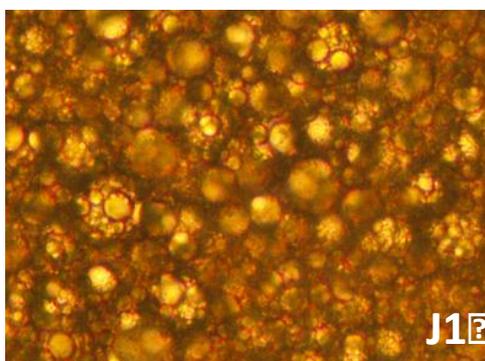


Figure 79 : Photos en M.O des émulsions de colza



### Emulsion 1 - Chanvre/Colza



### Emulsion 2 - Chanvre/Colza

Figure 80 : Photos en M.O des émulsions de chanvre/colza

Les images de microscopie optique correspondent à des captures d'écran réalisées lors des mesures des diamètres des gouttelettes.

Ces illustrations corroborent les résultats de caractérisation décrits précédemment : les émulsions 1 sont constituées de gouttelettes d'huile dispersées au sein d'une phase aqueuse, peu concentrées.

Les photos des émulsions 2 montrent des gouttes d'huile très concentrées, au sein d'une phase aqueuse peu visible.

La très haute concentration de fines gouttelettes au sein d'une phase continue peu visible et le fait que les émulsions 2 présentent des teneurs en humidité faibles, de l'ordre de 20%, corroborent le fait que ces émulsions sont des émulsions constituées de fines gouttelettes d'huile dispersées au sein d'une phase aqueuse continue peu présente.

Si les émulsions 2 avaient été constituées d'une phase huileuse continue, les gouttelettes d'huile végétale seraient peu nombreuses, et de diamètres plus élevés.

D'autre part, il est peu probable que la centrifugation appliquée à l'émulsion 1 entraîne un changement de nature de la phase continue, et un phénomène d'inversion de phases.

#### **IV.2.4 Analyse des émulsions par calorimétrie différentielle à balayage**

##### **IV.2.4.1 Détermination de la température de cristallisation de l'huile de colza et du mélange huile de chanvre/huile de colza**

En amont de l'analyse de nos émulsions, nous avons déterminé les températures de cristallisation des huiles qu'elles contiennent, en l'occurrence l'huile de colza et un mélange 50/50 en masse des huiles de chanvre et de colza. Leurs profils d'acides gras contenant majoritairement des acides gras insaturés, et leur état étant liquide à température ambiante, nous supposons avant les tests que leur cristallisation se produit à des températures inférieures à la température ambiante.

En effet, l'huile de colza cristallise à  $-46^{\circ}\text{C}$ , l'huile de chanvre cristallise à  $-68^{\circ}\text{C}$  et le mélange d'huiles de chanvre et de colza cristallise à  $-55^{\circ}\text{C}$  (figures 95 et 96).

Les valeurs des températures de cristallisation des huiles de chanvre et de colza sont proches de celles proposées par Teh et Birch (Teh and Birch, 2013). Ces auteurs décrivent une cristallisation de l'huile de chanvre à  $-61,11^{\circ}\text{C}$  et celle du colza à  $-42,71^{\circ}\text{C}$ . Les huiles analysées par ces auteurs sont, comme celles employées dans le cadre de nos travaux, des huiles obtenues par pressage à froid. Les légères variations notées peuvent être liées à des variations du profil d'acides gras entre les huiles analysées. Ces dernières variations peuvent être dues à des différences génétiques entre les espèces, mais également à des différences pédoclimatiques liées à la culture des plantes : ensoleillement ou nature des sols en autres.

La température de cristallisation du mélange chanvre/colza ( $-55^{\circ}\text{C}$ ) correspond environ à la moyenne ( $-57^{\circ}\text{C}$ ) des températures de cristallisation des huiles de chanvre et de colza. Cette donnée pourra être exploitée pour déterminer la teneur en huile d'un mélange de deux huiles dont les températures de cristallisation respectives sont connues.

##### **IV.2.4.2 Méthodologie d'analyse des émulsions**

Une masse comprise entre 10 et 20 mg d'émulsion à analyser sont disposés au sein d'une cellule en aluminium de 40  $\mu\text{L}$ . L'enceinte contenant les deux cellules est sous flux d'azote, à 50 mL/min. Quatre cycles de réchauffement/refroidissement appliqués à ces huiles ou mélanges d'huiles sont les suivants :  $+50^{\circ}\text{C}$  à  $-70^{\circ}\text{C}$  à une vitesse de  $2^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ . Les bornes de température ont été choisies afin de permettre la cristallisation des deux phases constituant l'émulsion.

Les analyses des thermogrammes se concentrent sur les phases de refroidissement des extraits, permettant de mettre en évidence les pics correspondant à la cristallisation de l'huile et de l'eau.

Lors de chaque analyse, un thermogramme correspondant à l'huile végétale contenue dans l'émulsion est superposé aux autres thermogrammes de refroidissement des émulsions.

Les courbes correspondant au premier refroidissement, notées ]2[ et au dernier refroidissement, notées ]14[ sont isolées des autres afin de visualiser les effets des différents cycles sur la température de cristallisation de l'huile végétale et sur la stabilité de l'émulsion.

#### **IV.2.4.3 Analyse des émulsions de colza par DSC**

Les deux émulsions analysées, notées émulsion 1 et émulsion 2 sont obtenues par fractionnement aqueux continu des graines, selon le process décrit au chapitre IV. Pour rappel, l'émulsion 1 correspond au filtrât, dont le pied a été isolé par filtration. L'émulsion 2 est une version concentrée de l'émulsion 1, obtenue par centrifugation de cette dernière.

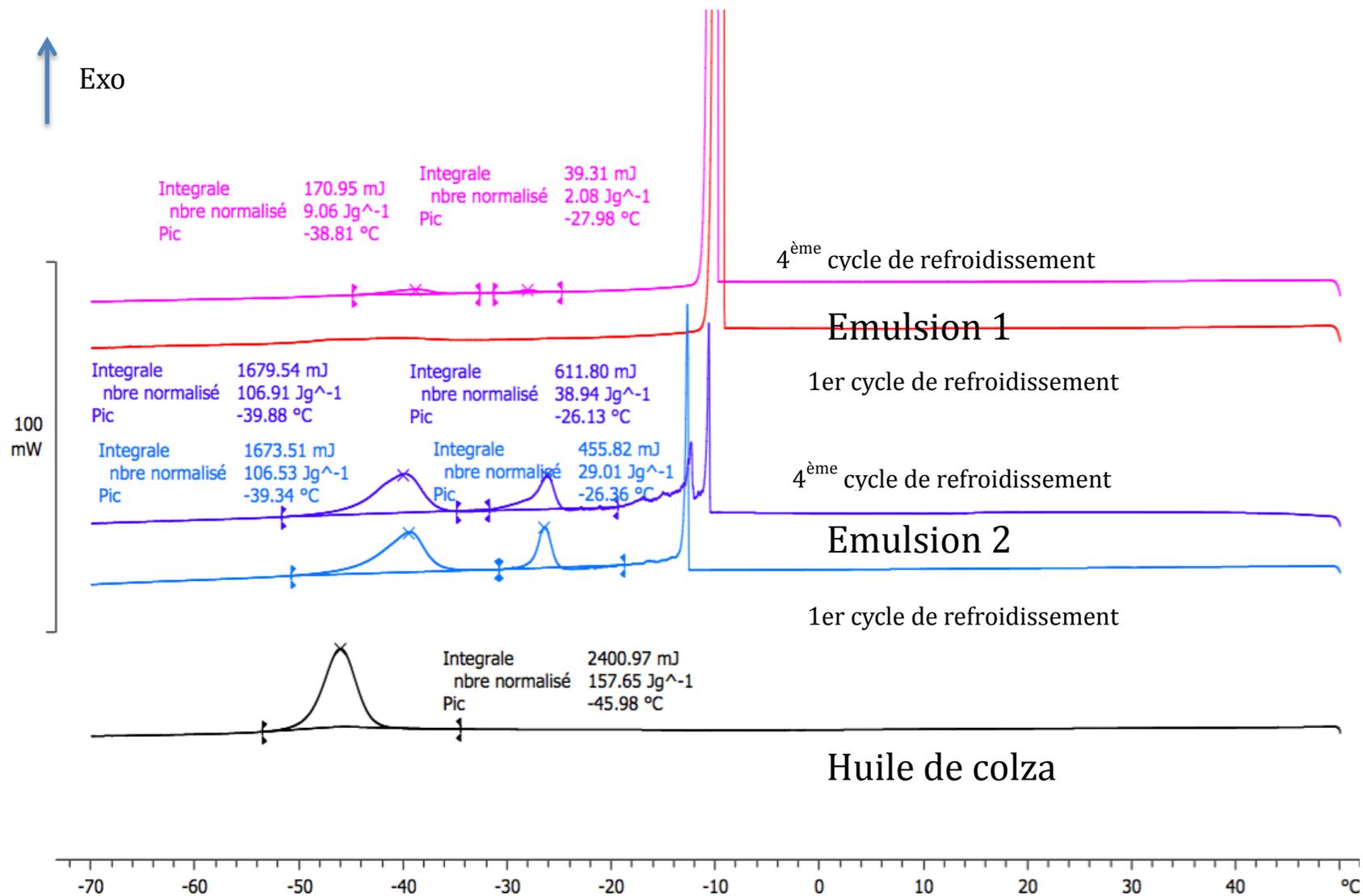


Figure 81 : Thermogrammes des émulsions de colza

Les émulsions dont les thermogrammes sont présentés sur la figure 95 ont été analysées 24 heures après leur production en extrusion bi-vis.

L'huile de colza cristallise à  $-46^{\circ}\text{C}$ .

L'analyse en DSC de l'émulsion 2 montre deux pics de cristallisation de l'huile, à  $-40$  et  $-26^{\circ}\text{C}$ , ainsi qu'un pic correspondant, selon les auteurs cités précédemment, à la cristallisation de la phase aqueuse, autour de  $-12^{\circ}\text{C}$

L'analyse DSC de l'émulsion 1 montre deux pics correspondant à la cristallisation de l'huile de colza, à  $-38,81$  et  $-27,98^{\circ}\text{C}$ , ainsi qu'un pic correspondant à la cristallisation de la phase aqueuse, autour de  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Une relation entre la teneur en lipides du milieu et l'enthalpie correspondant à la cristallisation est observée. En effet, les enthalpies de cristallisation observées pour les émulsions 2 sont nettement plus élevées que celles observées dans le cas des émulsions 1. La représentation de l'évolution de l'enthalpie de cristallisation en fonction de la teneur en huile de l'échantillon analysé semblerait montrer une corrélation du type logarithmique.

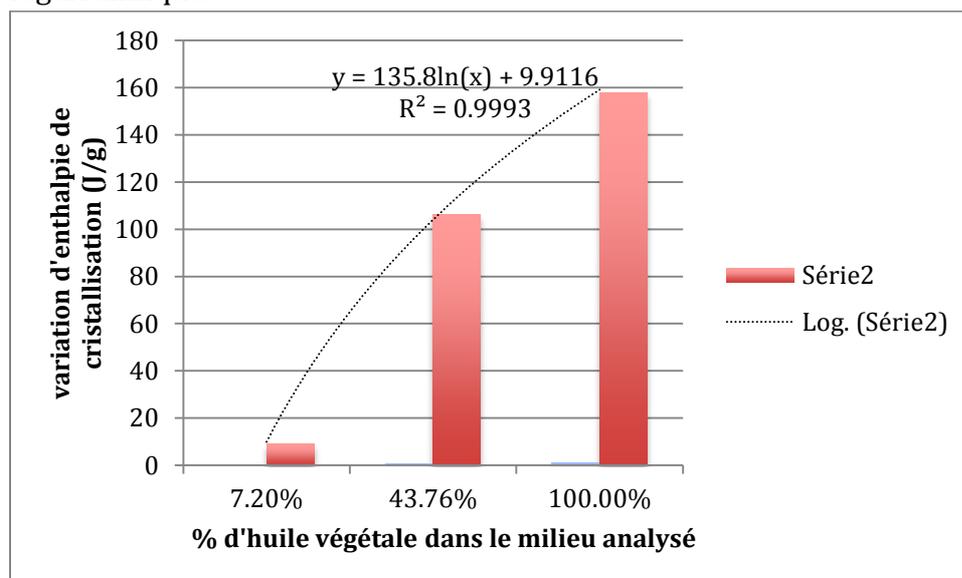


Figure 82 : Evolution de l'enthalpie de cristallisation en fonction de la teneur en huile de colza dans le milieu analysé

L'émulsion 1, contenant 7,2% d'huile, a une enthalpie de cristallisation de l'huile autour de 9,06 J/g. L'émulsion 2, contenant 43,8% d'huile végétale, a une enthalpie de cristallisation de 106,4 J/g. Dans le cas de l'huile pure, l'enthalpie de cristallisation est de 158 J/g.

Cela laisse envisager la possibilité d'employer la DSC pour déterminer la teneur en huile d'une émulsion de composition voisine de celle-ci.

Les émulsions 2 sont en effet nettement plus concentrées en huile végétale que les émulsions 1.

Les deux pics obtenus sur les émulsions de colza lors de la cristallisation de l'huile correspondent typiquement à des pics de solidification de l'huile végétale émulsifiée polydisperse, comme le suggèrent les thermogrammes ci-après :

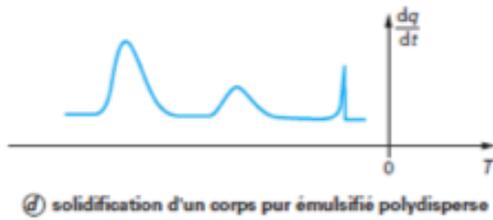


Figure 83 : Thermogrammes type (source : techniques de l'ingénieur)

Un décalage du pic de cristallisation est observé entre l'huile de colza sous forme de « bulk », et l'huile de colza sous forme émulsifiée. Les pics observés pour les émulsions sont des pics exothermiques, à des températures comprises entre -40 et -20°C. Les signaux exothermiques observés autour de -12°C correspondent à la cristallisation de l'eau.

Un décalage du pic de cristallisation est également observé entre le premier et le dernier cycle de refroidissement, mais l'huile est toujours sous forme émulsifiée polydisperse à l'issue du dernier cycle.

Dans le cas de l'émulsion 2, un second pic apparaît lors de la cristallisation de l'eau. Cela peut correspondre à un changement d'état de l'eau dans l'émulsion, causé par les cycles de réchauffement/refroidissement appliqués à l'émulsion.

#### IV.2.4.4 Analyse des émulsions de chanvre/colza par DSC

Les émulsions étudiées sont issues du fractionnement aqueux du mélange de graines Chanvre/Colza en extrudeur bi-vis décrit au chapitre IV.

Les émulsions dont les thermogrammes sont présentés ici ont été analysées 24 heures après leur production par extrusion bi-vis.

Les cycles appliqués à ces émulsions ont été les mêmes que ceux appliqués aux émulsions de colza.

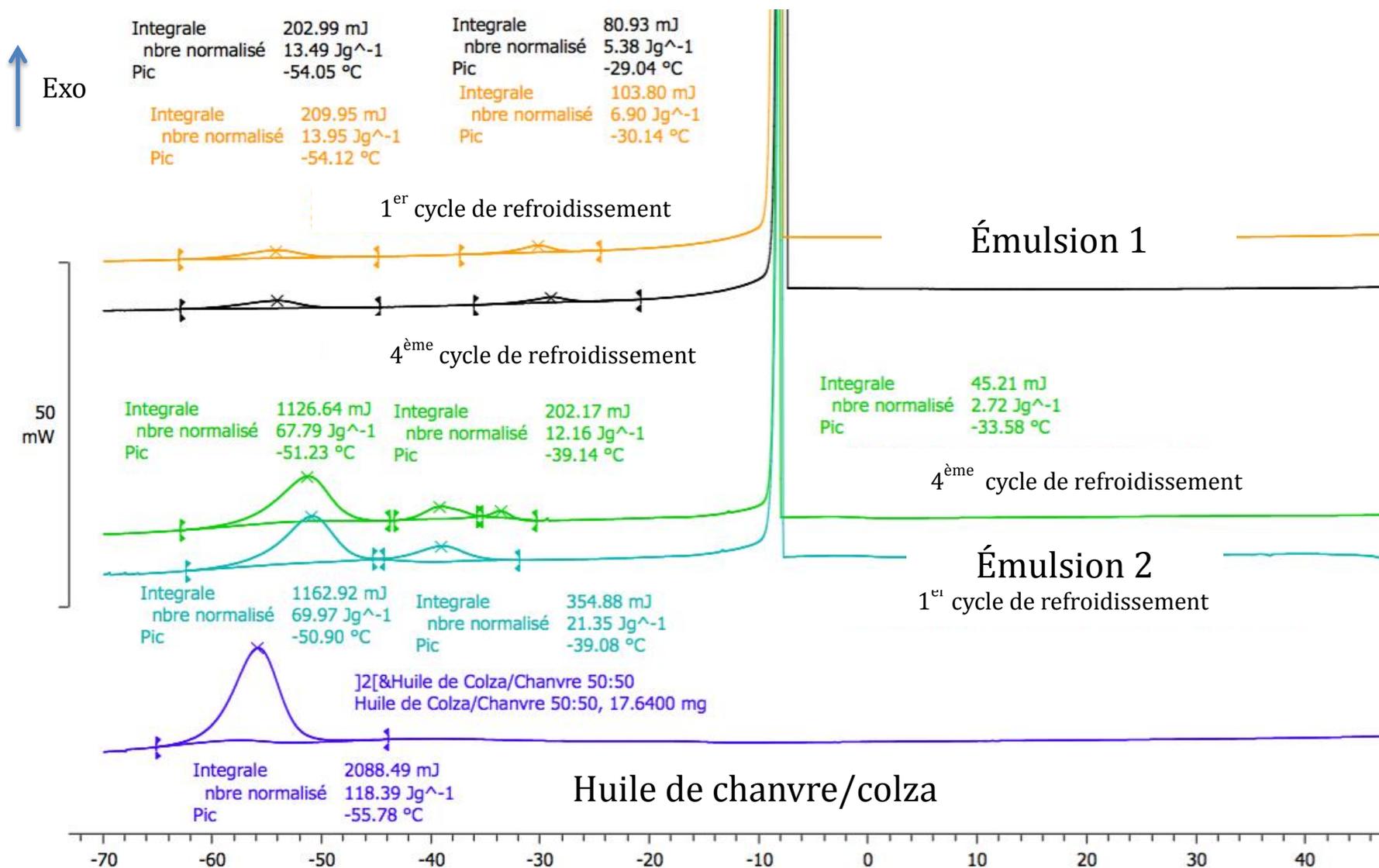


Figure 84 : Thermogramme des émulsions de chanvre/colza et du mélange d'huiles Colza/Chanvre 50/50

Le mélange des huiles de chanvre et de colza présente un unique pic de cristallisation à  $-55,78^{\circ}\text{C}$ , température intermédiaire entre  $-48^{\circ}\text{C}$  (huile de colza) et  $-68^{\circ}\text{C}$  (huile de chanvre).

L'émulsion 2 donne deux pics de cristallisation lors du premier cycle de refroidissement, à  $-50$  et  $-39^{\circ}\text{C}$ . Un troisième pic à  $-33^{\circ}\text{C}$  apparaît lors du dernier cycle de refroidissement. Les pics de cristallisation de la phase aqueuse sont observés à des températures légèrement supérieures à  $-10^{\circ}\text{C}$ .

L'émulsion 1 présente deux pics de cristallisation de l'huile à  $-54$  et  $-29^{\circ}\text{C}$ , et un pic correspondant à la cristallisation de la phase aqueuse à des températures légèrement supérieures à  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Comme dans le cas de l'émulsion de colza, il existe une relation entre l'aire du pic de cristallisation, correspondant à l'enthalpie de cristallisation de l'huile, et la teneur en huile végétale dans le milieu analysé.

Dans ce cas aussi, la relation semblerait être de type logarithmique. Comme pour l'émulsion de colza, les seuls trois points de la courbe ne permettent pas de confirmer cette hypothèse.

Dans les deux cas, des dilutions des émulsions auraient pu être réalisées afin d'ajouter des points supplémentaires aux courbes, mais le risque était de déstabiliser les émulsions.

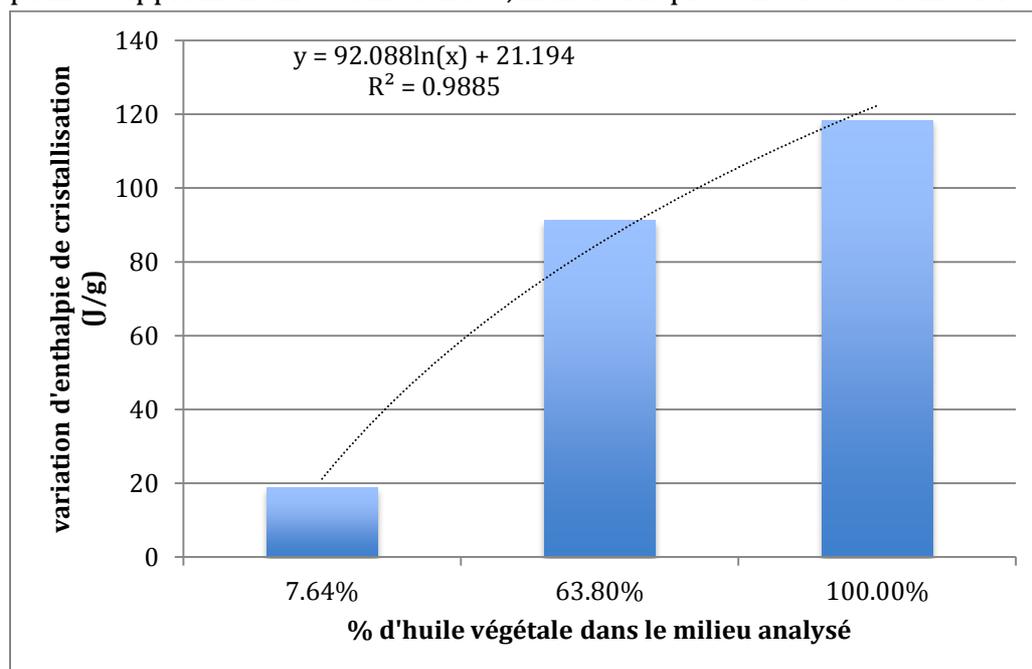


Figure 85 : Evolution de l'enthalpie de cristallisation en fonction de la teneur en huile de chanvre/colza du milieu analysé

Pour les deux types d'émulsions, un décalage du pic de cristallisation de l'huile est observé. Cela permet de supposer que l'huile présente au sein des émulsions n'est pas dans le même état que l'huile analysée seule.

Concernant l'émulsion 1, on peut observer que les thermogrammes correspondant au premier et au quatrième cycle de refroidissement de l'émulsion se superposent.

Cela laisse supposer qu'il n'y a pas de changement d'état de l'émulsion entre le début et la fin de l'analyse. On peut trouver deux explications à cela :

- soit l'émulsion présente une grande stabilité, qui lui permet de résister aux quatre cycles de réchauffement-refroidissement qui lui sont appliqués
- soit, au contraire, elle était déjà déstabilisée au début de l'analyse, et les cycles de réchauffement-refroidissement n'ont rien changé au comportement des phases.

Dans la mesure où la température des pics de cristallisation de l'huile rencontrée au sein de l'émulsion présente, aussi bien lors du premier que lors du dernier cycle de refroidissement un décalage par rapport à l'huile pure, nous pouvons considérer que l'émulsion n'est jamais totalement déstabilisée.

Cependant, vu les contraintes extrêmes appliquées aux émulsions, il est difficile de savoir à quel point ces résultats sont transposables à ceux qui seraient obtenus en conditions de conservation à température ambiante.

#### IV.2.4.5 Etude de vieillissement d'émulsions en DSC

Une étude de vieillissement a été effectuée, sur des échantillons stockés à +4°C.

Les thermogrammes sont dans la partie annexes. Les observations se sont focalisées sur les températures de cristallisation de l'huile en fonction du jour de l'analyse et du numéro du cycle de refroidissement appliqué.

Pour les émulsions de colza, les résultats sont les suivants :

**Tableau 90 : Températures de cristallisation de l'huile pour les émulsions de colza**

	Emulsion 1	Emulsion 2
J+10		
1 <sup>er</sup> cycle		-40°C/-30°C
4 <sup>ème</sup> cycle		-40°C/-30°C/-28°C
J+14		
1 <sup>er</sup> cycle		-44°C/-28°C
4 <sup>ème</sup> cycle		-42°C/-28°C
J+15		
1 <sup>er</sup> cycle	-37°C /-32°C	
4 <sup>ème</sup> cycle	-37°C/-32°C	
J+19		
1 <sup>er</sup> cycle	-39°C/-30°C	
4 <sup>ème</sup> cycle	-40°C/-32°C	

Aussi bien pour les émulsions 1 que pour les émulsions 2, la température de cristallisation de l'huile en émulsion diminue au fil des jours d'analyse. Elle est plus proche de la température de cristallisation de l'huile native (-45°C) à J+14 pour l'émulsion 2 et à J+19 pour l'émulsion 1 qu'au premier jour de leur analyse.

La température de cristallisation de l'huile dans les émulsions 2 à J+10 n'est pas modifiée entre le premier et le dernier cycle de refroidissement, mais un pic de cristallisation apparaît à -28°C. Ce dernier est également retrouvé lors des deux cycles à J+14, tandis que le pic à -30°C a disparu. Ainsi, les quatre cycles à J+10 donnent lieu à l'apparition d'un pic qui est présent lors du premier cycle de l'analyse à J+14. Il semblerait donc que les quatre

cycles de refroidissement correspondent à un vieillissement de quatre jours lorsque l'échantillon est stocké à +4°C.

Pour les émulsions de chanvre/colza, les résultats sont les suivants :

**Tableau 91 : Températures de cristallisation de l'huile pour les émulsions de chanvre/colza**

	Emulsion 1	Emulsion 2
<b>J+10</b>		
1 <sup>er</sup> cycle		-54°C/-26°C
4 <sup>ème</sup> cycle		-54°C/-26°C
<b>J+14</b>		
1 <sup>er</sup> cycle		-54°C/-26°C
4 <sup>ème</sup> cycle		-54°C/-26°C
<b>J+15</b>		
1 <sup>er</sup> cycle	-56°C	
4 <sup>ème</sup> cycle	-56°C	
<b>J+19</b>		
1 <sup>er</sup> cycle	-56°C	
4 <sup>ème</sup> cycle	-56°C	

Concernant les émulsions 2, il n'y a pas de changement dans les températures de cristallisation entre le 10<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour après leur formation. Les deux pics observés sont les mêmes. Cela laisse donc suggérer qu'il n'y a pas de changement d'état de l'émulsion lors de son stockage.

Concernant les émulsions 1, un seul pic de cristallisation de l'huile est observé, à une température proche de celle de l'huile de chanvre/colza lorsqu'elle est analysée seule. Ainsi, l'émulsion 1 de chanvre/colza est probablement déjà déstabilisée lors de sa première analyse, 15 jours après son obtention.

#### **IV.2.4.6 Conclusion et avantages de la DSC pour l'analyse des émulsions**

En plus d'être une méthode ne nécessitant qu'une petite quantité d'échantillon, la DSC peut également être employée pour déterminer rapidement la quantité d'huile végétale au sein d'une émulsion, grâce à l'enthalpie de cristallisation qui est proportionnelle à la teneur en huile végétale dans le milieu étudié.

Elle peut également être utilisée pour appliquer un vieillissement accéléré des émulsions, et ainsi prédire des résultats de stabilité.

Concernant les émulsions analysées ici, les températures de cristallisation des phases grasses dans les émulsions 1 sont plus proches des températures de cristallisation des huiles natives que pour les émulsions 2. Les résultats confirment donc que les émulsions 2 présentent une stabilité dans le temps supérieure à celle des émulsions 1.

#### IV.2.5 Caractérisation des émulsions par RMN à bas champs

La RMN à bas champ est une méthode au départ employée dans l'industrie pour la détermination des teneurs en matière grasse ou en humidité dans tous types de matériaux. La société CEREVAA, basée à Martignac (33), a développé cette méthode pour la caractérisation de l'eau très liée, liée ou très libre dans les produits. Cette méthode est aujourd'hui utilisée aussi bien dans l'agro-alimentaire que dans les industries cosmétiques et de la santé.

L'objectif des analyses a été d'estimer la qualité des émulsions, et d'en caractériser la stabilité. Pour ce faire, les méthodes de RMN à bas champ permettent, grâce à l'évaluation de la répartition des protons de l'eau et à leur mobilité, d'estimer l'état de stabilité d'une émulsion. Nous avons également pu comparer la compartimentation des protons et leur mobilité selon la graine ou le mélange de graines employées.

Des émulsions 2 colza et chanvre colza ont été analysées après la campagne d'extrusion d'avril 2015. Les analyses ont été effectuées sur des extraits obtenus le 8 avril 2015 (lors de la troisième campagne d'extrusion bi-vis, destinée entre autres à produire des émulsions pour analyses), filtrés le jour même pour obtenir les émulsions 1. Ces émulsions 1 n'ont pu être centrifugées que le 14 avril pour des raisons logistiques, et ont été envoyées au CEREVAA et analysées le 22 avril 2015.

Il est important que noter que les émulsions 1 sans mucilages ont été réceptionnées par le CEREVAA alors que leur déstabilisation avait commencé : elles étaient sous forme de deux phases. Avant leur analyse, elles étaient homogénéisées par agitation mécanique de leur contenant.

Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 92 et sur la figure 86 ci-après.

**Tableau 92 : Caractérisation des émulsions 2 par RMN à bas champ**

	Emulsion 2 Colza	Emulsion 2 Chanvre/Colza
Fraction de H <sup>+</sup> très liés (%)	30,2 ± 0,6	26,1 ± 0,4
Fraction de H <sup>+</sup> liés (%)	35,0 ± 0,3	40,1 ± 0,5
Mobilité des H + liés (ms)	27	34
Fraction de H <sup>+</sup> très libres (%)	34,8 ± 0,4	33,8 ± 0,1
Mobilité des H <sup>+</sup> très libres (ms)	145	177
Mobilité des H <sup>+</sup> (ms)	93,0 ± 1,7	101,7 ± 1,5

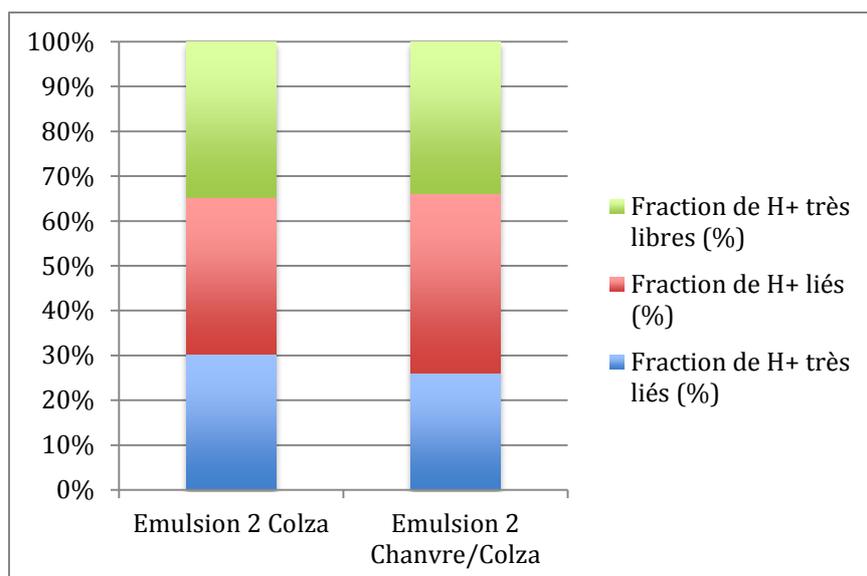


Figure 86 : Répartitions des protons très liés, liés et très libres dans les émulsions 2

En termes de répartition des protons, les deux émulsions présentent des fractions de protons très libres relativement proches : 34,8% pour le colza, et 33,8% pour le mélange chanvre/colza. La teneur en protons liés et très liés est de 65,2% pour l'émulsion 2 issue du fractionnement aqueux du colza seul, et de 66,2% pour l'émulsion 2 issue du fractionnement aqueux du mélange chanvre/colza. Les deux émulsions sont très proches quant à leur répartition en protons libres et liés.

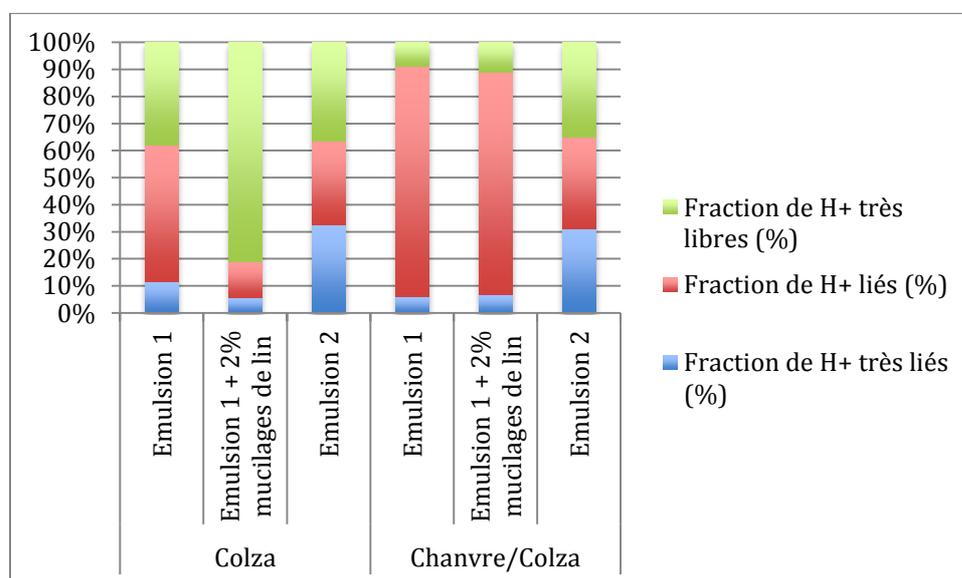
Les protons de l'émulsion 2 issue du fractionnement aqueux du colza seul présentent une mobilité de l'ordre de 93,0 ms, tandis que ceux de l'émulsion 2 issue du fractionnement aqueux du mélange chanvre/colza présentent une mobilité de l'ordre de 101,7 ms. La mobilité des protons est inversement reliée à l'état de structuration de l'émulsion. Le résultat obtenu montre que l'émulsion de colza est légèrement plus structurée que l'émulsion chanvre/colza. Les résultats de RMN à bas champ tendent donc à montrer que l'ajout de chanvre a un effet de déstructuration des émulsions. 2

Une seconde salve d'analyses en RMN à bas champ a été effectuée sur les émulsions obtenues durant les campagnes de septembre 2015. Un premier lot de quatre émulsions a été analysé 9 jours après la formulation des émulsions. Pour ce lot, les émulsions analysées ont été les émulsions 1 et 2 issues du fractionnement du chanvre et du colza. Le but était d'étudier la mobilité et la compartimentation des protons, selon le type de graines ayant permis d'obtenir les émulsions, mais également de comparer la répartition des protons dans les émulsions 1 et 2. Nous avons enfin analysé les émulsions 1 issues du fractionnement des graines de colza et du mélange chanvre colza en présence de mucilages de lin dans la phase aqueuse.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 93 ci-après.

**Tableau 93 : Répartition et mobilité des protons dans les émulsions 1 et 2 colza et chanvre/colza sans ou avec ajout de mucilages**

	Colza			Chanvre/Colza		
	Emulsion 1	Emulsion 1 + 2% de mucilages de lin	Emulsion 2	Emulsion 1	Emulsion 1 + 2% de mucilages de lin	Emulsion 2
Fraction de H+ très liés (%)	11,7 ± 0,9	5,7 ± 0,4	32,5 ± 0,7	6,2 ± 0,1	6,7 ± 0,3	31,2 ± 0,5
Fraction de H+ liés (%)	50,5 ± 6,4	13,3 ± 0,4	31,1 ± 0,4	85,0 ± 0,2	82,4 ± 0,5	33,8 ± 0,3
Mobilité des H+ liés (ms)	79	55	33	52	57	30
Fraction de H+ très libres (%)	37,8 ± 7,3	81,0 ± 0,3	36,4 ± 0,4	8,8 ± 0,2	10,9 ± 0,4	35,0 ± 0,2
Mobilité des H+ très libres (ms)	230	156	154	170	161	169
Mobilité des H+ (ms)	138,7 ± 2,5	141,5 ± 1,1	100,3 ± 0,6	58,8 ± 0,5	65,5 ± 0,8	106,7 ± 0,6



**Figure 87 : Répartition des protons très liés, liés et très libres dans les émulsions 1 et 2 de colza et de chanvre/colza avec et sans ajout de mucilages**

Les observations sont les suivantes :

- L'émulsion 1 de chanvre/colza présente une fraction en protons très liés et liés (91,2%) nettement supérieure à celle de l'émulsion 1 de colza. (62,2%) La mobilité des protons de l'émulsion chanvre/colza est de 58,8 ms, contre 138,7 ms pour celle

de l'émulsion de colza. Il semblerait ainsi que l'ajout de chanvre dans l'émulsion 1 permette d'améliorer l'état de structuration de l'émulsion, et par là même de diminuer la mobilité des protons.

- L'ajout de mucilages dans les émulsions 1 diminue l'état de structuration et la compartimentation des protons pour le colza. Lors de l'ajout de mucilages, la mobilité des protons passe de 138,7 ms à 141,5 ms et la fraction de protons très liés et liés passe de 62,2% à 19%. Cependant, la mobilité des protons très libres de l'émulsion 1 enrichie en mucilages (156 ms) est nettement inférieure à celle des protons très libres de l'émulsion 1 sans mucilages (230 ms). Ainsi, les protons très libres de l'émulsion enrichie en mucilages sont beaucoup moins libres que ceux de l'émulsion sans mucilages. Les mucilages modifient donc la répartition des molécules d'eau, mais l'eau au contact des mucilages s'échappera moins facilement du réseau formé.
- Pour l'émulsion 1 de chanvre/colza, l'ajout de mucilages a une légère influence sur la compartimentation des protons. La fraction de protons très liés augmente de manière non significative : elle passe de 6,2 à 6,7%. La fraction de protons liés diminue légèrement, passant de 85 à 82,4%. La fraction de protons très libres augmente légèrement, elle passe de 6,2 à 6,7%. L'ajout de mucilages augmente légèrement la mobilité des protons liés, qui passe de 52 à 57 ms. La mobilité des protons très libres passe de 170 à 161 ms. Ces différences sont peu significatives.
- La compartimentation des protons est équivalente dans les deux émulsions 2 (figure 19). Cependant, leur mobilité est légèrement supérieure avec l'ajout de chanvre.

Les analyses en RMN à bas champ permettent de conclure sur les points suivants :

- L'ajout de chanvre a une influence bénéfique importante sur la compartimentation et la mobilité des protons dans l'émulsion 1, en améliorant la répartition des protons (la proportion de protons liés passe de 50 à 80%) et en diminuant leur mobilité, qui passe de 139 à 59 ms.
- L'ajout de chanvre n'a, en revanche, que peu d'influence sur la compartimentation et la mobilité des protons des émulsions 2 : leur répartition entre protons très liés, liés et très libres est identique, et leurs mobilités sont comparables.
- L'ajout de mucilages modifie la compartimentation des protons dans l'émulsion 1 de colza, en augmentant la proportion de protons très libres. Cependant, il est important de noter que la mobilité des protons diminue avec l'ajout de mucilages. Les mucilages vont avoir l'effet escompté, en créant un réseau au sein de l'émulsion, qui retient les molécules d'eau et stabilisent l'émulsion.

### IV.3 Formulations à partir des émulsions

L'objectif de la société Sirius Bio lors de la mise en place du projet de thèse était d'aller le plus loin possible dans des formulations vertes. L'intérêt de ces travaux porte en

particulier sur la substitution d'émulsifiants obtenus par des procédés de synthèse chimique type PEG, par des fractions végétales.

Le fractionnement aqueux de graines par extrusion bi-vis a permis d'obtenir deux types d'émulsions, plus ou moins concentrées. Les formulations effectuées à partir de ces deux types d'émulsions sont décrites dans les paragraphes suivants.

#### **IV.3.1 Formulations à partir des émulsions 1**

Les émulsions 1 sans ajout de mucilages sont des émulsions peu stables. Cependant, l'ajout de mucilages ex-situ, mais aussi *in situ*, lors du procédé de fractionnement, donne des résultats prometteurs pour leur stabilisation.

D'autre part, le succès de l'ajout de mucilages directement dans la solution aqueuse employée pour le fractionnement des graines ouvre des perspectives pour l'ajout d'autres actifs, tels que des actifs spécifiques pour des applications cosmétiques, ou des conservateurs. Ces conservateurs sont d'autant plus importants pour les émulsions enrichies en mucilages, dont la stabilité microbienne est très limitée.

Ainsi, la formulation d'un lait fluide peut être envisagée directement en extrusion bi-vis, en incorporant dans la phase aqueuse des actifs spécifiques et des conservateurs adaptés.

#### **IV.3.2 Formulations à partir des émulsions 2**

L'aspect très concentré en huile des émulsions 2 nous a entraînés à en tester l'activité émulsifiante au sein d'une émulsion eau dans huile. Les essais ont été effectués au sein du laboratoire de formulation de la société Sirius Bio.

Les émulsions utilisées pour ces formulations ont été obtenues lors d'une ultime campagne d'extrusion, spécifique, dédiée à la réalisation de formulations prototypes. Afin de limiter les phénomènes de déstabilisation liés à des contaminations microbiennes, un conservateur pour la phase aqueuse, autorisé par Ecocert, a été dispersé dans la phase aqueuse extractante. Il s'agit du Geogard 221, commercialisé par la société Lonza. Il s'agit d'un mélange d'acide déhydroacétique, benzyl alcool et d'eau.

En outre, plusieurs galéniques ont été testées, l'objectif étant de pouvoir proposer aux consommateurs une gamme de cosmétiques à base de colza, 100% végétales, et sans émulsifiants synthétiques. Une galénique lait, une autre de crème, et une de beurre ont été testées à partir de l'émulsion 2 de colza.

Cette fraction grasse est non seulement riche en huile de colza, mais elle possède également des protéines, des polyphénols et des sucres susceptibles d'apporter en plus des propriétés fonctionnelles démontrées dans ces travaux des propriétés dermo-cosmétiques intéressantes.

##### **IV.3.2.1 Formulation d'un lait**

Lors de ces essais, l'émulsion 2 de colza a été incorporée au sein de la phase grasse dans une émulsion huile dans eau, dont la galénique devait être fluide.

La formule développée a été la suivante :

**Tableau 94 : Formule d'un lait à partir de l'émulsion 2 de colza**

Ingrédient	% dans la formule
Emulsion 2 de colza	33
Cire d'abeille	2
Satiaxane	0,5
Eau	64,5

La cire d'abeille a été incorporée afin d'ajouter de la tenue et de la texture à la formule. La satiaxane a été incorporée dans la phase aqueuse afin de la gélifier et de favoriser la formation d'un réseau permettant la stabilisation de l'émulsion.

Lors de sa formulation l'émulsion s'est formée comme attendu. L'absence de tout émulsifiant dans la formule confirme donc que l'émulsion 2 peut être employée en tant qu'émulsifiant dans la formule, et que l'huile de colza qu'elle contient peut tenir lieu de phase grasse dans une émulsion. Cela nous donne donc une fraction bi-fonctionnelle, tenant lieu aussi bien d'émulsifiant que de phase grasse, et permettant également d'améliorer la faisabilité de la fabrication de l'émulsion.

#### IV.3.2.2 Formulation d'un baume

Dans ce cas aussi, l'émulsion 2 a été incorporée dans une phase grasse, couplée à des beurres et de la cire d'abeille afin d'améliorer la texture du produit obtenu. Pour cette formulation, le postulat de départ était que l'émulsion en tant que telle présentait déjà une texture riche, semblable à celle d'un baume. Les beurres de karité et de cacao, ainsi que l'huile végétale de noix de coco ont été ajoutés afin d'en améliorer la pénétration cutanée ainsi que la sensorialité. La cire d'abeille joue un rôle d'agent de texture, ajoutant une texture plus préhensible au produit fini.

La formule développée a été la suivante :

**Tableau 95 : Formulation d'un baume à partir de l'émulsion 2 de colza**

Ingrédient	%
Beurre de cacao	2
Noix de coco	2
Beurre de karité	2
Cire d'abeille	2
Emulsion 2	92

#### IV.3.2.3 Formulation d'une crème riche

Ici, l'objectif était de formuler une crème riche, de texture proche à celle des cold cream. Une galénique d'émulsion eau dans huile a été formulée.

L'émulsion 2 a été couplée au sein de la phase grasse à de l'huile végétale de sésame désodorisé, de la cire d'abeille et du beurre de cacao. La cire d'abeille présente des propriétés épaississantes, et agit également en tant que co-émulsifiant. Le beurre de cacao présente des propriétés d'agent de texture, il aide l'émulsion à rester structurée. De la satiaxane, constituée de gomme xanthane, polysaccharide produit à partir de la fermentation d'une bactérie, est également employée pour ses propriétés gélifiantes.

La combinaison de ces actifs, couplée à l'émulsion 2, permet d'obtenir des émulsions riches, du type cold-cream, dont la stabilité à température ambiante est de l'ordre de trois mois.

La formulation suivante a été réalisée à partir des émulsions 2 de colza et de chanvre/colza :

**Tableau 96 : Formulation réalisée à partir des émulsions 2**

	Ingrédient	%
Phase grasse	Emulsion 2	12
	Huile végétale de sésame désodorisé	47,5
	Cire d'abeille	6
	Beurre de Cacao	4
Phase aqueuse	Eau	30
	Satiaxane	0,5

Ainsi, l'utilisation de l'émulsion 2 permet de formuler des émulsions sans ajout d'émulsifiant supplémentaire, en fournissant à cette crème des protéines et autres actifs.

## IV.4 Conclusion

Dans ce chapitre, les caractérisations physico-chimiques ainsi que des études de stabilité des émulsions ont été effectuées. Le fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis nous permet donc d'obtenir deux types d'émulsions huile dans eau, de concentration et de composition très différentes.

Les émulsions 1 sont très fluides mais peu stables, mais l'ajout de mucilages a prouvé qu'il permettait d'améliorer nettement la stabilité de ces émulsions. Ce dernier résultat est appuyé par les caractérisations effectuées en RMN à bas champ, qui démontrent en particulier dans le cas du colza, une diminution de la mobilité des protons très libres. Les mucilages contribuent donc à améliorer l'état de structuration de l'émulsion.

Ces résultats d'incorporation de mucilages démontrent également la faisabilité de l'ajout d'un additif hydrophile dans la phase aqueuse extractante, tout en conservant les conditions de profil de vis, ratio liquide/solide et vitesse de vis utilisés sans les additifs.

Les émulsions 2 sont constituées de gouttelettes d'huile très concentrées au sein d'une phase aqueuse peu présente. Elles présentent un état de structuration meilleur que celui des émulsions 1, ce qui implique une mobilité des protons moins importante. Cela va permettre à ces émulsions de se déstabiliser moins rapidement que les émulsions 1.

Les caractérisations de stabilité des émulsions ont fait appel à des méthodes originales, en particulier la RMN à bas champs et la DSC.

Quelle que soit l'émulsion, l'absence de conservateur les rend peu stables microbiologiquement, et des phénomènes de fermentation peuvent être notés, notamment via un dégagement gazeux à l'ouverture des pots dans lesquelles elles sont stockées. Pour remédier à cela, un conservateur de la phase aqueuse, le Geogard 221, composé d'acide déhydroacétique et de benzylalcool a été ajouté dans l'eau lors de la dernière campagne d'extrusion. Le geogard 221, bien que pétrosourcé, est autorisé par le référentiel Ecocert. Cependant, pour aller plus loin dans les émulsions 100% végétales, il aurait été plus pertinent d'utiliser un conservateur plus « naturel », tel que l'extrait de pépins de pamplemousse ou l'acide salicylique naturel. La conservation de la phase grasse est un point critique. Il est possible d'imaginer mettre un conservateur aussi *in situ* lors du fractionnement au même titre que les mucilages.

Les émulsions présentent de nombreuses perspectives en termes d'exploitation et de valorisation. Il a été démontré qu'elles peuvent être employées comme base pour de nombreuses formulations, bien que la couleur des fractions obtenues soit loin des émulsions blanches retrouvées dans le commerce, utilisant des émulsifiants synthétiques.

# Conclusion générale



## Conclusion générale et perspectives

Les graines oléo-protéagineuses présentent une large variété de compositions, aussi bien en termes de teneurs en lipides et en protéines, qu'au niveau de leurs profils d'acides gras, et de la composition de leur fraction protéique. Les travaux antérieurs du Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle sur le fractionnement aqueux de matières végétales en extrudeur bi-vis avaient déjà prouvé l'intérêt de ce type de procédé pour le désassemblage de graines, dans un but d'extraction et de purification des lipides.

Nous avons alors décidé d'étendre ce procédé à des graines dont le comportement lors du fractionnement aqueux en réacteur TMC n'était pas encore connu, l'objectif principal de ces travaux de thèse étant l'obtention d'émulsions 100% végétales, uniquement à partir de graines et d'eau.

La première partie du manuscrit était consacrée à un état de l'art sur les émulsions en général, les émulsifiants, ainsi que ceux employés en cosmétique biologique. Nous avons également pu décrire des exemples d'utilisation de polysaccharides et de protéines en formulation et en particulier leur rôle dans la stabilisation d'émulsions. Enfin, la description des graines choisies pour ces travaux, ainsi que l'état de l'art sur les procédés de fractionnement aqueux dédiés nous ont permis de mettre en place le schéma de fractionnement qui sera mis en œuvre, en batchs dans le chapitre II puis en employant un procédé continu dans le chapitre III.

Dans le chapitre II, consacré à la première partie des travaux effectués, nous avons caractérisé les graines utilisées en terme de composition de leur fraction pariétale mais également de leurs teneurs en protéines et en lipides totaux. Un dosage d'Osborne et un dosage des acides aminés ont également été effectués afin d'évaluer la composition de la fraction protéique de nos graines. Nous avons ensuite pu obtenir de l'huile végétale de première pression à froid par fractionnement via une presse monovis. Le profil d'acides gras de l'huile végétale a également été déterminé. Il a ensuite été question d'extraire les fractions protéiques des graines par extraction à pH basique et précipitation à pH acide. Ainsi, les graines choisies ont donné des pseudos-isolâts protéiques dont les teneurs en protéines atteignent 73,2% M.S. pour le colza, 94,5% M.S. pour le chanvre, et respectivement 75,1 et 88,8 pour le pastel et le cardon. Les propriétés émulsifiantes de ces pseudos-isolâts protéiques ont été étudiées à l'aide de diagrammes de phase ternaires. L'évolution des systèmes eau-huile-protéines a ainsi pu être mise en évidence en montrant les différents types de structures formées lorsqu'on modifiait le rapport eau/huile et la teneur en protéines. Ces résultats nous ont permis de connaître les proportions limites des ternaires protéine-eau-huile pour atteindre des systèmes monophasiques et ont démontré que les isolats protéiques de colza et de pastel présentaient les meilleures propriétés émulsifiantes.

L'influence de la nature des graines sur le procédé de fractionnement aqueux a été évaluée lors d'extractions aqueuses en batch agité. Pour chaque graine étudiée, le mélange de graines et d'eau sous agitation mécanique a donné lieu à une phase aqueuse émulsifiée au sein de laquelle les particules solides de graines sont en suspension. Une fois filtrée, l'émulsion obtenue s'avère peu stable. Toutefois, la stabilité des émulsions issues des graines de colza est apparue meilleure que celle des émulsions issues des autres graines. Il est à noter qu'après centrifugation, trois phases ont été obtenues pour chacune des graines, (i) un culot lourd et dense, (ii) une phase aqueuse intermédiaire et (iii) une émulsion dont la densité est inférieure à celle de l'eau. Ces phases ne seront pas systématiquement retrouvées pour toutes les graines lors du procédé d'extraction bi-vis. Les graines de colza ont donné les meilleurs résultats en termes de rendement et de qualité macroscopique de la deuxième émulsion obtenue.

En parallèle, les graines de lin ont subi un fractionnement aqueux particulier, destiné à en extraire les mucilages. Les graines ont subi deux heures de macération dans un réacteur/extracteur Tournaire à 60°C. Les mucilages obtenus se sont avérés riches en protéines (27% MS) et en polysaccharides (37% MS) démontrant ainsi l'intérêt de mes utiliser en tant que actif/gélifiant et de les incorporer *in situ* lors du procédé de fractionnement dans le chapitre III.

Le troisième chapitre était consacré au fractionnement aqueux des graines dans un réacteur thermo-mécano-chimique ouvert, de type extrudeur bi-vis. Il a démontré son intérêt majeur lié à l'enchaînement de plusieurs opérations unitaires au sein du réacteur. Les ouvertures en entrée et en sortie de l'appareil permettent également une production continue de la fraction d'intérêt, dans notre cas le filtrât. Après avoir fixé des conditions opératoires, *i.e.* ratio liquide/solide, vitesse de vis, profil de vis, température, permettant d'obtenir les meilleurs rendements et les meilleures qualités d'émulsions avec les graines de colza, nous avons étendu ce procédé aux graines de chanvre, de cardon, ainsi qu'aux graines de pastel pourvues de leurs siliques. Pour ce type d'opérations, l'extrudeur bi-vis a été divisé en quatre zones :

- une zone d'alimentation, au sein de laquelle les graines sont distribuées par le biais d'une trémie et d'un doseur
- une zone de déstructuration de la matière, permettant le pressage de l'huile végétale
- une zone d'extraction liquide/solide, au sein de laquelle l'eau et la matière végétale sont mises en contact. L'agitation liée à la vitesse des vis permet l'émulsification entre l'eau et l'huile extraite dans la zone précédente, mais également l'extraction des composés hydrophiles présents dans les graines
- une zone de séparation liquide/solide, induite par la formation d'un bouchon dynamique, qui permet l'écoulement du filtrât enrichi en lipides et en composés bioactifs hydrophiles, ainsi que la sortie des résidus solides issus de la graine, l'extrudât.

L'intérêt était de coupler au sein du même réacteur l'extraction de l'huile, ainsi que celle de composés bioactifs hydrophiles, mais également d'effectuer l'émulsification *in situ* et d'obtenir directement deux types d'émulsions.

Avec les graines de chanvre, de cardon et de colza, le filtrât est sous forme émulsifiée, et la deuxième émulsion est également obtenue. Toutefois, les résultats optimums en termes de rendement et de qualité d'émulsions sont retrouvés avec le colza. Dans les meilleures conditions, un débit d'émulsion 1 de 4,96 kg/h et un débit d'émulsion 2 de 0,76 kg/h ont été obtenus, pour des débits respectifs d'entrée en graines et en eau de 4 kg/h et 8 kg/h.

Nous avons ensuite étendu le procédé de fractionnement aqueux des graines seules à des mélanges de graines, afin d'évaluer les effets synergiques entre les graines au niveau du procédé et des produits obtenus. Ces travaux nous ont permis de conclure que la présence de colza est indispensable à une qualité acceptable d'émulsions, mais également que la séparation liquide/solide obtenue lorsque les graines de colza sont seules est améliorée en présence de chanvre. L'effet synergique attendu est donc observé sur le procédé d'extraction.

Le troisième et dernier volet des travaux en réacteur TMC a consisté en l'ajout d'un actif, en l'occurrence les mucilages de lin, au sein de la phase aqueuse extractante. Ces essais avaient deux objectifs : l'évaluation de la faisabilité d'introduction d'un actif dilué dans l'eau, mais également l'obtention de fractions de sorties enrichies. Les mucilages ont été choisis pour améliorer la stabilité des émulsions 1 : le réseau polysaccharidique gélifié formé lors de la dilution des mucilages lyophilisés dans l'eau limite les mouvements des gouttes d'huile dispersées en augmentant la viscosité de la phase continue. L'objectif initial a été atteint, la stabilité des émulsions est améliorée, en particulier pour les essais avec le mélange chanvre/colza. D'autre part, ces essais ouvrent de nombreuses perspectives pour l'incorporation d'autres types d'actifs afin de cibler les activités désirées au sein des fractions obtenues.

Le quatrième et dernier chapitre de cette thèse était centré sur la caractérisation et la valorisation des émulsions de colza et de chanvre/colza, ainsi que sur celles obtenues lors des essais d'incorporation de mucilages. La caractérisation physico-chimique détaillée des émulsions a été réalisée, ainsi que des études de leur stabilité. A ces fins, la RMN à bas champs ainsi que la calorimétrie différentielle à balayage ont été choisies en plus de la microscopie optique. La DSC nous a permis d'évaluer l'état de stabilité de l'émulsion en comparant les températures de cristallisation de nos extraits à celles de l'huile sous forme native. Si la DSC est ainsi centrée sur la phase grasse, c'est l'inverse pour la RMN à bas champ, dans laquelle la mobilité des protons de la phase aqueuse qui est évaluée. Sans les mucilages, l'ajout de chanvre a permis de diminuer la mobilité des protons dans les émulsions 1, qui passe de 139 à 59 ms. Cela permet ainsi d'améliorer la compartimentation de l'émulsion et de limiter sa déstabilisation. En revanche, avec ou sans chanvre, la répartition des protons dans les émulsions 2 est très proche, et leur mobilité est comparable.

L'ajout de mucilages diminue la mobilité des protons dans les émulsions 1 de colza, améliorant ainsi la stabilité de ces émulsions.

La deuxième partie de ce dernier chapitre était consacrée à la valorisation des émulsions 2 pour des formulations 100% végétales. Ces travaux ont prouvé l'intérêt de ces émulsions ont prouvé aussi bien dans des émulsions huile dans eau qu'eau dans huile, en tant qu'émulsifiants, tout en ajoutant une part de phase grasse à l'émulsion finale. Si de surcroît des actifs sont ajoutés dans la phase aqueuse extractante, les émulsions obtenues peuvent d'autant plus prétendre à des propriétés multi-fonctionnelles. Différentes galéniques ont pu être formulées à partir des «émulsions 2 » : lait fluide, baume, cold cream.

En conclusion, l'ensemble des résultats de ces travaux a permis d'atteindre les objectifs visés en montrant qu'il était possible d'obtenir des « émulsions actives » de composition exclusivement végétale menant à des ingrédients technologiques multifonctionnels ou à des formulations abouties.

A ce jour, de nombreuses perspectives s'offrent à nous pour la suite des travaux :

- Ajuster les conditions du procédé pour que les émulsions issues des graines de chanvre et de cardon voient leurs rendements ainsi que leurs qualités améliorées
- Tester les conditions efficaces du procédé d'extraction thermo-mecano-chimique avec les graines de colza sur des graines de pastel désiliquées. La proximité de leurs compositions laisse entrevoir des résultats comparables sur ces deux matières premières
- Utiliser des conservateurs pour la phase aqueuse et des antioxydants pour la phase grasse dès le fractionnement ou durant le post-traitement afin d'améliorer la stabilité microbienne des produits obtenus.
- Envisager la valorisation des extrudâts pour des applications en matériaux.

# Partie Expérimentale



## Partie expérimentale

### P.E.1 Caractérisation des matières premières employées

#### P.E.1.1 Teneur en eau et en matières volatiles

La teneur en eau est déterminée selon la norme NF V 03-903.

Elle correspond à la perte de masse d'un échantillon de matière ayant subi un séchage de 12 heures dans une étuve chauffée à 103°C.

Lorsque les matières premières sont des solides (graines ou extrudâts), elles sont préalablement broyées finement à l'aide d'un mixeur type moulin à café.

La teneur en eau, notée H, est calculée de la manière suivante :

$$H (\%) = \frac{m_1 - m_2}{m_2 - m_0} \times 100$$

Avec :

$m_0$  est la tare du creuset (g)

$m_1$  est la masse du creuset et de la matière, avant séchage (g)

$m_2$  est la masse du creuset et de la matière après séchage (g)

La teneur en matière sèche, notée M.S., est déterminée de la manière suivante :

$$M. S. (\%) = 100 - H$$

#### P.E.1.2 Teneur en matières minérales

La teneur en matières minérales (ou cendres) est déterminée selon la norme NF V 03-922. Elle correspond à la perte de masse d'un échantillon de matière préalablement séché, ayant subi une combustion de 5 heures à 550°C.

La teneur en matières minérales, notée M.M., est déterminée de la manière suivante :

$$M. M. (\%) = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Avec :

$m_0$  est la tare du creuset (g)

$m_1$  est la masse du creuset et de la matière avant calcination (g)

$m_2$  est la masse du creuset et de la matière après calcination (g)

### P.E.1.3 Teneur en matières organiques

La teneur en matière organique, notée M.O. correspond à la différence entre la teneur en matière sèche et la teneur en matière minérale.

$$\mathbf{M. O. (\%)} = M.S. - M.M.$$

### P.E.1.4 Teneur en lipides des solides

Elle est déterminée selon la norme française NF V 03-908, adaptée en utilisant le cyclohexane au lieu de l'hexane préconisé par la norme pour éviter l'utilisation d'un solvant CMR.

Si nécessaire, la matière première est séchée.

Environ 15 grammes de matière broyée sont introduits au sein d'une cartouche poreuse. La cartouche est placée dans un appareil d'extraction continue de type Soxhlet de 125 mL. Le solvant (cyclohexane) va s'enrichir en lipides au contact de la matière. Après 5 heures de cycles d'enrichissement, le solvant est évaporé sous pression réduite à l'évaporateur rotatif et le ballon est placé 12 heures à 50°C pour éliminer les dernières traces de cyclohexane.

La teneur en lipides, notée L, est calculée de la manière suivante :

$$\mathbf{L (\%)} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100$$

Avec :

$m_0$  est la masse de matière végétale initiale (g)

$m_1$  est la masse du ballon vide (g)

$m_2$  est la masse du ballon et de l'huile une fois le solvant évaporé (g)

Classiquement, les caractérisations portant sur les matières végétales sont exprimées par rapport à la teneur en matière sèche de la matière végétale.

### P.E.1.5 Teneur en lipides des phases hydrophobes

La teneur en lipides des phases hydrophobes issues des fractionnements aqueux par batch ou par extrusion bi-vis est déterminée par démixtion à l'éthanol absolu ou par un mélange éthanol absolu/éther di-éthylique (3/1).

Environ exactement quatre grammes de l'échantillon à analyser sont pesés dans un tube de centrifugation. 10 mL de solvant d'extraction y sont ajoutés et l'ensemble est vigoureusement mélangé au Vortex pendant 5 minutes puis centrifugé. Le surnageant issu de la centrifugation est récupéré, filtré sur filtre PTFE de 0,45 µm et transféré dans un ballon à col rodé afin d'être évaporé. Le solvant est éliminé par évaporation sous vide et les dernières traces de solvant sont éliminées en plaçant le ballon 12 heures à 50°C. La masse de lipides extraits est déterminée par différence de masse du ballon séché avec la tare.

La manipulation est réalisée en duplicatas afin de déterminer l'erreur expérimentale. L'extraction liquide/liquide est réalisée 5 fois d'affilée sur l'extrait afin de l'appauvrir au maximum en lipides.

#### **P.E.1.6 Dosage des lipides dans les mucilages par une méthode colorimétrique**

Ce dosage est basé sur des travaux réalisés sur les juvéniles des nématodes (Reversat, 1976).

Les extraits sont tout d'abord hydrolysés à l'acide sulfurique afin d'en solubiliser les lipides. Les lipides à chaud dans l'acide sulfurique se colorent en rose au contact de la vanilline. Cette coloration est alors dosable au spectrophotomètre.

Les extraits à analyser sont pesés dans des tubes à vis et dilués dans 1 mL d'eau et 9 mL d'acide sulfurique concentré. Les tubes sont ensuite placés au bain marie à 100°C durant 10 minutes.

Une gamme étalon à l'huile d'olive est préparée. Les tubes de la gamme sont préparés à partir d'une solution mère d'huile d'olive diluée dans l'acide sulfurique. La solution mère est ensuite diluée dans l'acide sulfurique afin d'obtenir une gamme de tubes de concentration croissante en huile d'olive. 2 mL de solution d'huile d'olive sont introduits dans un tube, suivis de 2 mL de solution d'acide phosphorique. L'ensemble est soigneusement mélangé puis le tube est bouché et le mélange repose durant 15 minutes, afin que le dégagement thermique provoqué par le mélange soit dissipé. 2 mL de solution aqueuse de vanilline sont enfin ajoutés dans les tubes. Les tubes sont ensuite mélangés, bouchés et placés à 40°C durant une heure.

Le même protocole est appliqué aux tubes contenant l'échantillon à doser : mélange de 2 mL de la solution d'échantillon à doser dilué dans l'acide sulfurique, puis ajout de 2 mL d'acide phosphorique avant de laisser reposer 15 minutes. Enfin, 2 mL de solution de vanilline sont ajoutés, puis les tubes sont placés à 40°C durant une heure.

La densité optique des solutions est lue à 550 nm, et une droite étalon correspondant à la densité optique en fonction de la concentration en huile d'olive est tracée.

La densité optique de l'échantillon à doser permet d'exprimer sa teneur en lipides totaux, en équivalent « huile d'olive ».

### **P.E.1.7 Obtention des huiles végétales**

Les huiles végétales non raffinées sont obtenues par pressage à froid, en presse monovis, des graines entières.

Le principe de la presse monovis repose sur une vis sans fin, contenue au sein d'un fourreau. La presse est constituée d'un moteur de 0,75 kW de puissance, 230 V de puissance maximale, et 5,1 A d'intensité maximale. Sa vis a une longueur de 18 cm, avec un pas de vis de 1,8 cm, un diamètre interne de 1,4 cm et une profondeur de chenal de 0,5 cm. Son fourreau a un diamètre intérieur de 2,5 cm et est équipé d'un filtre percé permettant la sortie des liquides à la fin de la vis. Le filtre a une granulométrie de 2 mm. La vitesse de vis, constante, est fixée à 40 RPM. Pour le chanvre, le colza et le cynara, le pressage est effectué en utilisant une buse de diamètre 5 mm.

Le système vis-fourreau peut être divisé en quatre zones :

- Zone d'alimentation : au sein de laquelle les graines entières sont distribuées par une trémie conique et une colonne qui les entraîne jusqu'à la vis
- Zone de transport : la rotation de la vis entraîne les graines au sein du fourreau.
- Zone de filtration : située entre la tête de vis et la zone de pressage, elle permet la séparation de l'extrait huileux et du tourteau, résidu solide issu de la graine.
- Zone de pressage : la matière transportée par la vis s'accumule dans cette zone et sort à travers une buse, dont le diamètre varie entre 5 et 10 mm en fonction des modèles et de la contrainte nécessaire à appliquer sur la matière afin d'en permettre l'expression. Il se forme dans cette zone un bouchon : la vis continue d'alimenter cette zone en matière, qui est alors compressée contre la buse. Cette pression exercée sur la matière va en exprimer l'huile, et s'accompagner d'un auto-échauffement de la matière.

Dans le cas des graines particulièrement riches en huile végétale, le tourteau issu du premier pressage présente encore un aspect gras. Il est donc introduit une deuxième fois au sein de la trémie afin de l'appauvrir encore plus en huile.

D'autre part, lors du pressage, les contraintes appliquées sur la matière entraînent la formation de petites particules qui sont entraînées avec l'huile dans le filtre. L'huile récupérée est donc filtrée à 8000g pendant 15 minutes, pour séparer le pied de l'huile clarifiée. La teneur en huile exprimée par rapport à la teneur en matière sèche de la graine correspond à la teneur en huile clarifiée.

La mesure du rendement de pressage des graines est réalisée en pressant trois fois des quantités de 500 grammes de matière.

### **P.E.1.8 Composition des huiles**

#### **P.E.1.8.1 Profil glycéridique**

La méthode employée est une méthode par étalonnage externe. Les extraits sont analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme.

1 à 1,5 mg d'huile sont dissous dans 1 mL de cyclohexane, et 160 µL de cette solution sont additionnés de 40 µL de réactif de silylation (BSTFA).

L'échantillon est injecté dans les conditions suivantes :

Appareil Perkin Elmer Instruments-Autosystem XL Gas Chromatography

Gaz vecteur : hélium, P=15 psi en début de colonne

Colonne : rtx-5 (restek), longueur 15m, diamètre interne 0,32 mm, épaisseur de film 0,25 µm

Injection on column : 1 µL. Température : 55° C pendant 0,5 min, puis 200°C/min jusqu'à 340°C, 340°C pendant 40 minutes.

Four : 55°C pendant 0,5 min, 45°C/min jusqu'à 80°C, 10°C/min jusqu'à 360°C, et 360°C pendant 16 min.

Détecteur FID : 365°C

#### **P.E.1.8.2 Profil acides gras**

Avant leur analyse, les acides gras sont méthylés pour les rendre volatils, à l'aide du TMSH. 200 mg d'huile sont dissous dans 10 mL de TBME. 100 µL de cette solution sont insérés dans un insert avec 50 µL de TMSH.

Conditions chromatographiques : analyse par CPG Varian 3900

Colonne : CP-select for CB fro FAME fused silica WCOT

Longueur : 50 mètres

Diamètre interne : 0,25 mm

Épaisseur de film : 0,25 µm

Temperature : 185°C pendant 40 minutes, puis 15°C/minutes jusqu'à 250°C et 250°C pendant 10,68 minutes)

Injection split 1 :100. 1 µL. 250°C pendant 55 minutes

Détecteur : FID, 250°C

Hélium : 1,2 mL/minute

La proportion de chaque acide gras est exprimée en rapport l'aire de l'acide gras au total des aires correspondant à l'ensemble des acides gras présents dans le mélange.

#### **P.E.1.9 Détermination des teneurs en fibres**

La détermination des teneurs en fibres est réalisée par la méthode de Van Soest & Wine, également appelée dosage ADF-NDF (Van Soest and Wine, 1967). Il s'agit d'une détermination par gravimétrie de la composition en héli-celluloses (Hc), lignine (L) et

cellulose (C) de la matière végétale. Elle consiste à soumettre l'échantillon à l'action successive de deux détergents puis du permanganate de potassium.

Les mesures sont réalisées sur des échantillons préalablement finement broyés et délipidés, afin de rendre le milieu le plus homogène possible.

Les réactions d'attaque des matières végétales sont réalisées sur des frittés de porosité 2, s'adaptant sur l'appareil Fibertec M2, disposant d'un système de chauffage et de réfrigération.

1ere attaque NDF (neutral detergent fiber) : Matière  $\longrightarrow$  Reste Hc, L, C  
1ere attaque ADF : Matière  $\longrightarrow$  Reste L, C  $\longrightarrow$  Reste : C

L'attaque de la matière végétale par le réactif neutre NDF permet de déterminer la fraction de fibres totales (cellulose + hémicelluloses + lignine). Le détergent neutre utilisé est à base d'EDTA et solubilise tous les composants non pariétaux (protéines, pectines). Lors de la première attaque ADF, le détergent est à base d'acide sulfurique et de CTAB. Il a pour rôle de solubiliser les composés pariétaux et les hémicelluloses. La fraction résiduelle correspond donc aux lignines et à la cellulose. La seconde attaque ADF au permanganate de potassium solubilise les lignines.

**Attaque NDF** : elle est réalisée sur l'appareil Fibertech system M Hot extractor en ajoutant à l'échantillon à analyser 100 mL d'une solution de sodium lauryl sulfate, EDTA, phosphate disodique, borate de sodium décahydrate, et éthylène glycol monoéthyl ether. Le mélange est porté à ébullition pendant une heure, puis la solution est aspirée et les résidus solides sont rincés à l'eau bouillante jusqu'à disparition de la mousse. Les frittés sont séchés à l'étuve 103°C pendant 12h puis calcinés à 550°C. La pesée du fritté après séchage et calcination permet de déterminer les teneurs en fibres.

$$\text{Fibres totales (\%)} = \mathbf{H_c} + \mathbf{Li} + \mathbf{C} = \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100$$

$m_0$  : masse du fritté (en g)

$m_1$  : masse du fritté et de la prise d'essai avant l'attaque NDF (en g)

$m_2$  : masse du fritté et du résidu après l'attaque NDF et le séchage (en g)

$m_3$  : masse du fritté et du résidu après calcination (en g)

$\mathbf{H_c}$  : hémi-celluloses

$\mathbf{Li}$  : lignine

$\mathbf{C}$  : cellulose

**Attaques ADF** : la première attaque se fait également sur l'appareil Fibertech system M Hot extractor en ajoutant à l'échantillon 100 mL d'une solution de CTAB et de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dilué. Le mélange est porté à ébullition pendant une heure, puis la solution est aspirée et les résidus solides sont rincés à l'eau bouillante. Les frittés sont séchés à l'étuve à 103°C pendant 12h, avant de subir une seconde attaque, permettant l'élimination de la lignine.

La seconde attaque, dite « attaque à froid » est réalisée sur l'appareil Fibertec System M cold extractor en ajoutant au résidu 25 mL de solution mixte, mélange (2/1) d'une solution de permanganate de potassium saturée ( $\text{KMnO}_4$  à 50 g/L) et de solution tampon, elle-même composée de nitrates de Fer et d'Argent, d'acétate de potassium, acide acétique et alcool butyl tertiaire. Le résidu et la précédente solution sont laissés en contact durant 1h30, puis la solution est aspirée et le résidu est rincé avec une solution déminéralisante composée d'acide oxalique di-hydraté dilué dans de l'éthanol à 95%, mélangé à de l'acide chlorhydrique à 35% dans de l'eau déminéralisée. Les rinçages sont effectués jusqu'à ce que les fibres soient blanches. Deux rinçages à l'éthanol à 80% sont ensuite réalisés, puis le résidu cellulosique est séché à l'étuve à 103°C puis calciné à 550°C.

La pesée du fritté après chaque séchage et calcination permet la détermination des teneurs en lignine et cellulose :

$$\begin{aligned}\mathbf{Li + C} &= \frac{m_2 - m_4}{m_1 - m_0} \times 100 \\ \mathbf{C} &= \frac{m_3 - m_4}{m_1 - m_0} \times 100 \\ \mathbf{Li} &= \frac{m_2 - m_3}{m_1 - m_0} \times 100\end{aligned}$$

$m_0$  est la tare du fritté (en g)

$m_1$  est la masse du fritté et de la prise d'essai avant la première attaque ADF (en g)

$m_2$  est la masse du fritté et du résidu après la première attaque ADF et séchage (en g)

$m_3$  est la masse du fritté et du résidu après la seconde attaque ADF et séchage (en g)

$m_4$  est la masse du fritté et du résidu après calcination (en g)

#### **P.E.1.10 Détermination de la teneur en composés hydrosolubles**

La manipulation est réalisée sur l'appareil Fibertec system M hot extractor.

1 gramme de matière broyée et délipidée à froid au cyclohexane est déposé dans un fritté adapté. 100 mL d'eau déminéralisée y sont ajoutés. Une fois l'ébullition atteinte, la matière et l'eau sont laissées en contact pour permettre l'extraction durant 1 heure.

Au bout d'une heure, la solution aqueuse est filtrée et récupérée, et le fritté est séché à 103°C, puis pesé.

La solution aqueuse est stockée à +4°C, et sa teneur en matières sèches est calculée selon la norme NF V 03-903, décrite au paragraphe 1. Sa teneur en protéines est également calculée selon la norme NF V 18-100 décrite au paragraphe 9.

La teneur en composés hydrosolubles, notée H.S., est calculée de la manière suivante :

$$\mathbf{H.S (\%)} = 1 - \frac{m_2 - m_1}{m_0}$$

Avec :

$m_0$  masse de matière initiale (g)

$m_1$  masse du fritté vide (g)

$m_2$  masse du fritté et de la matières après séchage à 103°C (g)

### P.E.1.11 Détermination de la teneur en protéines

La détermination de la teneur en protéines des échantillons est faite en utilisant la méthode de dosage de l'azote total du Kjeldahl (norme NF V 18-100).

L'analyse est effectuée en deux étapes : une étape de minéralisation de la matière grâce à un bloc de titration Tecator Kjeltex 2000 (Foss, Danemark), et la titration de l'ammoniac grâce au module Tecator Kjeltex 8400-8420 (Foss, Danemark).

La prise d'essai (0,5 à 1,5 grammes d'échantillon selon sa teneur attendue en protéines) est pesée dans un tube de minéralisation. 12,5 mL d'acide sulfurique concentrés y sont ajoutés.

Les échantillons solides sont préparés la veille, pour permettre douze heures de mise en contact entre la matière à doser et l'acide sulfurique. Les échantillons liquides peuvent être séchés douze heures à 50°C afin d'éviter que les protéines présentes dans l'extrait ne moussent lors de l'étape de minéralisation. Cette étape permet l'hydrolyse des protéines et la libération de l'azote organique.

Avant la minéralisation, deux pastilles de catalyseur ( $K_2SO_4 + CuSO_4$ ) sont ajoutées dans les tubes de minéralisation, qui sont ensuite placés à 400°C pendant 1H15.

Cette étape permet la transformation de l'azote organique en ions ammonium.

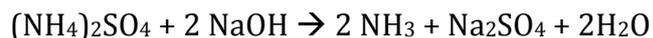
La réaction de minéralisation avec l'acide sulfurique est la suivante :



Une série d'amorçage est préparée, elle est composée de trois tubes vides permettant d'amorcer les tuyaux de soude et d'acide borique, et de deux tubes contenant du sulfate d'ammonium. Celui ci présente un rôle de témoin de dosage.

Le portant contenant les échantillons à doser comporte également des tubes vides, qui jouent un rôle de blanc. Des tubes contenant de l'urée présentent un rôle de témoin d'hydrolyse, permettant de vérifier si l'hydrolyse subie par les tubes est totale.

Une fois les tubes de minéralisation refroidis, l'azote minéralisé est titré. 80 mL d'eau distillée et 50 mL de soude à 40% sont dispensés dans le tube pour permettre la transformation des ions ammonium en ammoniac. La distillation à la vapeur d'eau du contenu du tube permet d'entraîner à la vapeur l'ammoniac produit par l'ajout de soude.



L'ammoniac est piégé par barbotage de la vapeur dans une solution aqueuse de 30 mL d'acide borique à 1% massique coloré par un mélange d'indicateurs colorés (vert de bromocrésol et rouge de méthyle à 1% dans le méthanol). La titration de l'ammoniac dans le distillat est réalisée par une solution d'acide chlorhydrique à 0,1N. Le titre exact de la solution d'acide chlorhydrique est vérifié avant chaque dosage. Le pH et la couleur de la solution évoluent lors de l'ajout de l'ammoniac dans l'acide borique. Le changement de couleur par rapport à l'équilibre est mesuré par une sonde de détection colorimétrique

présente au sein de l'unité de distillation Kjeltex 8400. Le dosage est donc réalisé en direct et en continu.

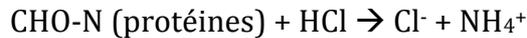
Réaction de piégeage de l'ammoniac :



Dosage en retour :



Bilan :



Par convention, la teneur en protéines de l'échantillon est obtenue en multipliant la teneur en azote par un facteur de convention. Celui ci peut être vérifié selon le profil acides aminés de la matière analysée, mais il est par convention de 6,25 dans la matière végétale, en considérant une teneur moyenne en azote dans les protéines de l'ordre de 16%. La teneur en protéines est exprimée en pourcentage de matière sèche.

La teneur en protéines, notée P, est exprimée en pourcentage de masse et est calculée de la manière suivante :

$$P = 6,25 \times \frac{M_N \times c \times (V_1 - V_0)}{m} \times 100$$

$M_N$  est la masse molaire de l'azote (14,007 g/mol)

$c$  est la concentration de la solution d'acide chlorhydrique (en mol/L)

$V_0$  est le volume utilisé de la solution d'acide chlorhydrique sur un échantillon blanc (en mL)

$V_1$  est le volume utilisé de la solution d'acide chlorhydrique (en mL)

$m$  est la masse de la prise d'essai (en mg)

### P.E.1.12 Classification d'Osborne

La classification d'Osborne vise à classer les protéines végétales en fonction de leur solubilité.

L'extraction sélective est réalisée sur des échantillons délipidés à froid au cyclohexane et broyés finement.

La poudre est ensuite mise en contact avec le premier solvant d'extraction selon un ratio liquide/solide de 20. L'extraction est réalisée à température ambiante, sous agitation magnétique, durant deux heures. Au bout des deux heures, le mélange solide/liquide est centrifugé durant 15 minutes à 7500g. Le surnageant est ensuite filtré sur filtre Whatman GF/A, qui a pour particularité de ne pas retenir les protéines.

Le culôt est remis en suspension avec le solvant d'extraction suivant.

Tableau 97 : nature de la fraction protéique extraite suivant le solvant d'extraction utilisé

Solvant d'extraction	Eau déminéralisée	Solution saline NaCl 1 M	Ethanol 70 %	Solution de NaOH pH 11
Fraction protéique	Albumines	Globulines	Prolamines	Glutéines

Au bout des quatre extractions successives, les teneurs en matière sèche et en protéines de chaque solvant d'extraction et du culôt résiduel sont dosés par la méthode Kjeldahl, décrite dans le paragraphe précédent.

### **P.E.1.13 Détermination de la composition en acides aminés**

La détermination de la composition en acides aminés est réalisée sur l'analyseur Biochrom 30 Amino Acid analyser (Serlabo technologies, Entraigues sur la Sorgue, France). Le principe de l'appareil repose sur une chromatographie par échange d'ions. Les échantillons contenant la matière à analyser sont préalablement hydrolysés de la manière suivante :

- La matière est pesée de manière à avoir 10 mg de protéines dans un tube à hydrolyse
- 10 mL de mélange d'hydrolyse sont ensuite ajoutés au tube. Le mélange d'hydrolyse est préparé de la manière suivante : 1 g de phénol est ajouté à 492 mL de HCl et l'ensemble est ajusté à 1L
- l'hydrolyse a ensuite lieu à 103°C, une heure avec le tube ouvert puis 23 heures bouchon fermé.
- Au bout de 23 heures, les tubes sont placés dans un bain d'eau glacée
- Le pH des tubes est remonté, à une valeur approximative de 3 (papier pH), à l'aide d'une solution de NaOH
- Le contenu du tube est transféré dans une fiole jaugée de volume choisi en fonction du volume de NaOH qu'il a été nécessaire d'ajouter à la solution initiale. La jauge est ajustée avec une solution tampon à pH 2,2. La solution est filtrée à l'aide d'un filtre PTFE (polytétrafluororéthylène) 0,45 µm puis placée dans des vials pour l'injection.

La chromatographie des acides aminés en hydrolysats et extraits est exécutée sur l'appareil Biochrom 30. L'échantillon est chargé sur une résine d'échange cationique (les acides aminés sont sous forme cationique après l'hydrolyse). Des tampons de différents pH et concentrations sont pompés dans la colonne et permettent la séparation des acides aminés. L'éluant de la colonne est mélangé à du réactif de ninhydrine, qui passe dans un serpent in à haute température, au sein duquel des composés colorés sont formés. L'absorption lumineuse de ces composés est mesurée par le photomètre à deux longueurs d'ondes différentes : 440 nm pour la proline et 570 nm pour les autres acides aminés. Chaque analyse est réalisée en triplicats.

### **P.E.1.14 Calcul du taux de gonflement des matières premières**

Ce protocole a été adapté à partir du protocole mis en place par C. Bories (2015).

Le taux de gonflement d'une matière végétale est mesuré par la mise en contact dans une éprouvette graduée durant une nuit d'un certain volume de matière avec un certain volume d'eau déminéralisée en excès. Après une nuit de mise en contact, le volume total occupé par le mélange (eau + matière végétale) est relevé et le mélange est placé sur une toile de filtration. Le volume d'eau libéré est également relevé.

Le taux de gonflement ( $T_{\text{gonflement}}$ ) est calculé de la manière suivante :

$$T_{\text{gonflement}} = \frac{V_t - V_a}{V_s} \times 100$$

$V_t$  correspond au volume total occupé par le mélange après une nuit de trempé

$V_a$  est le volume de l'extrait aqueux récupéré après filtration du mélange

$V_s$  est le volume occupé par le solide avant l'ajout d'eau

### **P.E.1.15 Détermination des activités antioxydantes des graines**

#### **P.E.1.15.1 Macérations**

Pour les matières solides tels que les graines, les extrudâts ou les pieds issus de l'extrusion, des macérations sont réalisées. Pour cela la matière est délipidée à froid au cyclohexane et broyée.

Les macérations ont lieu dans de l'éthanol à 80%, avec un ratio liquide/solide de 20. Le mélange (matière + éthanol) est mis sous agitation magnétique durant deux heures. Au bout des deux heures, l'ensemble est filtré sur toile et le filtrat est conservé à 4°C jusqu'aux analyses. Leur teneur en matière sèche est calculée selon la norme NF V 03-903 décrite au paragraphe 1.

#### **P.E.1.15.2 Test sur la DPPH**

Les extraits liquides issus des macération ou les phases hydrophiles issues de l'extrusion sont testées en terme d'activité antioxydante par le test à la DPPH dans le méthanol.

Le DPPH (1,1-diphényl 2 picryl hydrazil) est un radical libre stable de couleur violette intense. Il est utilisé pour mesurer la capacité antioxydante de produits. La capacité antioxydante correspond à la capacité d'un composé à fixer des radicaux libres, et à résister à l'oxydation. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait en mesurant la diminution de la coloration violette due à la recombinaison des radicaux DPPH, mesurable par spectrophotométrie à 516 nm. L'approche appliquée pour la détermination de l'activité antioxydante est la détermination de la quantité de produit nécessaire pour réduire 50 % de DPPH. Cette quantité de produit est appelée IC 50.

$$IC\ 50 = 1 - \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}} = 0,5$$

Une solution à 60 mg/L de DPPH dans du méthanol HPLC est préparée dans une fiole jaugée. La fiole est rapidement entourée de papier aluminium afin d'éviter la génération de radicaux libres.

L'absorbance de la solution de DPPH ( $A_{\text{contrôle}}$ ) doit être inférieure à 1,5.

Essais sur les échantillons :

Dans des tubes à vis sont introduits 300  $\mu\text{L}$  d'échantillon pur ou dilué, 700  $\mu\text{L}$  de méthanol et 4 mL de la solution de DPPH dans le méthanol.

Après avoir laissé réagir 30 à 40 minutes, l'absorbance des tubes à 516 nm est relevée.

La courbe suivante est tracée :

$$f(c) = 1 - \frac{A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{contrôle}}}$$

Avec  $c$  la concentration de l'échantillon dont l'absorbance est mesurée (mg/L)

$A_{\text{échantillon}}$  est l'absorbance de l'échantillon dilué

$A_{\text{contrôle}}$  est l'absorbance de la solution de DPPH pure

#### **P.E.1.16 Détermination de la teneur en sucres totaux par la méthode du phénol sulfurique**

La teneur en sucres totaux est déterminée par la méthode du phénol sulfurique. (Dubois, 1956) 0,6 mL de solution aqueuse de l'échantillon à analyser sont introduits dans des tubes à essai au sein desquels 0,6 mL d'une solution aqueuse de phénol à 5% sont ajoutés. 3 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés au mélange. Les tubes sont vigoureusement homogénéisés au vortex, puis placés 30 minutes au bain marie à 20°C. ! En parallèle de la préparation des tubes à analyser, une gamme étalon de glucose est réalisée à partir d'une solution mère.

L'absorbance de chaque tube (de la gamme étalon et des échantillons à analyser) est lue à 480 nm. Une droite d'étalonnage de la densité optique en fonction de la concentration en glucose est tracée, et la valeur de l'absorbance de chaque échantillon permet d'exprimer sa teneur en sucres totaux en équivalent glucose.

#### **P.E.1.17 Dosage des sucres totaux par HPLC**

La préparation des matières commence par une hydrolyse de 24 heures à l'acide chlorhydrique concentré, qui libère les sucres totaux.

Les échantillons contenant les polysaccharides ou molécules glycosylées à doser sont préparés de la manière suivante : 50 mg d'échantillons sont pesés dans un tube en pyrex, au sein duquel on rajoute 6,5 mL d'eau milliQ et 0,625 mL d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) à 72%. Ces tubes sont placés au bain marie à 98,5°C durant un temps  $t$  défini par la cinétique (30, 60, 90 ou 120 minutes). Le temps d'hydrolyse le plus adapté est défini à la fin de l'analyse, en fonction des teneurs en sucres dosées les plus élevées. Un temps d'hydrolyse

trop court ne permet pas d'hydrolyser la totalité des polysaccharides, et sous estime donc la quantité de sucres dosés. A l'inverse, un temps d'hydrolyse trop long dégrade les sucres libérés, et sous estime également la quantité de sucres dosés.

A l'issue du temps d'hydrolyse, les tubes sont refroidis dans de la glace, et le pH des tubes est neutralisé avec des solutions de soude de diverses concentrations (40%, 7,5 M ou 1M). Le volume de la solution obtenue précédemment est ensuite ajusté avec de l'eau milliQ dans une fiole jaugée de 25 mL, de manière à avoir une concentration en échantillon de 2 g/L.

Dans un pot à prélèvement de 30 mL sont ajoutés :

- 0,5 mL d'une solution d'étalon interne, le fucose, à 200 mg/L
- 2,5 mL d'échantillon hydrolysé
- 8,5 mL d'eau milliQ

La solution obtenue est filtrée à 0,45 µm dans des vials d'HPIC.

Les étalons externes non soumis à hydrolyse sont préparés à partir d'une solution mère de monosaccharides à 1,5 g/L. Les solutions fille présentent des concentrations comprises entre 0 et 100 mg/L. L'étalon interne fucose est également présent dans les vials correspondant aux étalons externes.

Des tubes d'étalon soumis à hydrolyse sont également préparés, afin de corriger les aires des standards non soumis à hydrolyse. Ils sont préparés à partir d'une solution aqueuse de monosaccharides à 1,5 g/L. 6,5 mL de cette solution sont ajoutés à 0,625 mL d'acide sulfurique à 72%. Le reste de la préparation est le même que celui des extraits à dosés hydrolysés.

Une cinétique d'hydrolyse est effectuée afin de valider la durée nécessaire pour l'hydrolyse totale des polysaccharides et des molécules glycosylées de chaque étalon.

Les droites de calibration interne sont tracées pour chaque monosaccharide étalon.

Les vials préparés sont analysés sur HPIC ICS 3000 (Dionex), sur une colonne CarboPac PA1. Un gradient de KOH à 2 mM pendant 35 minutes, puis augmente de 2 à 10 mM pendant 5 minutes, et augmente enfin à 100 mM. Les sucres libérés sont détectés par un détecteur à ampérométrie pulsée.

## **P.E.2 Protocoles de fractionnement aqueux des graines : réacteurs fermés**

### **P.E.2.1 Obtention des mucilages de Lin**

#### **P.E.2.1.1 Extraction liquide/solide**

Les graines de lin sont soumises à un protocole de fractionnement aqueux particulier, destiné à en extraire la fraction mucilagineuse.

La première étape de production des mucilages est une extraction liquide/solide. Le solvant employé est l'eau. L'extraction est faite au sein d'une plateforme

réacteur/extracteur 300 (Tournaire, Grasse). L'extraction est réalisée à un ratio liquide/solide de 20.

Les graines sont mises en contact durant deux heures avec l'eau du réseau de ville. Le contenu du réacteur est chauffé à 60°C grâce à une double paroi. L'ensemble est agité à 25 RPM. Au bout de deux heures d'extraction, le mélange est évacué via une vanne de sortie au sein d'une cuve de 300L. A ce stade, les graines décantent au fond de la cuve.

La séparation liquide solide est effectuée majoritairement sur des passoires, permettant de retenir les graines. Le mélange d'eau et de graines restant au fond de la cuve est centrifugé à 2000 RPM sur uneessoreuse/centrifugeuse Rousselet (Annonay, France). Les graines sont retenues dans le panier situé dans la cuve, et le liquide est récupéré par le biais d'une vanne.

L'étape suivante consiste à concentrer l'extrait mucilagineux obtenu afin de faciliter et d'écourter la phase lyophilisation.

#### **P.E.2.1.2 Concentration**

La concentration est réalisée sous pression (-0,9 bar), et le liquide est chauffé à 40°C. L'évaporation s'effectue à un débit de 20 L/h. Au bout de 8 heures, 160L d'eau ont été évaporés. La concentration a ainsi été réalisée par un facteur 7.

La masse d'extrait récupérée est de 24,1 kg. Cependant, cette dernière fraction mucilagineuse présente une teneur en pied importante, de l'ordre de 1%, pour une teneur en matière sèche exprimée de l'ordre de 4%. La fraction obtenue après lyophilisation des mucilages contiendrait donc environ 25% d'« intrants ».

Les mucilages concentrés sont donc filtrés sur toile avec un dispositif de filtration sous vide de type Büchner afin d'en éliminer le pied.

La fraction mucilagineuse concentrée présente une teneur en matières sèches de 3,89%. La fraction mucilagineuse concentrée et filtrée présente une teneur en matières sèches de 3,81%.

Cette fraction concentrée et filtrée est finalement lyophilisée.

#### **P.E.2.1.3 Lyophilisation**

La lyophilisation est une technique de séchage de la matière, utilisée dans de nombreux domaines, en particulier dans l'agroalimentaire. Le programme employé pour la lyophilisation des mucilages commence par une phase de congélation, durant laquelle la température des plateaux contenant les mucilages est abaissée à une température de -40°C à une rampe de 0,5°C/min. Un vide est ensuite appliqué au sein de la chambre de lyophilisation. La dernière étape consiste en la sublimation de l'eau, qui passe directement

de l'état solide à l'état gazeux. Durant cette étape, un vide de 0,3 mBar est appliqué, et la température passe de -40°C à +20°C à une rampe de 0,1°C/min.

Une fois lyophilisés, les mucilages sont broyés au broyeur Fritsch avec une grille de porosité 2 mm.

### **P.E.2.2 Fractionnement aqueux de graines en batchs**

Les conditions d'extraction ont été choisies en fonction des travaux réalisés sur la graine de tournesol par Philippe EVON (Evon, 2008).

Le procédé repose sur une première étape d'extraction liquide/solide, par mise en contact des graines préalablement broyées au moulin à café (marque Carrefour Home) avec de l'eau.

Le mélange est placé sous agitation mécanique au broyeur Silverson à 20000 RPM durant 5 minutes.

A l'issue de l'agitation, le mélange obtenu correspond à une fine émulsion au sein de laquelle les graines broyées sont en suspension.

La première étape du post-traitement consiste à filtrer et presser le mélange obtenu, afin d'en séparer le pied de la phase liquide.

Cette étape a été modifiée par rapport au protocole décrit dans la thèse de P.Evon car le but des travaux est l'obtention d'émulsions, et non l'extraction de l'huile par fractionnement aqueux.

A l'issue de la filtration, la phase liquide est centrifugée pour en séparer les trois phases, culôt lourd, phase aqueuse et pied.

## **P.E.3 Mise en œuvre de l'extrudeur bi-vis Clextral BC 21**

### **P.E.3.1 Description de l'extrudeur**

L'extrudeur BC 21, fabriqué par la société CLEXTRAL, est constitué de deux vis co-rotatives et co-pénétrantes. Les vis sont disposées sur deux arbres de vis parallèles, dont les centres sont séparés de 21 mm.

Le fourreau contenant les vis est constitué de sept modules interchangeables, de 10 cm de long, en acier inoxydable. Un système de chauffage à induction constitué de colliers chauffants, et un système de refroidissement assuré par une circulation d'eau permettent à cinq modules d'être thermorégulables.

Un moteur de type AC, de puissance 8,5 kW permet d'entraîner les deux vis.

### **P.E.3.2 Description des périphériques de l'extrudeur BC 21**

### **P.E.3.2.1 L'armoire électrique**

Le logiciel Terminal Operator Intouch permet de piloter l'installation, et permet également d'acquies les paramètres de fonctionnement de la bi-vis (débit d'alimentation du doseur, vitesse de vis). Il permet également de contrôler la température des différents modules qui constituent le fourreau. Tapez une équation ici.

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Dimensions : 2400 \* 670 \* 2350 cm
- Poids : 500 kg
- Tension d'alimentation : 400 V-50 Hz
- Intensité installée par phase : 80 A
- Débit d'air (ventilation) : 3340 m<sup>3</sup>/h

### **P.E.3.2.2 Doseur employé pour l'alimentation en solide**

L'alimentation en matières solides (ici les graines entières) est effectuée par le biais d'un doseur et d'une trémie, disposée au dessus du premier module de la BC 21.

Ses caractéristiques sont les suivantes :

- Fabricant : KTRON Soder
- Type : KCL KT 20 (trémie équipée de deux vis sans fin parallèles)
- Puissance moteur : 0,75 kW
- Volume de la trémie de réserve : 12 L
- Fréquence maximale : 87 Hz

L'étalonnage du doseur est propre à chaque matière première : il dépend en effet de la forme, de la densité et du poids des graines. Un étalonnage est réalisé, en traçant le débit du doseur en kg/h par rapport à la fréquence de consigne (en Hz) du doseur.

La fréquence de consigne du doseur propre à la graine est alors calculée en fonction du débit désiré.

### **P.E.3.2.3 Pompe utilisée pour l'introduction du liquide**

L'eau est introduite dans l'extrudeur par une pompe volumétrique dont les caractéristiques sont les suivantes :

- Fabricant : DKM
- Type : K20-2 KAMP 112/16
- Puissance : 0,37 kW

La pompe peut être reliée à l'extrudeur au niveau du module désiré.

Son débit est réglé par le biais d'un piston. Comme pour le doseur, un étalonnage est réalisé en traçant le débit de sortie de liquide en fonction du pourcentage de sortie du

piston. Ainsi, pour le débit d'entrée en liquide désiré, le piston est réglé selon le pourcentage correspondant.

### **P.E.3.3 Mise en œuvre de l'extrudeur BC 21 pour le fractionnement aqueux de graines entières**

Les étapes à effectuer sont les suivantes :

- Les températures de consigne des modules du fourreau sont fixées
- Le moteur des vis est allumé, à une vitesse faible
- Le doseur d'alimentation en graines est allumé, à une fréquence faible
- La pompe d'eau est allumée à une fréquence faible une fois que les filtrâts d'expression et extrudâts commencent à s'écouler
- La vitesse de rotation des vis et la fréquence du doseur sont lentement augmentées jusqu'à atteindre leurs valeurs de consigne
- L'extrudât solide (tourteau gras) commence à s'écouler
- L'appareil est stabilisé pendant 15 à minutes
- Le filtrât et l'extrudât sont prélevés pendant 2 fois 10 minutes pour chaque essai.

### **P.E.3.4 Détermination de la distribution des temps de séjour**

#### **P.E.3.4.1 Protocole employé pour la détermination des temps de séjour**

250 grammes de graines broyées sont mises en contact avec 500 mL d'une solution d'érythrosine à 1% dans l'eau distillée pendant 24 heures. La matière est ensuite séchée à 103°C.

Pour la détermination du temps de séjour, 5 grammes de matière colorée sont introduits au sein l'extrudeur bi-vis. Cette introduction est considérée comme une impulsion de Dirac, ne perturbant pas l'équilibre de l'extrudeur. Dès l'introduction de la matière colorée, les sorties liquide (filtrât) et solide (extrudât) sont prélevées toutes les 10 secondes pendant 6 minutes.

Les extraits liquides sont stockés à +4°C jusqu'à analyse, et les extraits solides sont séchés à 103°C puis finement broyés à l'aide d'un moulin à café électrique.

#### **P.E.3.4.2 Traceur employé**

La méthode employée se base sur celle décrite dans la thèse de Philippe EVON (Evon, 2008). La matière introduite dans la bi-vis est imprégnée d'un traceur coloré,

l'érythrosine (colorant E127). Il s'agit en fait d'un sel di-sodique de tétraiodofluoréscine. Il a été choisi du fait de sa neutralité vis à vis du procédé, et parce que sa couleur rouge vif permet une bonne coloration des matières colorées pouvant être assez sombres.

#### **P.E.3.4.3 Conditions de mesure de la coloration**

La détermination de la concentration en traceur se fait par une méthode colorimétrique. L'appareil utilisé est un colorimètre Minolta. Il est constitué d'un capteur associé à des filtres et d'un microprocesseur. Le principe de la mesure repose sur les valeurs tristimulus XYZ. La visualisation des mesures s'effectue dans l'espace  $L^*a^*b^*$ . L indique la clarté du milieu, tandis que  $a^*$  et  $b^*$  correspondent aux coordonnées de la chromacité, et indiquent le sens des couleurs :

+ $a^*$  vers le rouge, - $a^*$  vers le vert, + $b^*$  vers le jaune et - $b^*$  vers le bleu.

Dans le cas de ces travaux, le temps de séjour est calculé selon la valeur de  $a^*$ , qui est dans ce cas là uniquement apportée par l'érythrosine.

Lorsque les matières à analyser sont des liquides, ils sont disposés dans des cuves en plastique adaptées au colorimètre, et la le colorimètre est posé sur la cuve. La lecture est donc effectuée par dessus l'échantillon. Au contraire, les solides broyés sont disposés dans des boîtes de Pétri, qui sont posées sur le colorimètre. La lecture est donc effectuée par dessous l'échantillon, le flash traverse l'échantillon.

L'appareil effectue cinq mesures successives, et les valeurs de L,  $a^*$  et  $b^*$  sont notées pour chaque échantillon.

#### **P.E.3.4.4 Calculs des grandeurs caractéristiques**

Dans le cas de l'utilisation de l'érythrosine, il est possible de tracer la courbe représentant la variation de la valeur  $a^*$  en fonction du temps. Cependant, des calculs complémentaires peuvent être faits afin de préciser le temps de séjour.

La ligne de base est rectifiée en calculant la moyenne des valeurs de  $a^*$  des points qui suivent le pic

Les valeurs de  $C(t)$  (concentration en traceur) sont corrigées en soustrayant la valeur de la ligne de base à la valeur de  $a^*$

La fonction  $C(t)$  est intégrée par la méthode des trapèzes, ce qui donne la fonction de détermination de temps de séjour  $E(t)$ .

$$E(t) = \frac{C(t)}{\sum C(t)X \Delta t}$$

$$\text{Avec } \Sigma(t) \times \Delta(t) = C(t_0)X \frac{t_1-t_0}{2} + \sum_{i=1}^{n-1} C(t_i) X \frac{t_{i+1}-t_i-1}{2} + C(t_n)X \frac{t_n-t_{n-1}}{2}$$

C(t) est la concentration en traceur dans l'échantillon prélevé à l'instant t.

$\Delta t$  est la période d'échantillonnage

Le temps de séjour moyen d'une phase correspond à la somme des moments d'ordre 1 calculés pour chaque prélèvement.

### P.E.3.4.5 Détermination de la répartition massique de solide sec

Le volume libre des éléments de vis correspondant au volume pouvant être occupé par la matière introduite dans l'extrudeur, peut être calculé pour chaque profil de vis. Il dépend du volume occupé par chaque paire d'éléments de vis et est calculé de la manière suivante :

$$V_{\text{libre}} = V_{\text{fourreau}} - V_{\text{paire de vis}}$$

avec  $V_{\text{fourreau}} = S_{\text{fourreau}} \times L_{\text{fourreau}}$

$V_{\text{fourreau}}$  est le volume du fourreau pour chaque élément de vis considéré

$S_{\text{fourreau}}$  est la section transversale du fourreau (811,75 mm<sup>2</sup> pour l'extrudeur bi-vis Clextral BC 21)

$L_{\text{fourreau}}$  est la longueur du fourreau (70 cm pour l'extrudeur bi-vis Clextral BC 21)

Le volume de chaque paire de vis a été déterminé par différence de niveau après immersion dans l'eau d'une paire de chaque élément considéré. Les orifices de passage des arbres ont été bouchés à l'aide de mastic ou de pâte à sel afin de les volumes des arbres de l'extrudeur soient pris en compte dans le calcul.

**Tableau 98 : Volume des éléments de vis pour l'extrudeur Clextral BC 21**

	Notation	Pas (mm)	Longueur (cm)	V vis (cm <sup>3</sup> )	V fourreau (cm <sup>3</sup> )	V libre (cm <sup>3</sup> )	V libre (%)
Vis de convoyage à double filet	T2F 50	50	5	27,5	40,6	13,1	32,3
	C2F 33	33	5	32,0	40,6	8,6	21,2
			2,5	17,7	20,3	2,6	13,0
	C2F 25	25	5	32,2	40,6	8,4	20,7
			2,5	17,2	20,3	3,2	15,5
C2F 16	15	2,5	8,9	20,3	11,5	56,4	
Contrefilets	CFC 2 -33	-33	5	31,0	40,6	9,7	23,8
	CFC 2 -16	-16	5	31,2	40,6	9,4	23,2
Éléments restrictifs	Mal 0 +	/	0,5	3,4	4,06	0,7	16,2
	Mal 0-	/	0,5	3,4	4,06	0,7	16,2

Le niveau de remplissage de chaque zone du profil de vis peut être évaluée en fonction du volume libre de la zone ainsi que de la masse de solide sec récupéré dans la zone. Cette grandeur calculée est la densité apparente :

$$d_{apparente} = \frac{m_{sec}}{V_{libre}}$$

## P.E.4 Caractérisation des émulsions

### P.E.4.1 Microscopique optique

Le microscope optique Nikon eclipse E600 lui même est équipé d'une caméra reliée au logiciel NIS-Elements BR d'exploitation des images. Les échantillons sont disposés entre lame (porte-objets) et lamelle. Les images obtenues permettent l'observation des gouttelettes composant la phase dispersée des fractions analysées. Une barre d'échelle peut être ajoutée sur la capture d'écran. Le logiciel associé au microscope permet une mesure manuelle du diamètre des gouttelettes, qui sera ainsi représenté sous forme d'histogramme.

### P.E.4.2 Analyse enthalpique différentielle

La DSC (differential scanning calorimetry) ou analyse enthalpique différentielle est une méthode dans laquelle la matière, conditionnée dans des vials scellés de 40  $\mu$ L, subit des cycles de réchauffement-refroidissement. L'appareil est constitué de deux fours situés au sein d'une enceinte hermétique, balayée par un flux d'azote.

L'échantillon à analyser est placé dans l'un des fours, l'autre contient une capsule vide. Les fours sont chauffés à la même vitesse, suivant une rampe et une température choisies. Dans le cas des émulsions, elles subissent des refroidissements de +50 à -70°C, à 2°C par minute. Quatre cycles de refroidissement réchauffement sont ainsi appliqués à la matière. Le signal collecté correspond au  $\Delta W$  (en Watts) qui est la puissance dépensée par les fours pour les maintenir à la même température. Dans le cas des émulsions, nous nous intéressons particulièrement au pic de cristallisation obtenu lors du refroidissement de l'huile végétale présente dans le milieu. En effet, l'huile sous forme émulsifiée voit sa température de cristallisation plus élevée que celle sous forme libre (bulks).

### P.E.4.3 Conductimétrie

La mesure de la conductimétrie de l'émulsion donne une indication sur la nature de sa phase continue. En effet, selon que la phase continue est de nature conductrice ou pas, la valeur de la conductivité de l'émulsion n'a rien à voir. Une émulsion huile/eau a une valeur de conductivité de l'ordre de quelques mS/cm car sa phase continue, aqueuse,

contient des électrolytes. A l'inverse, si la phase continue de l'émulsion est de l'huile, la conductivité est quasiment négligeable, de l'ordre de quelques  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

## **P.E.5 Travaux sur les fractions protéiques**

### **P.E.5.1 Obtention des fractions protéiques**

Les isolats, ou pseudos-isolats protéiques sont obtenus selon une méthode adaptée de (Tsaliki et al., 2002) destinée aux graines de coton et à la détermination de leurs propriétés émulsifiantes.

Dans le cadre de nos travaux, la matière première de départ était le tourteau, afin de s'affranchir des lipides présents dans les graines et pouvant limiter l'extraction protéique en milieu aqueux. Le tourteau est finement broyé, puis il est mis en contact avec de l'eau déminéralisée à un ratio liquide/solide de 10. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 11 avec une solution de soude afin de permettre l'extraction des protéines. L'ensemble est mis sous agitation sur une plaque agitante avec un barreau aimanté durant 2 heures. Le mélange est ensuite centrifugé à  $8000g$  durant 15 minutes, le surnageant est mis de côté et le culot est récupéré et remis en contact avec de l'eau à un ratio liquide/solide de 5. Le pH est de nouveau ajusté à 11 avec la solution de soude, et une nouvelle étape d'extraction liquide/solide de 2h sous agitation magnétique a lieu.

La solution est centrifugée, à  $8000g$  durant 15 minutes. Le culot n'est pas utilisé, mais le surnageant est mis en commun avec le surnageant récupéré lors de l'étape d'extraction précédent. Le pH de ce mélange de surnageant est ajusté à 4 avec une solution d'acide chlorhydrique à 37%. Cela permet la précipitation des protéines, qui sont ensuite récupérées après la centrifugation de la solution à  $8000g$  durant 15 minutes. La phase protéique correspond au culot formé à l'issue de cette dernière centrifugation.

### **P.E.5.2 Propriétés émulsifiantes des fractions protéiques**

La méthode employée est inspirée décrite par Yasamatsu (Yasumatsu et al., 1972). Les extraits protéiques (1,25 g) sont homogénéisés avec 50 ml d'eau pendant 30 s, avec un homogénéisateur Ultra Turrax à 11 000 tr/min. 25 mL d'huile de tournesol sont ajoutés, et le mélange est homogénéisé de nouveau à 11 000 tr/min pendant 90 s. Le volume de l'émulsion est mesuré 30 s après l'homogénéisation. La capacité émulsionnante CE est exprimée en pourcentage de volume en utilisant la formule suivante :

$$\text{CE} = \text{Volume de l'émulsion après agitation} / \text{Volume total avant agitation} \times 100$$

Les émulsions obtenues sont ensuite divisées de façon égale dans 3 tubes. Le volume de l'émulsion est enregistré à 5, 30, 60, 120 et 300 min après homogénéisation. La stabilité émulsionnante SE est exprimée en pourcentage de volume en utilisant la formule suivante :

SE = Volume de l'émulsion après un temps t/ Volume initial de l'émulsion x 100.

### **P.E.5.3 Propriétés moussantes des fractions protéiques**

Les propriétés moussantes sont mesurées à l'aide de la méthode décrite par Padmashree (Padmashree et al., 1987). 3 g de fraction protéique sont mélangés à 300 mL d'eau dans une éprouvette graduée d'1 litre. La suspension est agitée à 1600 tr/min pendant 5 min à l'aide du Turbotest Raynerie. Le volume est mesuré 30 s après agitation. La capacité moussante CM est exprimée en pourcentage du volume en utilisant la formule suivante

$$CM = (\text{Volume après agitation} - \text{Volume avant agitation}) / \text{Volume avant agitation} \times 100$$

Le volume de mousse est enregistré à 5, 30, 60, 120 et 300 min après agitation. La stabilité moussante SM est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$SM = \text{Volume de la mousse après un temps t} / \text{Volume de la mousse initial} \times 100$$

# Annexes



## Annexes

### A.1 Schémas de fractionnement des graines en presse monovis

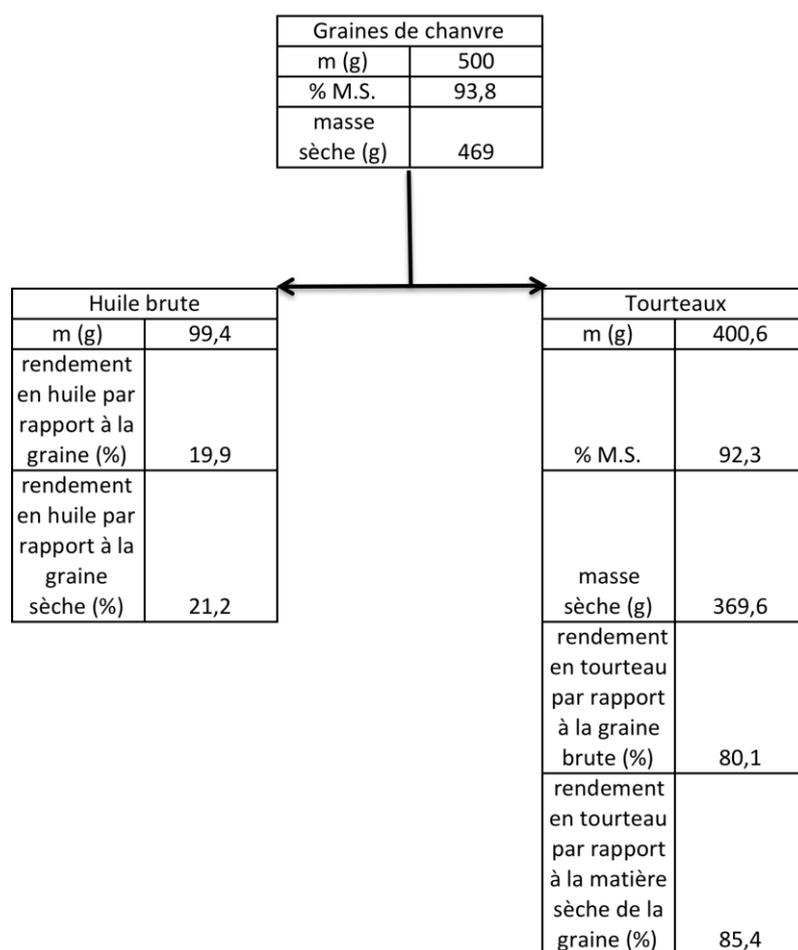


Figure 88 : Fractionnement du chanvre

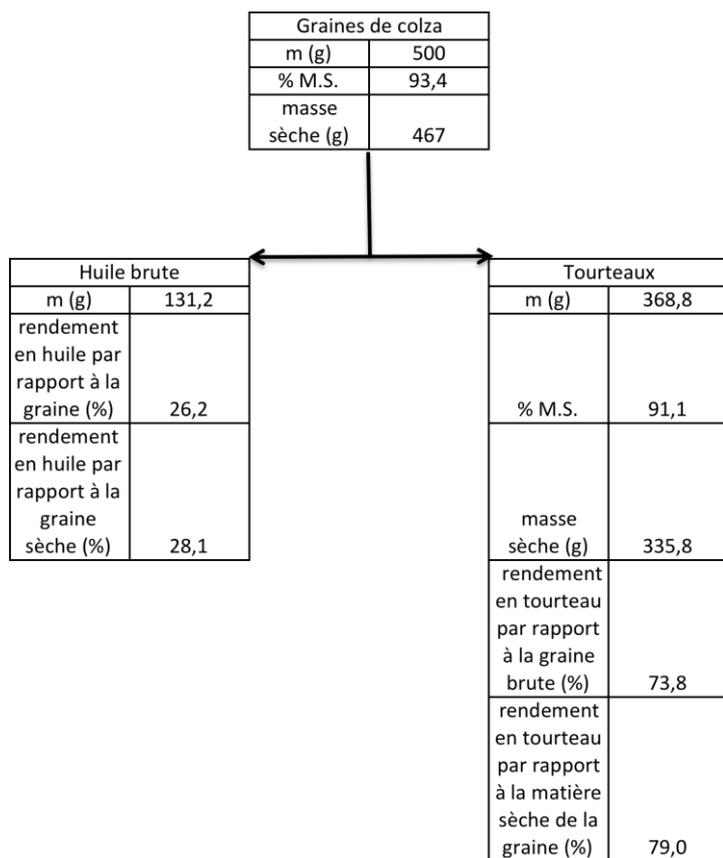


Figure 89 : Fractionnement du colza

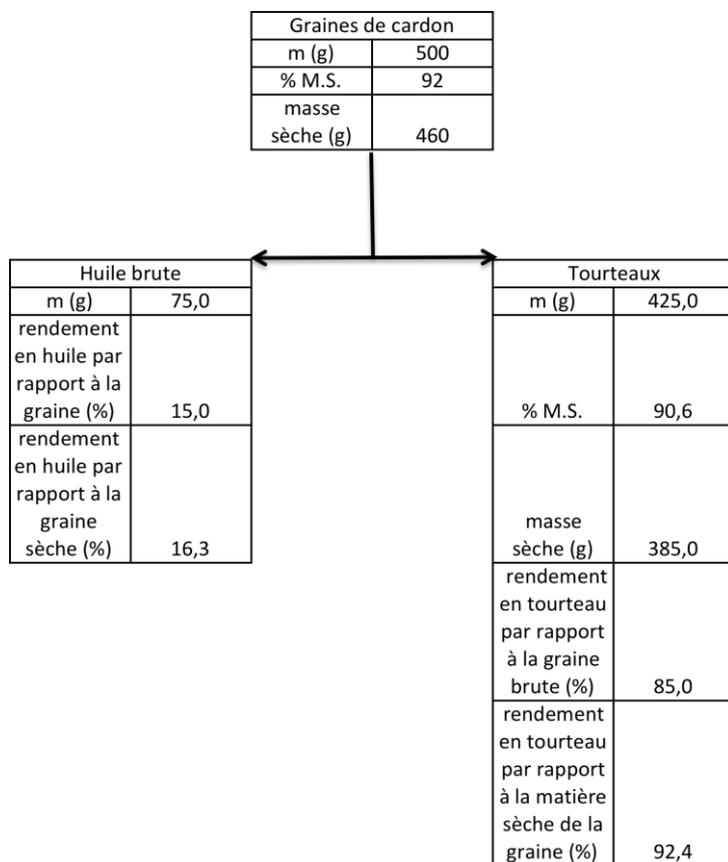


Figure 90 : Fractionnement du cardon

Graines de pastel	
m (g)	500
% M.S.	93,4
masse sèche (g)	467

Huile brute		Tourteaux	
m (g)	112,1	m (g)	387,9
rendement en huile par rapport à la graine (%)	22,4	% M.S.	91,5
rendement en huile par rapport à la graine sèche (%)	24,0	masse sèche (g)	354,9
		rendement en tourteau par rapport à la graine brute (%)	77,6
		rendement en tourteau par rapport à la matière sèche de la graine (%)	83,1

Figure 91 : Fractionnement du pastel

## A.2 Diagrammes ternaires tracés avec les pseudos-isolâts protéiques des graines

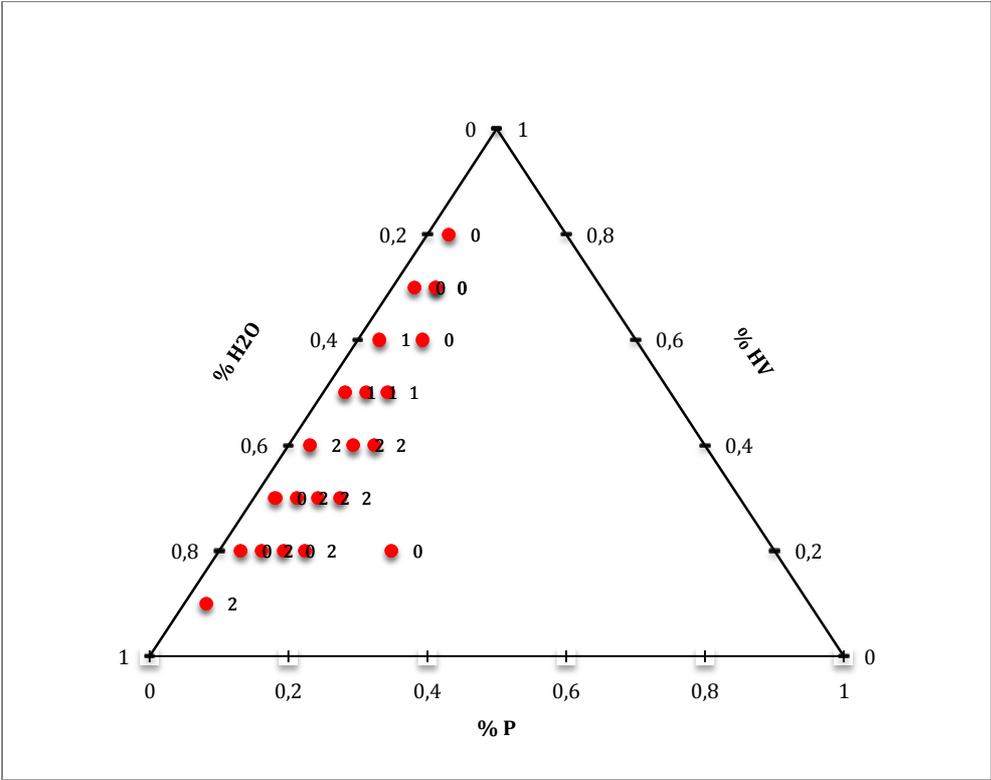


Figure 92 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de chanvre

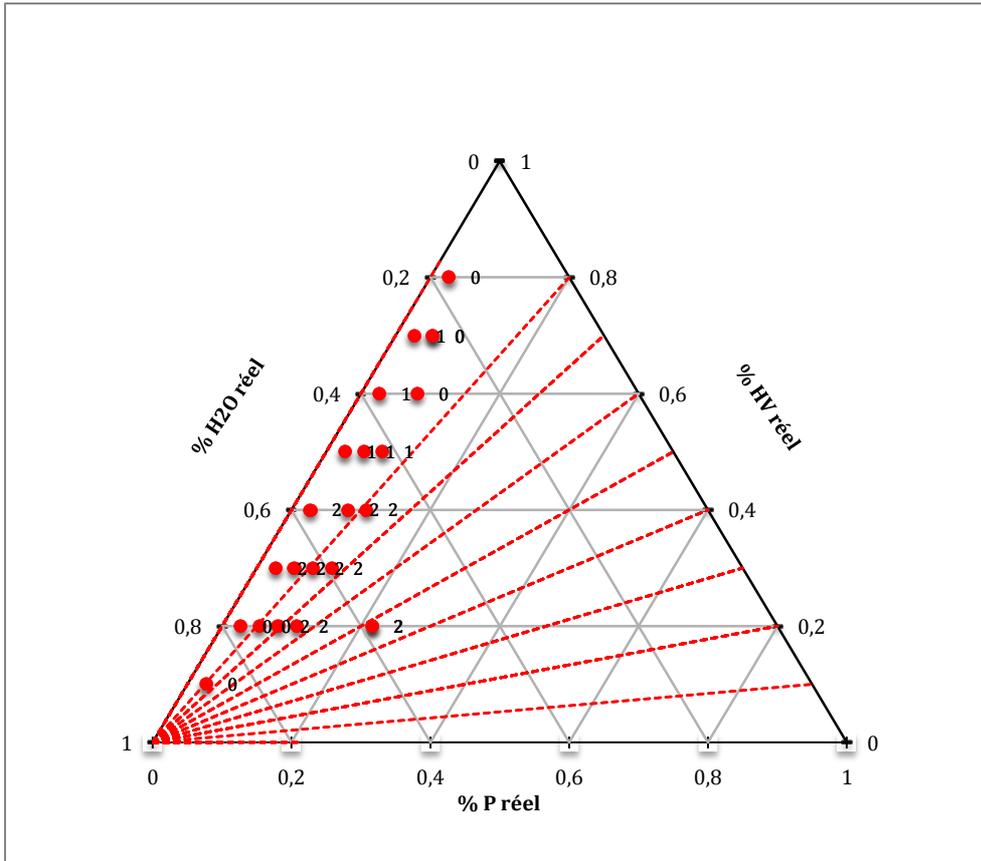


Figure 93 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de pastel

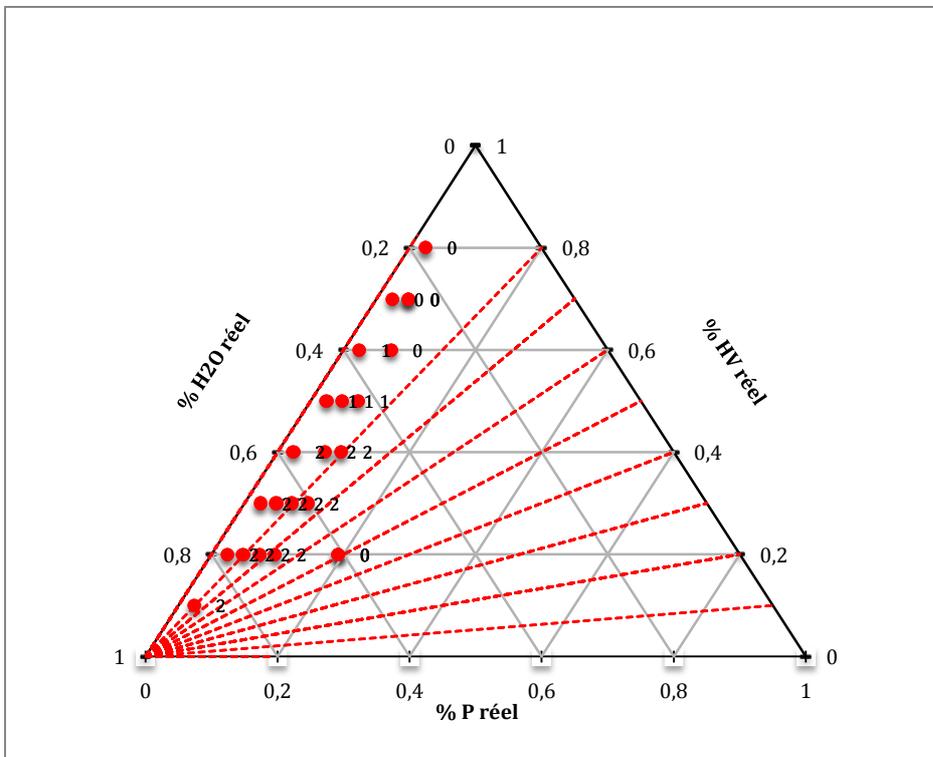


Figure 94 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de Cardon

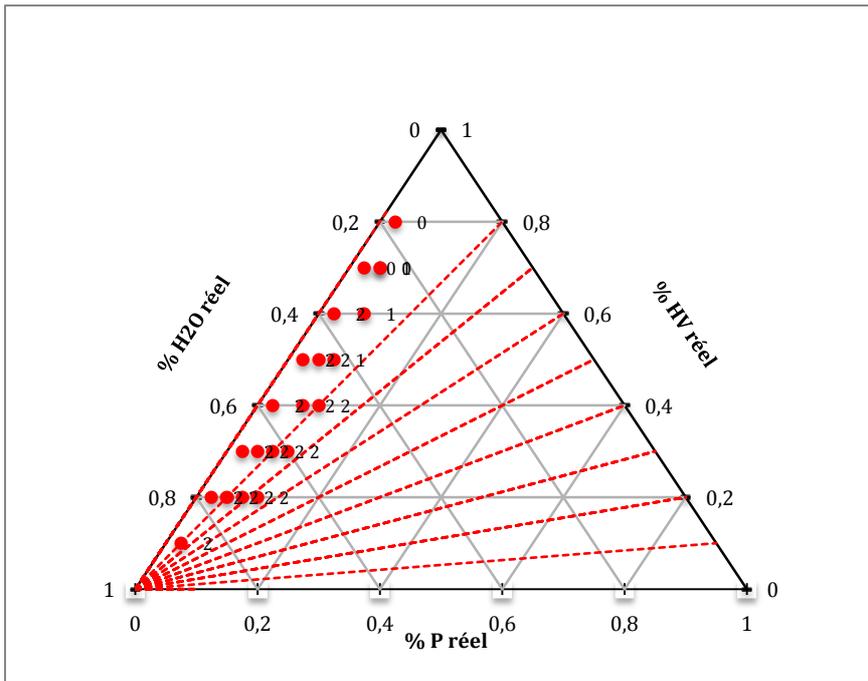


Figure 95 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de Colza

# Références bibliographiques



## Références bibliographiques

Al-Saidan, S.M., Krishnaiah, Y.S.R., Patro, S.S., and Satyanaryana, V. (2005). In vitro and in vivo evaluation of guar gum matrix tablets for oral controlled release of water-soluble diltiazem hydrochloride. *AAPS PharmSciTech* 6, E14-21.

Amalia Kartika, I., Pontalier, P.Y., and Rigal, L. (2010). Twin-screw extruder for oil processing of sunflower seeds: Thermo-mechanical pressing and solvent extraction in a single step. *Ind. Crops Prod.* 32, 297–304.

Amid, B.T., and Mirhosseini, H. (2012). Emulsifying activity, particle uniformity and rheological properties of a natural polysaccharide-protein. *Food Biophys.* 7, 317–328.

Anwar, F., Latif, S., and Ashraf, M. (2006). Analytical characterization of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil from different agro-ecological zones of Pakistan. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83, 323–329.

Attoumbré, J., Bienaimé, C., Dubois, F., Fliniaux, M.-A., Chabbert, B., and Baltora-Rosset, S. (2010). Development of antibodies against secoisolariciresinol – Application to the immunolocalization of lignans in *Linum usitatissimum* seeds. *Phytochemistry* 71, 1979–1987.

Bani-Jaber, A., and Al-Ghazawi, M. (2005). Sustained Release Characteristics of Tablets Prepared with Mixed Matrix of Sodium Carrageenan and Chitosan: Effect of Polymer Weight Ratio, Dissolution Medium, and Drug Type. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31, 241–247.

Barrabino, A., Keleşoğlu, S., Sørland, G.H., Simon, S., and Sjöblom, J. (2014). Phase inversion in emulsions studied by low field NMR. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 443, 368–376.

Barth, C.A. (2009). Nutritional value of rapeseed oil and its high oleic/low linolenic variety – A call for differentiation. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 111, 953–956.

Beerling, J., and Gough, T. (2013). Clean and green : a review of modern day surfactants and emulsifiers. *Cosmet. Toilet.* 128, 566–573.

Bemiller, J.N., Whistler, R.L., Barkalow, D.G., and Chen, C.-C. (1993). Aloe, Chia, Flaxseed, Okra, Psyllium seed, Quince seed, and Tamarind gums. In *Industrial Gums*, (Elsevier), pp. 227–256.

Beneke, C.E., Viljoen, A.M., and Hamman, J.H. (2009). Polymeric Plant-derived Excipients in Drug Delivery. *Molecules* 14, 2602–2620.

Berghout, J.A.M., Pelgrom, P.J.M., Schutyser, M.A.I., Boom, R.M., and van der Goot, A.J. (2015). Sustainability assessment of oilseed fractionation processes: A case study on lupin seeds. *J. Food Eng.* 150, 117–124.

- Black, R.E., Hurley, F.J., and Havery, D.C. (2001). Occurrence of dioxane in cosmetic raw materials and finished cosmetic products. *J. AOAC Int.* 666–670.
- Blumenkrantz, N., and Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489.
- Blümich, B., Casanova, F., and Appelt, S. (2009). NMR at low magnetic fields. *Chem. Phys. Lett.* 477, 231–240.
- Bon, S.A.F., and Colver, P.J. (2007). Pickering miniemulsion polymerization using laponite clay as a stabilizer. *Langmuir* 23, 8316–8322.
- Bouvier, J.-M., and Guyomard, P. (1997). Method and installation for continuous extraction of a liquid contained in a raw material.
- Cajarville, C., González, J., Repetto, J., Alvir, M., and Rodríguez, C. (2000). Nutritional evaluation of cardoon (*Cynara cardunculus*) seed for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 203–213.
- Callaway, J.C. (2004). Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140, 65–72.
- Cardon, D., and Du Chatenet, G. (1990). Guide des teintures naturelles : Plantes-lichens, champignons, mollusques et insectes. In *Guide Des Teintures Naturelles : Plantes-Lichens, Champignons, Mollusques et Insectes*, (Delachaux et Nestlé), p.
- Carneiro, C. da S., Mársico, E.T., Ribeiro, R. de O.R., Conte-Júnior, C.A., Mano, S.B., Augusto, C.J.C., and Oliveira de Jesus, E.F. (2016). Low-Field Nuclear Magnetic Resonance (LF NMR 1H) to assess the mobility of water during storage of salted fish (*Sardinella brasiliensis*). *J. Food Eng.* 169, 321–325.
- Carneiro, G.F., Silva, R.C., Barbosa, L.L., Freitas, J.C.C., Sad, C.M.S., Tose, L.V., Vaz, B.G., Romão, W., de Castro, E.V.R., Neto, A.C., et al. (2015). Characterisation and selection of demulsifiers for water-in-crude oil emulsions using low-field 1H NMR and ESI-FT-ICR MS. *Fuel* 140, 762–769.
- Celhay, C., Mathieu, C.E., Candy, L., Vilarem, G., and Rigal, L. (2014). Aqueous extraction of polyphenols and antiradicals from wood by-products by a twin-screw extractor: Feasibility study. *Comptes Rendus Chim.* 17, 204–211.
- Chapuis, A., Blin, J., Carré, P., and Lecomte, D. (2014). Separation efficiency and energy consumption of oil expression using a screw-press: The case of *Jatropha curcas* L. seeds. *Ind. Crops Prod.* 52, 752–761.
- Chen, H.-H., Xu, S.-Y., and Wang, Z. (2006). Gelation properties of flaxseed gum. *J. Food Eng.* 77, 295–303.
- Chevalier, Y., and Bolzinger, M.-A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles : Pickering emulsions. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 439, 23–34.

Clausse, D., Gomez, F., Pezron, I., Komunjer, L., and Dalmazzone, C. (2005). Morphology characterization of emulsions by differential scanning calorimetry. *Adv. Colloid Interface Sci.* *117*, 59–74.

Colas, D. (2012). Etude de la bioraffinerie des plantes vertes: application au fractionnement des protéines de luzerne par extrusion bi-vis et chromatographie hydrophobe. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Cornacchia, L., and Roos, Y.H. (2011). Lipid and water crystallization in protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* *25*, 1726–1736.

Cui, W., and Mazza, G. (1996). Physicochemical characteristics of flaxseed gum. *Food Res. Int.* *29*, 397–402.

Cui, W., Mazza, G., and Biliaderis, C.G. (1994). Chemical Structure, Molecular Size Distributions, and Rheological Properties of Flaxseed Gum. *J. Agric. Food Chem.* *42*, 1891–1895.

Cui, W., Kenaschuk, E., and Mazza, G. (1996). Influence of genotype on chemical composition and rheological properties of flaxseed gums. *Food Hydrocoll.* *10*, 221–227.

Curt, M.D., Sánchez, G., and Fernández, J. (2002). The potential of *Cynara cardunculus* L. for seed oil production in a perennial cultivation system. *Biomass Bioenergy* *23*, 33–46.

Datta, R., and Bandyopadhyay (2006). A new nasal drug delivery system for diazepam using natural mucoadhesive polysaccharide obtained from tamarind seeds. *Saudi Pharm. J.* *14*, 115–119.

Dickinson, E. (1994). Emulsion Stability. In *Food Hydrocolloids*, K. Nishinari, and E. Doi, eds. (Springer US), pp. 387–398.

Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocoll.* *23*, 1473–1482.

Diederichsen, A., Raney, J.P., and Duguid, S.D. (2006). Variation of Mucilage in Flax Seed and Its Relationship with Other Seed Characters. *Crop Sci.* *46*, 365.

Doumeix, O. (2011). Opérations unitaires en génie biologique: Les émulsions (SCÉRÉN-CNDP-CRDP [Aquitaine]).

DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1951). A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature* *168*, 167.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* *28*, 350–356.

Dunford, N.T. (2015). 2 - Hemp and flaxseed oil: Properties and applications for use in food A2 - Talbot, Geoff. In *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition*, (Woodhead Publishing), pp. 39–63.

Elias, P.M. (1981). Epidermal Lipids, Membranes, and Keratinization. *Int. J. Dermatol.* 20, 1–19.

Evon, P. (2008). Nouveau procédé de bioraffinage du tournesol plante entière par fractionnement thermo-mécano-chimique en extrudeur bi-vis : étude de l'extraction aqueuse des lipides et de la mise en forme du raffinat en agromatériaux par thermoulage. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Evon, P., Vandebossche, V., Pontalier, P.Y., and Rigal, L. (2007). Direct extraction of oil from sunflower seeds by twin-screw extruder according to an aqueous extraction process: Feasibility study and influence of operating conditions. *Ind. Crops Prod.* 26, 351–359.

Evon, P., Vandebossche, V., Pontalier, P.Y., and Rigal, L. (2009). Aqueous extraction of residual oil from sunflower press cake using a twin-screw extruder: Feasibility study. *Ind. Crops Prod.* 29, 455–465.

Evon, P., Amalia Kartika, I., Cerny, M., and Rigal, L. (2013). Extraction of oil from jatropha seeds using a twin-screw extruder: Feasibility study. *Ind. Crops Prod.* 47, 33–42.

Fabre, J.F., Lacroux, E., Valentin, R., and Mouloungui, Z. (2014). ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage. *Ind. Crops Prod.*

Fabre, J.F., Lacroux, E., Cerny, M., and Mouloungui, Z. (2015a). Barriers to the release of flaxseed oil bodies and ways of overcoming them. *Oilseeds Fats Crops Lipids* 22.

Fabre, J.-F., Lacroux, E., Valentin, R., and Mouloungui, Z. (2015b). Ultrasonication as a highly efficient method of flaxseed mucilage extraction. *Ind. Crops Prod.* 65, 354–360.

Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., and Abdelly, C. (2008). Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C. R. Biol.* 331, 372–379.

Faye, M. (2010). Nouveau procédé de fractionnement de la graine de Neem (*Azadirachta Indica* A. Juss.) sénégalais : production d'un bio-pesticide d'huile et de tourteau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Fedeniuk, R.W., and Biliaderis, C.G. (1994). Composition and Physicochemical Properties of Linseed (*Linum usitatissimum* L.) Mucilage. *J. Agric. Food Chem.* 42, 240–247.

Fernández, J., Curt, M.D., and Aguado, P.L. (2006). Industrial applications of *Cynara cardunculus* L. for energy and other uses. *Ind. Crops Prod.* 24, 222–229.

Foret, S. (2011). Etude d'un nouveau procédé de fractionnement des co-produits de fabrication de jambon sec et des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des extraits et raffinats. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Frelchowska, J., Bolzinger, M.-A., and Chevalier, Y. (2009). Pickering emulsions with bare silica. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 343, 70–74.

Garti, N. (1999). What can nature offer from an emulsifier point of view: trends and progress? *Colloids Surf. -Physicochem. Eng. Asp.* 152, 125–146.

Geetha, B., Shivalinge Gowda, K.P., Kulkarni, G.T., and Badami, S. (2009). Microwave assisted fast extraction of mucilages and pectins. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 43, 260–265.  
Goddard, E.D., and Gruber, J.V. (1999). *Principles of Polymer Science and Technology in Cosmetics and Personal Care* (CRC Press).

Goh, K.K.T., Pinder, D.N., Hall, C.E., and Hemar, Y. (2006). Rheological and light scattering properties of flaxseed polysaccharide aqueous solutions. *Biomacromolecules* 7, 3098–3103.

Gros, C. (2005). *Extraction aqueuse et athermique de l'huile de lin assistée par décharges électriques de haute tension. Thèse de doctorat. Université de Technologie de Compiègne.*

Gros, C., Lanoisellé, J.-L., and Vorobiev, E. (2003). Towards an Alternative Extraction Process for Linseed Oil. *Chem. Eng. Res. Des.* 81, 1059–1065.

Guyomard, P. (1994). *Etude de faisabilité d'un extrudeur bi-vis en pressage-extrusion de graines oléagineuses. Université de Technologie de Compiègne.*

Hall, C., Fitzpatrick, K.C., and Kamal-Eldin, A. (2009). Flax, Perilla, and Camelina Seed Oils:  $\alpha$ -Linolenic Acid-rich Oils. In *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*, (Elsevier), pp. 151–183.

Hansen, H.S., and Jensen, B. (1985). Essential function of linoleic acid esterified in acylglucosylceramide and acylceramide in maintaining the epidermal water permeability barrier. Evidence from feeding studies with oleate, linoleate, arachidonate, columbinatate and alpha-linolenate. *Biochim. Biophys. Acta* 834, 357–363.

Herchi, W., Bouali, I., Bahashwan, S., Rochut, S., Boukhchina, S., Kallel, H., and Pepe, C. (2012). Changes in phospholipid composition, protein content and chemical properties of flaxseed oil during development. *Plant Physiol. Biochem.* 54, 1–5.

van den Hoogen, B.M., van Weeren, P.R., Lopes-Cardozo, M., van Golde, L.M., Barneveld, A., and van de Lest, C.H. (1998). A microtiter plate assay for the determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 257, 107–111.

Hu, Z.-Y., Hua, W., Zhang, L., Deng, L.-B., Wang, X.-F., Liu, G.-H., Hao, W.-J., and Wang, H.-Z. (2013). Seed Structure Characteristics to Form Ultrahigh Oil Content in Rapeseed. *PLoS ONE* 8.

Iba, N., Talou, T., Delmas, M., Gaset, A., and Mailhol, P. (1992). Extraction, esterification and transesterification of isatis tinctoria oil. *Rev. Fr. Corps Gras* 39, 201–206.

Isobe, S., Zuber, F., Uemura, K., and Noguchi, A. (1992). A new twin-screw press design for oil extraction of dehulled sunflower seeds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 884–889.

Jacquemin, L. (2012). *Production d'hémicelluloses de pailles et de sons de blé à une échelle pilote : étude des performances techniques et évaluation environnementale d'un*

agro-procédé. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Jahreis, G., and Schäfer, U. (2011). Rapeseed (*Brassica napus*) Oil and its Benefits for Human Health. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*, (Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel), p.

Jahreis, G., and Schäfer, U. Rapeseeds (*Brassica napus*) Oil and its Benefits for Human Health.

Jain, J.K., and Dixit, V.K. (1988). Studies on gums and their derivatives as binding agents. *Indian J. Pharm. Sci.* 50, 113.

James Daun, Véronique Barthet, Tricia Chornick, and Scott Duguid (2003). Structure, Composition, and Variety Development of Flaxseed. In *Flaxseed in Human Nutrition*, Second Edition, (AOCS Publishing), p.

Jarrige, R. (1995). *Nutrition des ruminants domestiques: ingestion et digestion* (Editions Quae).

Jeong, H.-S., Kim, H.-Y., Ahn, S.H., Oh, S.C., Yang, I., and Choi, I.-G. (2012). Effects of combination processes on the extraction of pectins from rapeseed cake (*Brassica napus* L.). *Food Chem.* 139.

Jorda, J. (2003). *Etude du procédé d'extraction alcaline et de purification de pectines de pulpe de betterave: étude des propriétés chimiques et physico-chimiques*. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Jorge Gominho, J.F. (2001). *Cynara cardunculus* L. - A new fibre crop for pulp and paper production. *Ind. Crops Prod.* 13, 1–10.

Kadivar, M. (2001). Studies on integrated processes for the recovery of mucilage, hull, oil and protein from solin (low linolenic acid flax).

Kartika, I.A., Pontalier, P.Y., and Rigal, L. (2005). Oil extraction of oleic sunflower seeds by twin screw extruder: influence of screw configuration and operating conditions. *Ind. Crops Prod.* 22, 207–222.

Kato, A., Fujishige, T., Matsudomi, N., and Kobayashi, K. (1985). Determination of Emulsifying Properties of Some Proteins by Conductivity Measurements. *J. Food Sci.* 50, 56-.

Krešić, G., Lelas, V., Jambrak, A.R., Herceg, Z., and Brnčić, S.R. (2008). Influence of novel food processing technologies on the rheological and thermophysical properties of whey proteins. *J. Food Eng.* 87, 64–73.

Križková, L., Mučaji, P., Nagy, M., and Krajčovič, J. (2004). Triterpenoid cynarasaponins from *Cynara cardunculus* L. reduce chemically induced mutagenesis in vitro. *Phytomedicine* 11, 673–678.

Kukić, J., Popović, V., Petrović, S., Mucaji, P., Ćirić, A., Stojković, D., and Soković, M. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chem.* *107*, 861–868.

Lacaze-Dufaure, C. (1998). Fractionnement du tournesol oléique : expression et transformations chimiques des triglycérides de graines en esters lubrifiants et adjuvants en réacteur conventionnel et réacteur bi-vis. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Lacaze-Dufaure, C., Mouloungui, Z., Leyris, J., Rigal, L., Gaset, A., and Silvestre, F. (1996). Procédé et dispositif pour la fabrication d'esters d'acides gras à partir de graines oléagineuses.

Laredj-Bourezg, F., Chevalier, Y., Boyron, O., and Bolzinger, M.-A. (2012). Emulsions stabilized with organic solid particles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* *413*, 252–259.

Lauth, C., Le Joliff, J.-C., and Thierry, O. Mélange d'huiles végétales riche en acides gras essentiels et son utilisation dans les compositions cosmétiques.

Li, L., Lanoisellé, J.-L., Ding, L., and Clause, D. (2009). Extraction aqueuse d'huile végétale de tourteaux oléagineux. *Récents Prog. En Génie Procédés* *69-1-69-6*.

Li, S.-Y., Stuart, J.D., Li, Y., and Parnas, R.S. (2010). The feasibility of converting *Cannabis sativa* L. oil into biodiesel. *Bioresour. Technol.* *101*, 8457–8460.

Liang, H.-N., and Tang, C.-H. (2013). pH-dependent emulsifying properties of pea [*Pisum sativum* (L.)] proteins. *Food Hydrocoll.* *33*, 309–319.

Luan, F., Liu, H., Gao, Y., Li, Q., Zhang, X., and Guo, Y. (2009). Prediction of hydrophile–lipophile balance values of anionic surfactants using a quantitative structure–property relationship. *J. Colloid Interface Sci.* *336*, 773–779.

Lyons, J., Devine, D., Kennedy, J., Geever, L., Osullivan, P., and Higginbotham, C. (2006). The use of Agar as a novel filler for monolithic matrices produced using hot melt extrusion. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* *64*, 75–81.

Maccarone, E., Fallico, B., Fanella, F., Mauromicale, G., Raccuia, S.A., and Foti, S. (1999). Possible alternative utilization of *Cynara* spp.: II. Chemical characterization of their grain oil. *Ind. Crops Prod.* *10*, 229–237.

Macquet, A. (2007). Caractérisation de mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans la production de mucilage par le tégument de la graine. Thèse de doctorat. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement/AgroParisTech.

Magro, C. (1995). Valorisation des pailles de blé par fractionnement thermo-mécano-chimique dans un réacteur bivis. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Manolas, C. (1993). Fractionnement du sorgho à fibres : extraction et caractérisation des

hémicelluloses de la moelle, étude des matériaux composites. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Maréchal, P. (2001). Analyse des principaux facteurs impliqués dans le fractionnement combiné de pailles et de sons de blé en extrudeur bi-vis : obtention d'agro-matériaux. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Mechling, E. (2002). Mise au point d'un réacteur multitâches adapté à la production des composés oléophiles à partir des milieux réactionnels issus des graines oléagineuses. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Mills, N. (2012). Natural personal care : regional market analysis and competitive brand assesment (New York).

Monsigny, M., Petit, C., and Roche, A.-C. (1988). Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Anal. Biochem.* *175*, 525–530.

Montserrat-de la Paz, S., Marín-Aguilar, F., García-Giménez, M.D., and Fernández-Arche, M.A. (2014). Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil: Analytical and Phytochemical Characterization of the Unsaponifiable Fraction. *J. Agric. Food Chem.* *62*, 1105–1110.

Morice, J., and Karleskind, A. (1992). Manuel des corps gras. In *Manuel Des Corps Gras*, (Paris), pp. 123–131.

Myers, D. (1999). Chapitre 11-Emulsions. In *Surfaces, interfaces and colloids : principes and applications*, second edition, pp. 253–294.

N'Diaye, S. (1996). Fractionnement de la matière végétale : mise au point d'un procédé thermo-mécanochimique et modélisation du fonctionnement du réacteur bi-vis. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.

Nielloud, F. (2000). *Pharmaceutical Emulsions and Suspensions: Second Edition, Revised and Expanded* (CRC Press).

Nii, T., and Ishii, F. (2004). Properties of various phosphatidylcholines as emulsifiers or dispersing agents in microparticle preparations for drug carriers. *Colloids Surf. B Biointerfaces* *39*, 57–63.

Nykter, M., Kymäläinen, H.-R., Gates, F., and Sjöberg, A.-M. (2006). Quality characteristics of edible linseed oil. *Agric. Food Sci.* *15*, 402–413.

Odani, S., and Odani, S. (1998). Isolation and primary structure of a methionine- and cystine-rich seed protein of *Cannabis sativa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *62*, 650–654.

Oguri, M., Gooris, G.S., Bito, K., and Bouwstra, J.A. (2014). The effect of the chain length distribution of free fatty acids on the mixing properties of stratum corneum model membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1838*, 1851–1861.

O'Mullane, J.E., and Hayter, I.P. (1993). Linseed mucilage. p. 29.

- Oomah, B.D., and Sitter, L. (2009). Characteristics of flaxseed hull oil. *Food Chem.* *114*, 623–628.
- Padmashree, T.S., Vijayalakshmi, L., and Puttaraj, S. (1987). Effect of traditional processing on the functional properties of cowpea (*Vigna catjang*) flour. *Assoc. Food Sci. Technol.* *221–225*.
- Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., and Williamson, G. (2011). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chem.* *126*, 417–422.
- Pinelli, P., Agostini, F., Comino, C., Lanteri, S., Portis, E., and Romani, A. (2007). Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. *Food Chem.* *105*, 1695–1701.
- Prajapati, V.D., Jani, G.K., Moradiya, N.G., and Randeria, N.P. (2013). Pharmaceutical applications of various natural gums, mucilages and their modified forms. *Carbohydr. Polym.* *92*, 1685–1699.
- Prat, L. (1998). Modélisation d'un réacteur thermo-mécano-chimique bi-vis utilisé en fractionnement de la matière végétale. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Raccuia, S.A., and Melilli, M.G. (2010). Seasonal dynamics of biomass, inulin, and water-soluble sugars in roots of *Cynara cardunculus* L. *Field Crops Res.* *116*, 147–153.
- Rathi, P., Patil, K., and Yeole, P. (2013). Role of gums and mucilages as excipients : a review. *Int. J. Univers. Pharm. Life Sci.* *3*, 54–62.
- Rebolé, A., Rodríguez, M.L., Ortiz, L.T., Alzueta, C., Centeno, C., and Treviño, J. (2002). Mucilage in linseed: effects on the intestinal viscosity and nutrient digestion in broiler chicks. *J. Sci. Food Agric.* *82*, 1171–1176.
- Reversat, G. (1976). Etude de la composition biochimique globale des juvéniles des nématodes *Meloidogyne javanica* et *Heterodera oryzae*. *Cah. ORSTOM Série Biol. Nématologie* *11*, 225–234.
- Rigal, L. (1997). Technologie d'extrusion bi-vis et fractionnement de la matière végétale. In *40 Ans D'extrusion Chez Clextal*, p.
- Rigal, M. (2015). Éco-conception de matériaux pour la construction à partir de la valorisation de la biomasse présente sur le territoire de CCCE : Etude des propriétés chimiques et physico-chimiques de matrices fibreuses et de fractions extractibles, pour leur mise en œuvre en vue de l'obtention d'agromatériaux pour le secteur des éco industries. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Rombaut, N. (2013). Etude comparative de trois procédés d'extraction d'huile : aspects qualitatifs et quantitatifs : application aux graines de lin et aux pépins de raisin. Université de Technologie de Compiègne.

Rombaut, N., Savoire, R., Thomasset, B., Castello, J., Van Hecke, E., and Lanoisellé, J.-L. (2015). Optimization of oil yield and oil total phenolic content during grape seed cold screw pressing. *Ind. Crops Prod.* *63*, 26–33.

Rowe, R.C., Sheskey, P.J., and Quinn Marian E (2009). *Handbook of pharmaceutical excipients*.

Russo, G.L. (2009). Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem. Pharmacol.* *77*, 937–946.

Salager, J.L., Loaiza-Maldonado, I., Minana-Perez, M., and Silva, F. (1982). Surfactant-Oil-Water Systems Near the Affinity Inversion Part I: Relationship Between Equilibrium Phase Behavior and Emulsion Type and Stability. *J. Dispers. Sci. Technol.* *3*, 279–292.

Salunkhe, D.K. (1992). *World Oilseeds* (Springer Science & Business Media).

Santos, H., Veiga, F., Pina, M.E., and Sousa, J.J. (2005). Compaction, compression and drug release properties of diclofenac sodium and ibuprofen pellets comprising xanthan gum as a sustained release agent. *Int J Pharm* *295*, 15–27.

Savoire, R., Lanoisellé, J.-L., Ducatel, H., and Vorobiev, E. (2008). Oil yield and compressibility modeling during microscale expression: Criteria for linseed breeding - Savoire. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* - *110*, 725–734.

Savoire, R., Lanoisellé, J.-L., and Vorobiev, E. (2013). Mechanical continuous oil expression from oilseeds : a review. *Food Bioprocess Technol.* *6*, 1–16.

Secchi, G. (2008). Role of proteins in cosmetics. *Clin. Dermatol.* *26*, 321–325.

Shahidi, F. (1990). *Canola and Rapeseed: Production, Chemistry, Nutrition, and Processing Technology* (Springer Science & Business Media).

Silva, S. (2005). Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chem.* *89*, 19–26.

Silvestre, F., Rigal, L., Leyris, J., and Gaset, A. Colle à l'eau à base d'extrait protéique végétal et procédé de préparation.

Sriti, J., Talou, T., Faye, M., Vilarem, G., and Marzouk, B. (2011). Oil extraction from coriander fruits by extrusion and comparison with solvent extraction processes. *Ind. Crops Prod.* *33*, 659–664.

Sriti, J., Msaada, K., Talou, T., Faye, M., Kartika, I.A., and Marzouk, B. (2012). Extraction of coriander oil by twin-screw extruder: Screw configuration and operating conditions effect. *Ind. Crops Prod.* *40*, 355–360.

Suttiprasit, P., Al-Malah, K., and McGuire, J. (1993). On evaluating the emulsifying

- properties of protein using conductivity measurements. *Food Hydrocoll.* 7, 241–253.
- Szymanowski, J., and Beger, J. (1987). The estimation of hydrophile—lipophile balance from solubility and polarity data. *J. Colloid Interface Sci.* 119, 286–288.
- Teglia, A., and Secchi, G. (1994). Evaluation of the protective efficacy of proteins and mild tensides against the adverse cutaneous effects of anionic detergents by means of transepidermal water loss (TEWL) and profilometric measurements. In XVIII IFSCC Congress, (Venezia), pp. 662–680.
- Teglia, A., Mazzola, G., and Secchi, G. (1993). Chemical characteristics and cosmetic properties of protein hydrolysates. *Cosmet. Toilet.* 108, 56–65.
- Teh, S.-S., and Birch, J. (2013). Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* 30, 26–31.
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., and McClements, D.J. (2004a). Influence of emulsifier type on freeze-thaw stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions. *Food Hydrocoll.* 18, 1033–1043.
- Thanasukarn, P., Pongsawatmanit, R., and McClements, D.J. (2004b). Impact of fat and water crystallization on the stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 246, 49–59.
- Tsaliki, E., Kechagia, U., and Doxastakis, G. (2002). Evaluation of the foaming properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocoll.* 16, 645–652.
- Tsaliki, E., Pegiadou, S., and Doxastakis, G. (2004). Evaluation of the emulsifying properties of cottonseed protein isolates. *Food Hydrocoll.* 18, 631–637.
- Turowski, A., and Adelman-Grill, B.C. (1985). Substantivity to hair and skin of I-labelled collagen hydrolysates under application simulating conditions. *Int. J. Cosmet. Sci.* 7, 71–84.
- Uitterhaegen, E., Nguyen, Q.H., Sampaio, K.A., Stevens, C.V., Merah, O., Talou, T., Rigal, L., and Evon, P. (2015). Extraction of Coriander Oil Using Twin-Screw Extrusion: Feasibility Study and Potential Press Cake Applications. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 92, 1219–1233.
- Vaca Medina, G. (2010). Elaboration des émulsions natives issues des graines oléoprotéagineuses et transformation catalytique de la fraction lipidique en biolubrifiants écolabellissables. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Van Soest, P.J., and Wine, R.H. (1967). Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell-wall constituents. *J. Assn. Off. Chem.*
- Vandeputte, J. (2012). Les agro-tensioactifs. *OCL* 133–137.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., and Shahidi, F. (1997). Removal of flaxseed mucilage by chemical and enzymatic treatments. *Food Chem.* 59, 47–55.

- Wang, W., Waterhouse, G.I.N., and Sun-Waterhouse, D. (2013). Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. *Food Res. Int.* *54*, 837–851.
- Wang, X.-S., Tang, C.-H., Yang, X.-Q., and Gao, W.-R. (2008). Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (*Cannabis sativa* L.) proteins. *Food Chem.* *107*, 11–18.
- Warr, J., Michaud, P., Picton, L., Muller, G., Courtois, B., Ralainirina, R., and Courtois, J. (2003). Large-Scale Purification of Water-Soluble Polysaccharides from Flaxseed Mucilage, and Isolation of a New Anionic Polymer. *Chromatographia* *58*, 331–335.
- Warrand, J., Michaud, P., Picton, L., Muller, G., Courtois, B., Ralainirina, R., and Courtois, J. (2005). Structural investigations of the neutral polysaccharide of *Linum usitatissimum* L. seeds mucilage. *Int. J. Biol. Macromol.* *35*, 121–125.
- Wijendran, V., and Hayes, K.C. (2004). Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu. Rev. Nutr.* *24*, 597–615.
- Wu, M., Li, D., Wang, L., Zhou, Y., and Mao, Z. (2010). Rheological property of extruded and enzyme treated flaxseed mucilage. *Carbohydr. Polym.* *80*, 460–466.
- Yang, Y., and McClements, D.J. (2013). Encapsulation of vitamin E in edible emulsions fabricated using a natural surfactant. *Food Hydrocoll.* *30*, 712–720.
- Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., and Ishii, K. (1972). Whipping and Emulsifying Properties of Soybean Products. *Agric. Biol. Chem.* *36*, 719–727.
- Zeitoun, R. (2011). Procédés de fractionnement de la matière végétale : application à la production des polysaccharides du son et de la paille de blé. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Zhang, Q.-T., Tu, Z.-C., Xiao, H., Wang, H., Huang, X.-Q., Liu, G.-X., Liu, C.-M., Shi, Y., Fan, L.-L., and Lin, D.-R. (2014). Influence of ultrasonic treatment on the structure and emulsifying properties of peanut protein isolate. *Food Bioprod. Process.* *92*, 30–37.
- Zhang, W., Xu, S., Wang, Z., Yang, R., and Lu, R. (2009). Demucilaging and dehulling flaxseed with a wet process. *LWT - Food Sci. Technol.* *42*, 1193–1198.

## Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'un tensioactif.....	17
Figure 2 : Représentation schématique d'une émulsion en présence d'un émulsifiant ...	18
Figure 3 : Origines des émulsifiants retrouvés sur la base de données COSMOS (2013)	23
Figure 4 : Structure d'un liposome, d'une micelle et d'une bicouche lipidique.....	31
Figure 5 : Structure de la solaline, une saponine .....	32
Figure 6 : Représentation schématique des particules à l'interface dans une émulsion de Pickering.....	33
Figure 7 : Représentations schématiques de différents types d'émulsion H/E, E/H et E/H/E .....	37
Figure 8 : Déstabilisation des émulsions (source Lum France) .....	37
Figure 9 : Variation de la conductivité d'une émulsion lors de l'ajout de sels ou de tensioactifs.....	40
Figure 10 : Thermogrammes obtenus lors du refroidissement de l'huile de palme hydrogénée (HPKO) et de l'huile de tournesol (SO) (Cornacchia and Roos, 2011)..	42
Figure 11 : Cristallisation de l'huile de palme après 3 cycles de refroidissement de + 40°C à -20°C successifs (d'après Thanasukarn et al., 2004b).....	43
Figure 12 : Influence de la nature de l'émulsifiant sur la cristallisation de l'huile de palme en émulsion (d'après Thanasukarn et al., 2004b).....	44
Figure 13 : Influence de la température de refroidissement sur la déstabilisation de l'émulsion.....	44
Figure 14 : Stabilité en lien avec la disponibilité de l'eau (Document Cerevaa).....	46
Figure 15 : Structure schématique d'une graine angiosperme dicotylédone : (a) : tégument, (b) : albumen, (c) : cotylédon, (d) : embryon.....	48
Figure 16 : Planche botanique du chanvre .....	50
Figure 17 : Surfaces de chanvre en France en 2012 (source : Terres inovia).....	51
Figure 18 : Structure de la graine de chanvre .....	52
Figure 19 : Planche botanique du colza .....	55
Figure 20 : Coupe d'une graine de colza .....	56
Figure 21 : Production du colza en France (2012) (source : CETIOM/Terres inovia) .....	57
Figure 22 : Structure de l'indigotine et de l'indirubine .....	61
Figure 23 : Planche botanique du pastel .....	62
Figure 24 : Production française de lin en 2012 (source agreste 2012/Terres inovia) ...	64
Figure 25 : Coupe transversale de la graine de lin .....	65
Figure 26 : Planche botanique du lin .....	69
Figure 27 : Procédés d'obtention d'huile à partir de graines oléagineuses. Adapté de (Gros, 2005; Rombaut, 2013) .....	78
Figure 28 : Schéma de fractionnement des graines .....	90
Figure 29 : Cas particulier des graines de lin.....	91
Figure 30 : Fractionnements aqueux de graines en batchs.....	91
Figure 31 : Schéma du fractionnement aqueux par extrusion bi-vis de graines entières	91
Figure 32 : Photos des graines de chanvre employées .....	96
Figure 33 : Photos des graines de colza employées .....	96
Figure 34 : Photo des graines de cardon employées .....	96
Figure 35 : Photo des graines de pastel dans leurs siliques employées.....	96
Figure 36 : Photo des graines de pastel désiliquées employées .....	97
Figure 37 : Graines de lin.....	97

Figure 38 : Acides gras majoritaires des huiles végétales .....	104
Figure 39 : Profils des acides aminés des graines étudiées .....	107
Figure 40 : Cinétiques de déstabilisation des émulsions formulées à partir des fractions protéiques de graines.....	112
Figure 41 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Chanvre.....	114
Figure 42 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Pastel.....	114
Figure 43 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Cardon.....	115
Figure 44 : Visualisation en 3D du diagramme ternaire réalisé à partir des isolats protéiques de Colza.....	115
Figure 45 : Fractionnement aqueux des graines de Lin .....	120
Figure 46 : Répartition massique des acides aminés dans les mucilages de lin .....	122
Figure 47 : Répartition de la matière brute dans les différentes phases pour le fractionnement aqueux en batchs .....	124
Figure 48 : Répartition de la matière sèche dans les différentes phases pour le fractionnement aqueux en batchs .....	125
Figure 49 : Procédé général de fractionnement aqueux des graines en extrudeur bi-vis .....	134
Figure 50 : Schéma de post-traitement appliqué aux filtrâts issus du fractionnement aqueux en extrudeur bi-vis .....	136
Figure 51 : Distribution du temps de séjour des extrudâts (QG=4 kg/h, QE=8 kg/h, N=250 RPM).....	148
Figure 52 : Répartitions massiques en solides sec et humide et teneur en humidité du solide : profil 8.....	149
Figure 53 : Répartition massique (%) en matière brute pour le fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis.....	152
Figure 54 : Répartition massique (%) de la matière sèche pour le fractionnement aqueux des graines de colza en extrudeur bi-vis.....	153
Figure 55 : Zoom sur la répartition massique en matière sèche dans les émulsions 1..	154
Figure 56 : Zoom sur le rendement en protéines dans les émulsions 1.....	155
Figure 57 : Répartition en lipides dans les extrudâts et les pieds pour les différents essais .....	155
Figure 58 : Composition des émulsions 1 pour les essais effectués sur le colza .....	157
Figure 59 : Composition des pieds obtenus lors du fractionnement TMC des graines de colza sur différents profils de vis.....	158
Figure 60 : Composition des extrudâts obtenus lors du fractionnement TMC des graines de colza selon différents profils de vis.....	159
Figure 61 : Processus de post-traitements analytiques appliqués aux graines .....	163
Figure 62 : Répartitions massiques brutes obtenues lors du fractionnement aqueux en réacteur TMC du colza, du chanvre, du cardon et du pastel.....	165
Figure 63 : Répartition de la matière sèche pour les différentes phases obtenues lors du fractionnement aqueux TMC du colza, du chanvre et du cardon .....	166
Figure 64 : Zoom sur les répartitions en matière sèche dans l'émulsion 1 obtenue lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et ducardon.....	167
Figure 65 : Répartitions massiques brutes dans les différentes phases lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions .....	175

Figure 66 : Répartition de la matière sèche dans les différentes phases lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions .....	176
Figure 67 : Rendements en matière sèche dans les émulsions 1 lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions .....	176
Figure 68 : Rendements en protéines dans les émulsions 1 lors du fractionnement TMC du colza, du chanvre et du cardon, et pour les co-extrusions.....	177
Figure 69 : Composition des extrudâts pour les co-extrusions .....	179
Figure 70 : Aspect des émulsions enrichies en mucilages après centrifugation.....	187
Figure 71 : Répartitions massiques brutes dans les différentes phases avec et sans introduction de mucilages.....	191
Figure 72 : Répartitions en matière sèche dans les différentes phases avec et sans introduction de mucilages.....	192
Figure 73 : Composition des émulsions 1 issues du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages.....	195
Figure 74 : Composition des émulsions 2 issues du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages.....	195
Figure 75 : Comparaison des émulsions 1 et 2 .....	206
Figure 76 : Composition des émulsions 1 et 2 issues du fractionnement aqueux du colza et du mélange chanvre/colza en présence de mucilages .....	213
Figure 77 : Suivi du diamètre des émulsions de Colza en microscopie optique .....	214
Figure 78 : Suivi du diamètre des gouttelettes des émulsions de Chanvre/colza en microscopie optique .....	214
Figure 79 : Photos en M.O des émulsions de colza .....	215
Figure 80 : Photos en M.O des émulsions de chanvre/colza .....	216
Figure 81 : Thermogrammes des émulsions de colza .....	219
Figure 82 : Evolution de l'enthalpie de cristallisation en fonction de la teneur en huile de colza dans le milieu analysé.....	220
Figure 83 : Thermogrammes type (source : techniques de l'ingénieur) .....	221
Figure 84 : Thermogramme des émulsions de chanvre/colza et du mélange d'huiles Colza/Chanvre 50/50.....	222
Figure 85 : Evolution de l'enthalpie de cristallisation en fonction de la teneur en huile de chanvre/colza du milieu analysé .....	223
Figure 86 : Répartitions des protons très liés, liés et très libres dans les émulsions 2..	227
Figure 87 : Répartition des protons très liés, liés et très libres dans les émulsions 1 et 2 de colza et de chanvre/colza avec et sans ajout de mucilages .....	228
Figure 88 : Fractionnement du chanvre .....	266
Figure 89 : Fractionnement du colza .....	267
Figure 90 : Fractionnement du cardon .....	267
Figure 91 : Fractionnement du pastel .....	268
Figure 92 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de chanvre .....	269
Figure 93 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de pastel.....	270
Figure 94 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de Cardon.....	270
Figure 95 : Diagramme ternaire tracé à partir des émulsions obtenues avec les extraits protéiques de Colza.....	271

## Table des tableaux

Tableau 1 : Exemples de composés employés dans la phase grasse d'émulsions.....	16
Tableau 2 : Propriétés des molécules selon la valeur de leur HLB .....	19
Tableau 3 : Valeurs de la HLB pour les groupements hydrophiles et hydrophobes .....	20
Tableau 4 : Emulsifiants/stabilisants employés dans l'industrie .....	20
Tableau 5 : Emulsifiants acceptés par Cosmos et Ecocert.....	22
Tableau 6 : Origines végétales et noms INCI d'émulsifiants.....	24
Tableau 7 : Applications pharmaceutiques de gommes naturelles, adapté de (Prajapati et al., 2013).....	26
Tableau 8 : Exemples d'utilisations de fractions protéiques en formulation (Secchi, 2008; Teglia et al., 1993) .....	28
Tableau 9 : Exemples de sources naturelles de saponines.....	32
Tableau 10 : Exemples de brevets autour de nouveaux émulsifiants .....	35
Tableau 11 : Composition des graines de chanvre .....	51
Tableau 12 : Composition en acides aminés de la graine de chanvre .....	53
Tableau 13 : Composition de la graine de colza .....	56
Tableau 14 : Composition des graines de cynara.....	59
Tableau 15 : Composition des graines de lin .....	65
Tableau 16 : Composition des mucilages .....	66
Tableau 17 : Composition des polysaccharides neutres retrouvés dans les mucilages de lin.....	67
Tableau 18 : Composition des polysaccharides acides retrouvés dans les mucilages de lin .....	67
Tableau 19 : Composition en acides aminés des graines de lin.....	70
Tableau 20 : Gammes de concentration de dérivés protéiques dans des produits d'hygiène .....	74
Tableau 21 : Extraction de composés végétaux en extrusion bi-vis.....	83
Tableau 22 : Expression d'huile en extrudeur bi-vis .....	85
Tableau 23 : Fractionnement assisté par solvants de graines en extrudeur bi-vis .....	86
Tableau 24 : Fractionnement aqueux de graines en extrudeur bi-vis .....	88
Tableau 25 : Caractérisation des graines choisies (données bibliographiques) .....	90
Tableau 26 : Teneurs en matière sèche et matière minérale des graines .....	97
Tableau 27 : Constitution des fractions pariétales des graines.....	99
Tableau 28: Composition chimique des matières végétales.....	99
Tableau 29 : Taux de gonflement des graines broyées.....	101
Tableau 30 : Rendements de pressage des graines en monovis .....	102
Tableau 31 : Profils d'acides gras des huiles végétales .....	103
Tableau 32 : Solubilité des familles de protéines suivant le solvant employé .....	105
Tableau 33 : Classification d'Osborne des quatre graines.....	106
Tableau 34 : IC 50 des macérâts hydroalcooliques des graines.....	108
Tableau 35 : Rendements d'extraction en protéines et caractérisation des fractions protéiques .....	109
Tableau 36 : Classification d'Osborne de l'extrait protéique de Colza .....	109
Tableau 37 : Capacité moussante des isolats protéiques de chanvre, colza, cardon et pastel .....	110
Tableau 38 : Capacité émulsionnante des extraits protéiques de chanvre, cardon, colza et pastel.....	111

Tableau 39 : Bilan massique de la première étape de production de mucilages.....	119
Tableau 40 : Composition des extraits mucilagineux lyophilisés.....	121
Tableau 41 : Analyse des monosaccharides dans les mucilages (%).....	122
Tableau 42 : Répartition centésimale de la fraction sucres.....	122
Tableau 43 : Compositions et répartition des différentes phases après le fractionnement aqueux des graines.....	124
Tableau 44 : Abréviations correspondant aux phases de sortie d'extrusion.....	137
Tableau 45 : Composition des graines de Colza.....	139
Tableau 46 : Chronologie des profils de vis testés lors des essais préliminaires.....	141
Tableau 47 : Chronologie des profils de vis testés lors des essais réalisés afin de comprendre le phénomène d'émulsification.....	144
Tableau 48 : Aspect de l'extrudât pour différents profils de vis testés.....	146
Tableau 49 : Fractionnement TMC des graines de colza : conditions opératoires, répartitions massiques des différentes phases et rendements d'extraction en lipides et en protéines.....	150
Tableau 50 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des graines de colza : composition chimique des différentes phases.....	156
Tableau 51 : Pressage des graines de colza en réacteur TMC : conditions employées et composition des fractions de sortie.....	160
Tableau 52 : Exemples de rendement d'expression en lipides lors du pressage de différentes graines en réacteur TMC.....	161
Tableau 53 : Débits de filtrâts et d'extrudâts pour les différentes productions.....	161
Tableau 54 : composition des graines de chanvre, cardon et pastel.....	162
Tableau 55 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des graines de chanvre, cardon et pastel : conditions opératoires, répartitions massiques des différentes phases et rendements d'extraction en lipides et en protéines.....	164
Tableau 56 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des graines de colza, chanvre, cynara et pastel : composition chimique des différentes phases.....	167
Tableau 57 : Ratios protéines/lipides initiaux pour les différentes graines employées.....	169
Tableau 58 : Ratios protéines/lipides pour les extrudâts et les pieds.....	169
Tableau 59 : Conditions opératoires et répartition massique de la matière sèche entre les fractions obtenues lors des fractionnements aqueux en batch et en extrudeur bi-vis.....	171
Tableau 60 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des mélanges de graines : répartitions massiques des différentes phases et rendements d'extraction en lipides et en protéines.....	173
Tableau 61 : Fractionnement thermo-mécano-chimique des mélanges de graines : composition chimique des différentes phases.....	177
Tableau 62 : Equations de régression pour les mélanges modèles chanvre/colza, chanvre/cardon et colza/cardon réalisés.....	180
Tableau 63 : Composition des extrudâts et des filtrâts.....	181
Tableau 64 : Composition des huiles entrantes et contenue dans le filtrât pour les co-extrusions.....	181
Tableau 65 : Propriétés antioxydantes des extraits hydroalcooliques issus des graines.....	182
Tableau 66 : Valeurs des IC50 sur le radical DPPH pour les fractions solides de sortie d'extrusion.....	182
Tableau 67 : Valeurs des IC50 sur le radical DPPH pour les phases aqueuses.....	183
Tableau 68 : IC 50 des phases aqueuses des émulsions issues des co-extrusions.....	183

Tableau 69 : Composition des mucilages de lin.....	186
Tableau 70 : Diamètre des gouttelettes des émulsions enrichies en mucilages .....	187
Tableau 71 : Débits d'addition de mucilages en fonction des pourcentages ciblés dans les émulsion 1 .....	188
Tableau 72 : Fractionnement thermo-mécano-chimique du colza, du chanvre et du mélange chanvre/colza en présence d'une solution aqueuse de mucilages : répartitions massiques et rendements d'extraction en protéines et en lipides pour les différentes phases.....	189
Tableau 73 : Fractionnement thermo-mécano-chimique du colza, du chanvre et du mélange chanvre/colza en présence d'une solution aqueuse de mucilages : composition des phases obtenues lors du fractionnement des graines.....	192
Tableau 74 : Pourcentages massiques d'entrée de graines et d'eau et de sorties d'émulsions 1 et 2 obtenues pour les différents essais appliqués en réacteur TMC .....	198
Tableau 75 : Composition des graines de Colza, de Chanvre et du mélange Chanvre/Colza .....	202
Tableau 76 : Composition des émulsions 1 de colza et de chanvre/colza .....	203
Tableau 77 : Composition des émulsions 1 ramenées à la matière brute de l'émulsion.....	203
Tableau 78 : Composition des émulsions 2 de colza et de chanvre/colza .....	204
Tableau 79 : Composition des émulsions 2 de colza et de chanvre/colza ramenées à la matière brute de l'émulsion.....	204
Tableau 80 : Composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages .....	208
Tableau 81 : Composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion .....	208
Tableau 82 : Composition des émulsions 1 de chanvre/colza avec ajout de mucilages .....	209
Tableau 83 : Composition des émulsions 1 de colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion .....	209
Tableau 84 : Concentration en sucres libres dans les émulsions 1 avec et sans mucilages .....	210
Tableau 85 : Composition des sucres de la fraction mucilagineuse .....	210
Tableau 86 : Composition des émulsions 2 de colza avec ajout de mucilages .....	211
Tableau 87 : Composition des émulsions 2 de colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion .....	211
Tableau 88 : Composition des émulsions 2 de chanvre/colza avec ajout de mucilages .....	211
Tableau 89 : Composition des émulsions 2 de chanvre/colza avec ajout de mucilages, rapportée à la matière brute de l'émulsion .....	211
Tableau 90 : Températures de cristallisation de l'huile pour les émulsions de colza ....	224
Tableau 91 : Températures de cristallisation de l'huile pour les émulsions de chanvre/colza.....	225
Tableau 92 : Caractérisation des émulsions 2 par RMN à bas champ .....	226
Tableau 93 : Répartition et mobilité des protons dans les émulsions 1 et 2 colza et chanvre/colza sans ou avec ajout de mucilages .....	228
Tableau 94 : Formule d'un lait à partir de l'émulsion 2 de colza.....	231
Tableau 95 : Formulation d'un baume à partir de l'émulsion 2 de colza.....	231
Tableau 96 : Formulation réalisée à partir des émulsions 2 .....	232
Tableau 97 : nature de la fraction protéique extraite suivant le solvant d'extraction utilisé .....	250
Tableau 98 : Volume des éléments de vis pour l'extrudeur Clextal BC 21.....	260



## Résumé

Ces travaux concernent l'étude du fractionnement de plantes régionales sélectionnées pour l'obtention de fractions multifonctionnelles de type « émulsions actives » à usage cosmétique afin de permettre la substitution des ingrédients de synthèse (SDS, sulfate de lauryle, éther de glycol, PEG...) et d'élaborer directement des formulations cosmétiques 100% végétal en totum de plante conservant les activités biologiques attendues et biolabelisables.

Le choix des matières premières s'est porté sur des graines oléoprotéagineuses. En plus d'être des ressources renouvelables et facilement disponibles, aussi bien issues de l'agriculture conventionnelle que de l'agriculture biologique, elles présentent des compositions très variées. Les graines de chanvre, de colza, de cardon, de pastel et de lin ont été choisies du fait de leur complémentarité en composition en acides gras et en protéines. Des caractérisations physico-chimiques et fonctionnelles liées à leur fraction protéique en particulier ont permis d'obtenir des données fondamentales pour le développement et la compréhension des procédés d'extraction mis en jeu dans ces travaux.

Le fractionnement aqueux des graines a été étudié en réacteur batch agité, puis le procédé a été étendu à un procédé continu, de type extrusion bi-vis plus largement exploré.

Le fractionnement aqueux en réacteur thermo-mécano-chimique (TMC) des graines oléoprotéagineuses entières, seules puis en mélanges a été mis en œuvre, puis un actif polysaccharidique naturel a été introduit in situ par le biais de la phase aqueuse extractante afin d'obtenir des fractions enrichies en molécules d'intérêt et d'augmenter la stabilisation des émulsions obtenues. Les meilleurs résultats en termes de rendement et de qualité d'émulsions ont été obtenus avec les graines de colza entières et le mélange de graines entières chanvre/colza.

Les différents types d'émulsions obtenus par le procédé TMC et leur comportement en fonction de différents paramètres ont été caractérisés en microscopie optique mais également par le biais de méthodes originales telles que la DSC ou la RMN à bas champs. Des premiers essais de valorisation des émulsions en formulation galénique pour la cosmétique ont été développés.

Mots clés : émulsions actives, émulsifiants, extrusion, graines, antioxydant, fractionnement

## Abstract

This PhD work studies the fractionation of selected regional plants in order to produce multifunctional "active emulsions" type fractions, for cosmetic purposes. This process allows the direct substitution of synthetic ingredients (SDS, lauryl sulfate, glycol ether, PEG ...) and the development of cosmetic formulations in 100% vegetal plant totum, therefore maintaining the expected biological activities and organic qualifying properties.

The choice of raw materials was directed to oilseeds. Not only are oilseed seeds renewable and readily available resources, both from conventional agriculture as well as organic farming, but they also have very different compositions. Hemp, rapeseed, cardoon, woad and flax were chosen because of their complementarity in terms of fatty acid and protein composition. Indeed, physico-chemical and functional characterization related to their protein fraction, have yielded fundamental data for the development and understanding of extraction processes involved in this work.

The aqueous fractionation of seeds was studied in a stirred batch reactor and then extended to a continuous fractionation process: twin screw extrusion. This method has been more widely explored.

The aqueous fractionation in thermo-mechano-chemical (TMC) reactor of whole oilseed seeds, one variety at a time and then mixed was implemented first. Then an active natural polysaccharide was introduced in situ through the extracting aqueous phase in order to produce enriched fractions in molecules of interest and to increase the stabilization of the emulsions thus obtained. The best results in terms of yield and quality of emulsions were obtained with the whole rapeseed and the mixture of whole hemp / rapeseed.

The different types of emulsions obtained by the TMC process and their behavior under different parameters were characterized by optical microscopy but also through innovative methods such as DSC or NMR low fields. The first valuation tests of formulation in emulsions for cosmetics have been developed.

Key words: active emulsions, emulsifiers, extrusion, seeds, antioxidant, fractionation