

Purification of juices extracted from *Stevia rebaudiana* leaves by salt precipitation

Marie CABANNE^{1,2}, Maria Thereza ALVES DE LIMA¹, Montaine KHEZZANE¹, Fabien BAILLON¹, Cécile HASTOY², Philippe BOUTIE², Fabienne ESPITALIER¹

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

2 : OVIATIS, Village Entreprises, Agen, France.

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

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

Marie CABANNE^{1,2}, Maria Thereza ALVES DE LIMA¹, Montaine KHEZZANE¹, Fabien BAILLON¹,
Cécile HASTOY², Philippe BOUTIE², Fabienne ESPITALIER¹

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

²OVIATIS, Village Entreprises, Agen, France.

Résumé

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

Introduction

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

Abréviations

C_{St} : Concentration en stéviolside

C_{RebA} : Concentration en rébaudioside A

MS : Matière sèche

1. Matériels et méthodes

1.1 Infusions de feuilles de Stévia purifiées

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

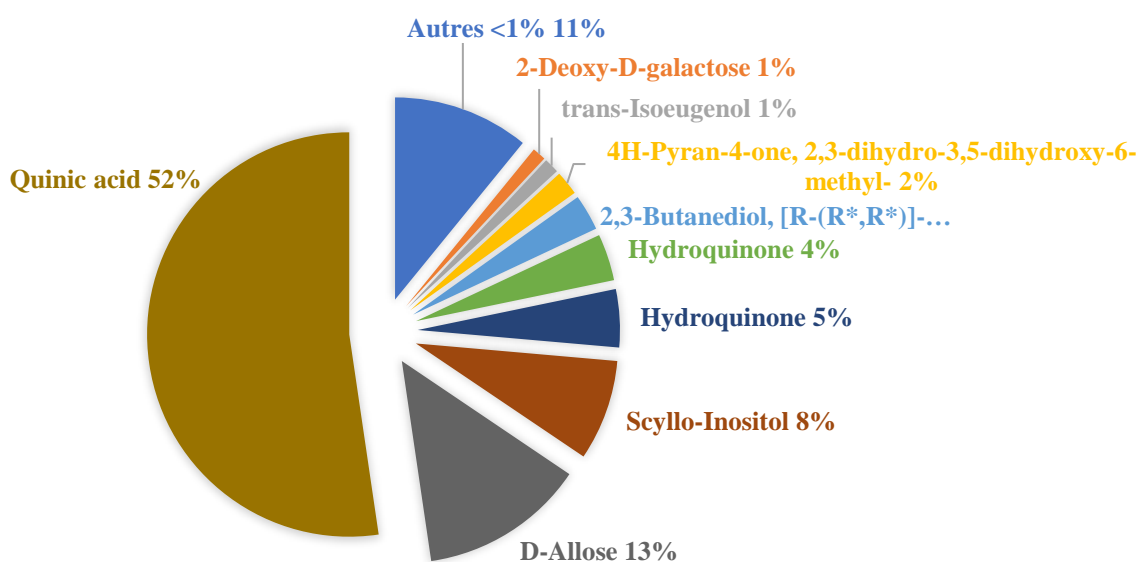
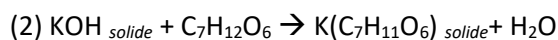
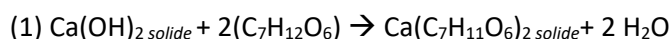


Figure 1 : Proportions des principaux composants identifiés par analyse GCMS

1.2 Réalisation des essais

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



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

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

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

1.3 Analyses

1.3.1 Concentration en glycosides de stéviol

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

1.3.2 Matières sèches

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

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

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

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

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

2. Résultats et discussions

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

$$\text{RatioEtOH} = \frac{\text{masse EtOH}_{\text{total}}(\text{g})}{\text{masse de jus de stévia purifié}_t(\text{g})}$$
$$\text{Ratio hydroxyde} = \frac{\text{masse KOH ou Ca(OH)}_2(\text{g})}{\text{masse de jus de stévia purifié}_t(\text{g})}$$

2.1 Influence de l'ajout d'éthanol

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

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

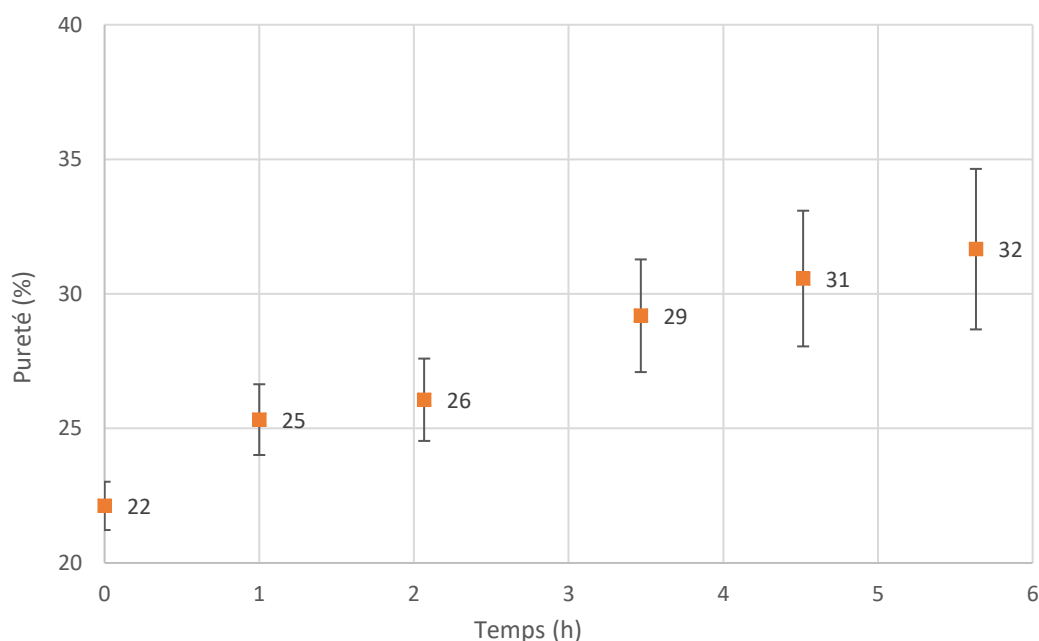


Figure 2 : Représentation graphique de l'évolution de la pureté en fonction des ajouts d'éthanol dans le jus de stévia
 1^{er} ajout d'éthanol : t 0 - Ratio d'éthanol : 1 heure = 0,2 ; 2h04 = 0,5 ; 3h28 = 0,7 ; 4h31 = 1 ; 5h38 = 1,2

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

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

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

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

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

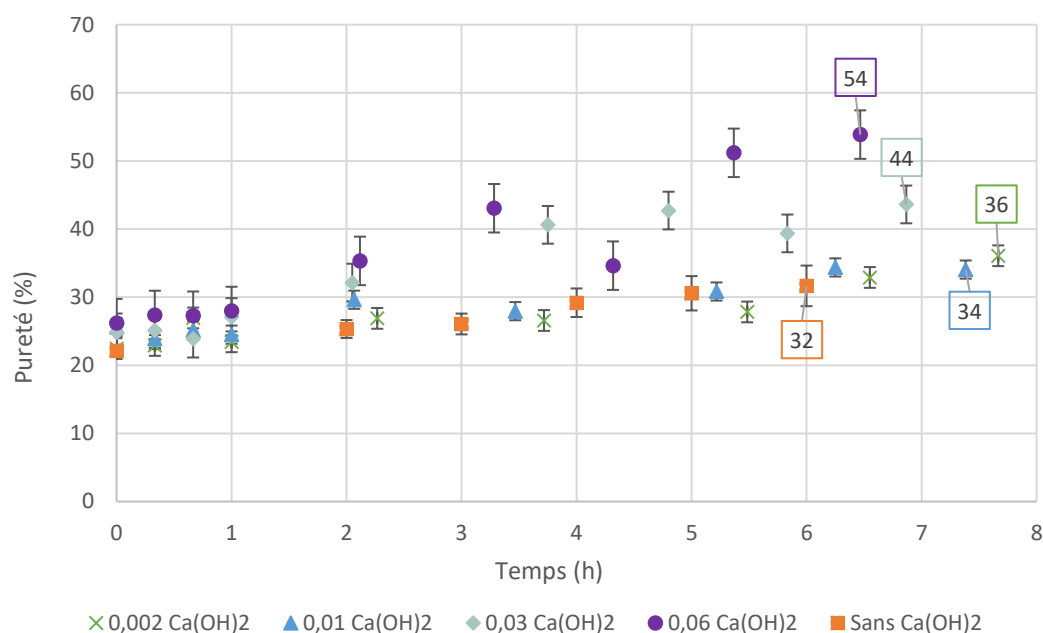


Figure 3 : Représentation graphique de l'évolution de la pureté au cours des essais réalisés à différents ratios d'hydroxyde de calcium et avec ajout d'éthanol uniquement (sans Ca(OH)₂)

Ajout de Ca(OH)₂ à t = 0 – 1^{er} ajout d'éthanol à t = 1 heure – 1^{er} ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,2 ; 2^{ème} ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,5 ; 3^{ème} ajout d'éthanol ratio EtOH = 0,7 ; 4^{ème} ajout d'éthanol ratio EtOH = 1 ; 5^{ème} ajout d'éthanol ratio EtOH = 1,2

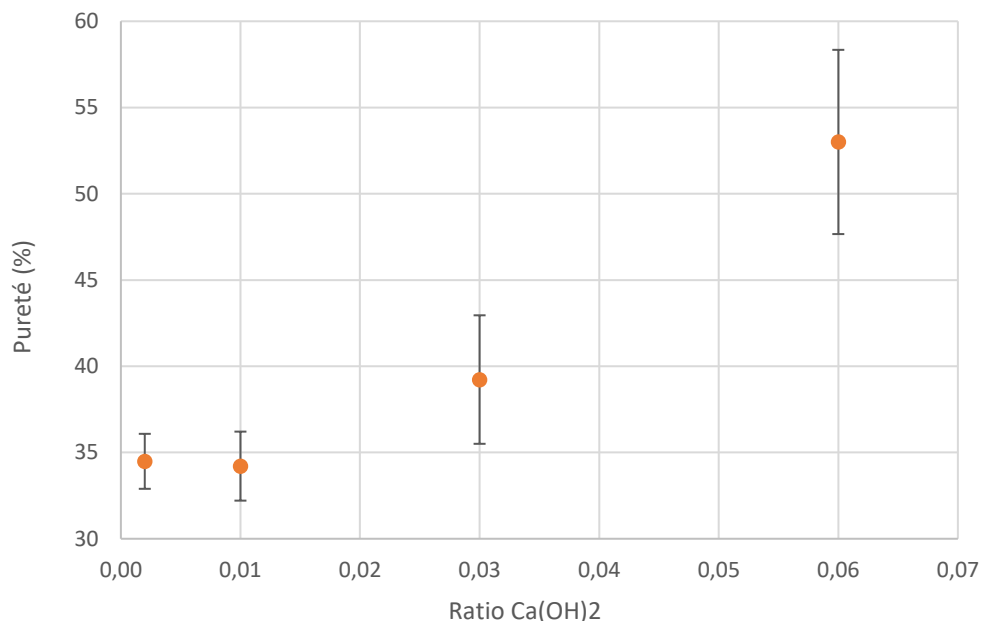


Figure 4 : Représentation graphique de la pureté obtenue en fin d'essai en fonction du ratio d'hydroxyde de calcium – Les valeurs de pureté correspondent à la moyenne du palier obtenu à la fin de chaque essai

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

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

