



HAL
open science

Extraction et séparation de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de pulpe de cerises de café.

Jessica Santos da Silveira

► To cite this version:

Jessica Santos da Silveira. Extraction et séparation de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de pulpe de cerises de café.. Génie des procédés. Montpellier SupAgro, 2019. Français. NNT : 2019NSAM0058 . tel-04106862

HAL Id: tel-04106862

<https://theses.hal.science/tel-04106862>

Submitted on 25 May 2023

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.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

en Génie des Procédés

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par
Unité Mixte de Recherche QualiSud

Extraction et séparation de biomolécules à haute valeur ajoutée à partir de pulpe de cerises de café

présentée par Jessica SANTOS DA SILVEIRA
Le 20 décembre 2019

sous la direction de Manuel DORNIER
et Marie-Pierre BELLEVILLE

devant le jury composé de

Mme. Violaine ATHES-DUTOUR, Professeure, AgroParis Tech

Mme. Lourdes CABRAL, Chercheuse, EMBRAPA, Brésil

M. Pascal DHULSTER, Professeur, Université Lille

M. Renaud BOULANGER, Chercheur, CIRAD

M. Manuel DORNIER, Professeur, Montpellier SupAgro

Mme. Marie-Pierre BELLEVILLE, Maître de Conférences, Université de Montpellier

Mme. Florence LUTIN, Responsable R&D, EURODIA, Pertuis

Mme. Stella LACOUR, Maître de Conférences, Université de Montpellier

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Dir. de thèse

Co-dir. de thèse

Invitée

Invitée



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER



In memoriam

Claudio DA SILVEIRA

Valda Simas DA SILVEIRA

Selma DE SOUZA SANTOS

à mes parents,

à mon mari,

à mon frère,

à mes amis,

à ma belle-famille,

pour leurs encouragements et soutien tout au long de ces années.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené au sein des laboratoires de l'UMR QualiSud au CIRAD et de l'Institut Européen des Membranes (IEM) dans l'équipe de génie de procédés membranaires (GPM), et au Centre National des Sciences et Technologies Alimentaires (CITA) au Costa Rica. Il a été réalisé grâce au financement apporté par Agropolis Fondation, que je remercie très sincèrement.

J'exprime ma profonde gratitude à **M. Manuel DORNIER**, Professeur à Montpellier SupAgro et mon directeur de thèse, à **M^{me} Marie-Pierre BELLEVILLE**, Maître de Conférences à l'Université de Montpellier et co-directrice de thèse, et à **M^{me} Stella LACOUR**, Maître de Conférences à l'Université de Montpellier et encadrante de thèse, pour m'avoir accordé leur pleine confiance, leur présence, leur disponibilité, leur soutien et surtout pour leur amitié tout au long de ces années. Ils ont toujours fait de leur mieux pour me former dans la recherche et pour m'aider à surmonter les difficultés dans ma vie. Ce fut pour moi un honneur et un privilège de travailler avec eux.

Je remercie chaleureusement **M^{me} Ana Mercedes PEREZ** (Directrice de recherche au CITA, Costa Rica) et son équipe (dont **Johan JIMENES ARIAS**) pour son accueil et son appui technique lors de ma mission de 5 semaines réalisée au CITA en février-mars 2018, ainsi que **M^{me} Florence LUTIN** (Responsable R&D, Société Eurodia Industrie SA) pour son vif intérêt dans ce projet, pour le partage de sa vision industrielle et pour le soutien financier et technique apporté par Eurodia.

Je tiens à remercier également les chercheurs, ingénieurs et techniciens qui ont participé à ce travail : **Noël DURAND**, **Christian MERTZ**, **Gérard LOISEAU**, **Adrien SERVENT**, **Gilles MOREL**, et **Joël GRABULOS** ; et les stagiaires que j'ai eu l'honneur d'encadrer : **Noor TUMA**, **Hana BEN TAHAR**, **Amani SMATI**, **Hind BOURABAA** et **Estelle TENA**, pour leur appui scientifique et pour leur contribution à la réalisation de ce travail.

Toute ma reconnaissance s'adresse également à toute l'équipe de l'UMR QualiSud pour m'avoir accueillie si chaleureusement parmi elle et à tous les collègues que j'ai rencontrés au CIRAD, pour leur amitié et pour les moments partagés. Un grand merci à tous mes amis qui m'ont toujours apporté leur soutien et leurs encouragements pendant le doctorat : **Fanny**, **Karine**, **Adeline**, **Cédric**, **Olman**, **Carla**, **Ricardo**, **Givaldo**, **Marina**, **André**, **Bettencourt**, **Christelle**, **Alexandre** et **Eric**.

Enfin, je souhaite remercier de tout mon cœur ma mère et mon père, mon mari, mon frère, ma famille au Brésil et ma belle-famille en Autriche pour m'avoir toujours motivée à atteindre mes objectifs et pour leur compréhension pendant toutes ces années passées à distance. Votre soutien a été essentiel à ma réussite académique et professionnelle.

Muito obrigada à todos vocês !!!

FINANCEMENT DU PROJET

Agropolis Fondation (Montpellier, FRANCE)

Projet « AdCofInov » (1403-079)

Programme « Investissements d'avenir »

Labex Agro: ANR-10-LABX-0001-01

Eurodia Industrie SA (Pertuis, FRANCE)

PARTENAIRES DU PROJET

UMR QualiSud (CIRAD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Université d'Avignon, Université de la Réunion), Montpellier (FRANCE) : Manuel Dornier (PR), Noël Durand (CR), Fabrice Vaillant (CR) ;

Institut Européen des Membranes (UMR5635), Montpellier (FRANCE) : Stella Lacour (MC), Marie-Pierre Belleville (MC) ;

Eurodia Industrie SA, Pertuis (FRANCE) : Florence Lutin (Responsable R&D) ;

CITA-Université du Costa Rica, San José (COSTA-RICA) : Ana Mercedes Perez (DR).



PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Les résultats de ce travail ont été ou vont être publiés sous forme d'articles :

Da Silveira J.S., Durand N., Lacour S., Belleville M-P., Mercedes Perez A., Loiseau G., Dornier M., Solid-state fermentation as a sustainable method for coffee pulp treatment and production of an extract rich in chlorogenic acids, *Food and Bioproducts Processing*, **115**, 175-184 (2019).

Da Silveira J.S., Mertz C., Morel G., Lacour S., Belleville M-P., Durand N., Dornier M., Alcoholic fermentation as a potential tool for coffee pulp detoxification and reuse: analysis of phenolic composition and caffeine content by HPLC-DAD-MS/MS, *Food Chemistry*, soumis en octobre 2019.

Da Silveira J.S., Dornier M., Lacour S., Mercedes Perez A., Belleville M-P., Evaluation of microfiltration and ultrafiltration technologies for the preliminary step of chlorogenic acids recovery from coffee pulp juice, *Journal of Food Engineering*, soumission prévue en mars 2020.

Ils ont également fait l'objet de deux communications orales et d'un poster :

Da Silveira J.S., Lacour S., Durand N., Belleville M-P., Dornier M., Development of a new sustainable waste treatment and recovery in coffee production chain. *ESADR 2016 "Public Policies for Agriculture towards 2020"*, Coimbra, Portugal, 7 au 9 septembre 2016.

Da Silveira J.S., Tuma Schmidt, N., Jimenez Arias J., Lacour S., Durand N., Perez A., Vaillant F., Lutin F., Belleville M-P., Dornier M., Coffee waste as a potential source of natural antioxidants: extraction and stabilization of phenolic compounds. *11th World Congress on Polyphenols Applications*, Vienne, Autriche, 20 au 21 juin 2017.

Poster

Da Silveira J.S., Lacour S., Durand N., Belleville M-P., Dornier M., Extraction sélective de molécules à haute valeur ajoutée issues des déchets de la filière café, par techniques membranaires et séparatives couplées. *COPROInov - Coproduits : innovations et filières, quelles sont les nouvelles stratégies?*, Biocitech Romainville-Grand Paris, France, 11 au 12 octobre 2016.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Le café et la production de café vert	5
1.1. Le café.....	5
1.2. Procédés de production du café vert	7
1.3. La problématique des déchets de la filière du café	9
2. La pulpe de café.....	9
2.1. Composition physico-chimique.....	11
2.2. Les facteurs toxiques de la pulpe de café.....	12
2.3. Les voies de valorisation de la pulpe de café.....	12
3. Les composés phénoliques de la pulpe de café.....	14
3.1. Flavonoïdes	14
3.2. Acides phénoliques	16
3.3. Stabilité des composés phénoliques	18
4. Extraction des composés phénoliques.....	19
4.1. Extraction solide-liquide	20
4.2. Optimisation de l'extraction par des procédés biotechnologiques.....	22
4.3. La fermentation en milieu solide pour l'extraction des composés phénoliques	23
5. Séparation de composés phénoliques par techniques membranaires.....	25
5.1. Généralités.....	26
5.2. Performances et limitations des procédés baromembranaires.....	30
5.3. Applications des procédés baromembranaires pour la séparation des composés phénoliques.....	32
6. Conclusion	36
MATERIELS ET METHODES	38
1. Matériel végétal et préparation de la pulpe brute	38
2. Caractérisation de la pulpe brute, des extraits et des sous-produits.....	39
2.1. Réactifs chimiques et composés de référence	39
2.2. Analyses physico-chimiques	39
2.3. Extraction des acides hydroxycinnamiques libres	40
2.4. Extraction des acides hydroxycinnamiques liés.....	41
2.5. Extraction des tanins condensés et détermination du degré de polymérisation .	41

2.6.	Identification des composés phénoliques par CHLP-SM	42
2.7.	Quantification des composés phénoliques par CHLP-DAD	43
3.	Procédé de traitement de la pulpe de café	43
3.1.	Schéma du procédé complet de traitement.....	43
3.2.	Obtention de l'extrait de pulpe.....	44
3.3.	Fractionnement de l'extrait par techniques membranaires	47
3.4.	Caractéristiques des membranes	48
3.5.	Exploitation des résultats	48
3.6.	Microfiltration	51
3.7.	Ultrafiltration.....	54
3.8.	Nanofiltration	56
RESULTATS ET DISCUSSIONS.....		59
1 ^{ère} partie : caractérisation de la pulpe de café et effet du procédé de prétraitement sur la composition de la pulpe.....		60
1.	Introduction	62
2.	Material and Methods	63
2.1.	Raw Material	63
2.2.	Chemicals	63
2.3.	Coffee pulp samples	64
2.4.	Evaluation of moisture content	64
2.5.	Extraction of free hydroxycinnamic acids	64
2.6.	Extraction of bound hydroxycinnamic acids.....	65
2.7.	Extraction of caffeine	65
2.8.	Extraction of proanthocyanidins	65
2.9.	Qualitative analysis by HPLC-MS/MS	66
2.10.	Quantitative analysis by HPLC-DAD	66
3.	Results and discussion	67
3.1.	Identification of free hydroxycinnamic acids.....	67
3.2.	Mean degree of polymerization of proanthocyanidins.....	69
3.3.	Optimization of extraction conditions for bound hydroxycinnamic acids.....	70
3.4.	Effect of alcoholic fermentation on coffee pulp composition and ecotoxicity ..	71
4.	Conclusion	75
2 ^{ème} partie : extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe de café par fermentation alcoolique et étude de la stabilité de l'extrait de la pulpe		76

1.	Introduction	79
2.	Materials and Methods.....	82
2.1.	Raw material	82
2.2.	Chemicals	82
2.3.	Solid-state fermentation	83
2.4.	Stabilization procedures for chlorogenic acid stability	83
2.5.	Ultrasound-assisted extraction	84
2.6.	Analytical methods.....	84
3.	Results and Discussion.....	85
3.1.	Coffee pulp.....	85
3.2.	Study of the fermentation process at laboratory-scale	87
3.3.	Application of the fermentation process at larger scales.....	95
4.	Conclusions	98
3 ^{ème}	partie : étude de la microfiltration et l’ultrafiltration de l’extrait de la pulpe	99
1.	Introduction	102
2.	Material and Methods	103
2.1.	Coffee pulp juice preparation.....	103
2.2.	Chemicals	104
2.3.	Membranes characteristics and separation scheme	104
2.4.	Microfiltration	106
2.5.	Ultrafiltration.....	106
2.6.	Analytical Methods	107
2.7.	Data analysis	108
3.	Results and discussion	109
3.1.	Microfiltration	109
3.2.	Ultrafiltration.....	113
4.	Conclusion	118
4 ^{ème}	partie : étude de la concentration de l’extrait de pulpe par nanofiltration	119
1.	Introduction	119
2.	Résultats et discussion	120
2.1.	Etude des conditions opératoires à FRV constant	120
2.2.	Simulation du procédé.....	126
3.	Conclusion	131

5 ^{ème} partie : intégration des opérations unitaires pour le traitement complet de la pulpe...	133
1. Introduction	133
2. Résultats et discussion	135
3. Conclusion	146
CONCLUSION GENERALE	148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le café en grains est l'un des produits agricoles les plus échangés à travers le monde. Selon les données de l'Organisation Internationale du Café (ICO, 2019), la production mondiale de café vert (graine de caféier arrivée à maturité) a été estimée à environ 10,2 millions de tonnes en 2018. Les principaux pays producteurs sont le Brésil, le Vietnam, l'Indonésie, la Colombie, l'Ethiopie, suivis de l'Inde, des pays d'Amérique Centrale (Mexique, Honduras, Costa Rica, Guatemala), d'Amérique du Sud (Pérou, Vénézuéla) et autres pays d'Afrique (Ouganda, Côte d'Ivoire, Kenya).

Pour obtenir ce grain exportable, le fruit du caféier communément appelé « cerise de café » doit subir après sa récolte un traitement, soit par voie sèche, soit par voie humide. La voie sèche consiste à sécher la cerise entière, puis à la décortiquer. Cette méthode de production est la voie traditionnelle, plutôt réservée à la production locale. La voie humide, consommatrice d'eau, permet d'obtenir une qualité de café très supérieure à celle utilisant la voie sèche. Cette méthode d'extraction est utilisée pour tous les cafés d'exportation.

La voie humide utilise de grandes quantités d'eau à presque tous les stades de la production : dépulpage, fermentation, rinçage des graines, et génère des volumes très importants de sous-produits (coques, parches, mucilage, pulpe). La pulpe de café, le co-produit le plus important du café vert, représente au minimum 40 % de la masse totale des cerises (Murthy et Madhava Naidu, 2012). Elle est riche en sucres simples, protéines, acides aminés et minéraux et contient des polyphénols et de la caféine.

Les possibilités de valorisation de ce sous-produit s'avèrent très limitées par le fait que la pulpe contient des composés qualifiés d'antinutritionnels (polyphénols, méthylxanthines). La pulpe de café est alors le plus souvent mise en décharge ce qui pose des problèmes environnementaux majeurs dans les zones de production en raison des volumes importants de déchets à stocker (fort pourcentage d'humidité) et des risques de contamination des sols et des nappes phréatiques du fait de l'écotoxicité des lixiviats (Murthy et Madhava Naidu, 2012; Torres-Mancera *et al.*, 2011).

Plusieurs solutions technologiques ont été proposées depuis les 50 dernières années, pour limiter la pollution engendrée par les sous-produits et déchets de la filière café : elles concernent principalement des traitements thermiques (Pandey *et al.*, 2000b) et biologiques (Ulloa Rojas

et al., 2003) visant à réduire les volumes de déchets et les nuisances environnementales (putréfaction et écotoxicité des déchets pour la faune aquatique et terrestre due à leur forte charge organique et aux teneurs élevées en caféine et polyphénols), tout en apportant une valeur ajoutée à ces sous-produits (production d'énergie, substrats pour la culture de champignons, la production d'arômes, d'enzymes, de bioéthanol, de composés phénoliques, etc.) (Gwenzi and Chaukura, 2018; Janissen et Huynh, 2018; Mortada *et al.*, 2005).

La pulpe contient des composés d'intérêt qui peuvent être valorisés industriellement, en particulier la caféine et les acides hydroxycinnamiques (AH). La caféine est un stimulant psychotrope bien connu et à action légèrement diurétique ; les AH font partie de la famille des polyphénols ayant des propriétés antioxydantes, antifongiques et antibactériennes (Arellano-González *et al.*, 2011; Shahidi et Chandrasekara, 2010). Ces molécules trouvent déjà des applications à la fois dans les domaines de la pharmaco-cosmétique, de l'alimentaire et du médical. Les AH peuvent en outre être convertis en produits de plus haute valeur ajoutée (hémisynthèse de la vanilline par exemple), ce qui est un atout supplémentaire très intéressant pour leur valorisation industrielle (Vaithanomsat et Apiwatanapiwat, 2009).

Ces composés se trouvent dans la pulpe sous forme soluble et insoluble. En effet, certains AH sont liés par une fonction ester aux polyosides de la paroi cellulaire (Rodríguez-Durán *et al.*, 2014). Leur solubilisation dans la phase aqueuse par traitement enzymatique (voie directe ou indirecte via l'utilisation de moisissures) et par fermentation en milieu solide a déjà fait l'objet de plusieurs travaux de recherche et quelques voies d'optimisation ont été testées assez récemment (Palomino García *et al.*, 2015; Rodríguez-Durán *et al.*, 2014; Torres-Mancera *et al.*, 2013, 2011; Arellano-González *et al.*, 2011).

La recherche sur la mise en œuvre d'une filière de traitement complet des sous-produits de la filière café reste donc relativement limitée. Pourtant la problématique déchets de cette filière concerne tous les pays producteurs. Dans ce contexte, les deux objectifs visés de ce travail sont :

- 1) d'éliminer au moins en partie les composés toxiques de la pulpe pour faciliter sa valorisation immédiate en alimentation animale, substrat pour champignonnières, substrat enzymatique ou amendement agricole,
- 2) d'extraire/séparer/concentrer les molécules d'intérêt comme les acides hydroxycinnamiques et la caféine en vue de leur valorisation industrielle ultérieure.

Pour cela, notre travail a consisté à proposer et à étudier la faisabilité d'un procédé combinant plusieurs opérations unitaires, pour développer la filière complète de traitement et de valorisation de la pulpe de café en promouvant l'application de techniques innovantes, compétitives et durables. À notre connaissance, aucune étude combinant la fermentation alcoolique et les techniques séparatives membranaires n'a été menée à ce jour pour traiter et valoriser les déchets de cette filière.

Le premier chapitre de ce mémoire regroupe les données bibliographiques sur la matière première utilisée et ses voies de valorisation. Y sont également abordés quelques points sur les composés phénoliques présents dans la pulpe de café et les procédés d'extraction et de séparation par membranes appliqués aux polyphénols. Le second chapitre présente le matériel végétal, les installations pilotes mises en oeuvre et l'ensemble des méthodologies suivies au cours de ce travail. Le troisième chapitre de résultats et discussions se structure en 5 parties. La première partie est consacrée à la caractérisation complète du profil phénolique de la matière première et à l'impact du procédé sur ce profil (Publication n° 1). La seconde partie traite de l'optimisation de l'opération d'extraction par fermentation alcoolique (Publication n° 2). Les troisième et quatrième parties traitent de l'étape de fractionnement de l'extrait de la pulpe par microfiltration tangentielle et ultrafiltration (Publication n° 3) et la concentration/purification de l'extrait par nanofiltration. La dernière partie du chapitre résultats et discussions est une synthèse qui intègre l'ensemble de ces opérations unitaires afin de constituer une ligne de production d'extrait de pulpe de café. Enfin, une conclusion générale est proposée avec les perspectives envisagées.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Au cours de ce chapitre de synthèse bibliographique, il nous est apparu essentiel de présenter dans un premier temps le café, le procédé de production de café vert et la problématique des déchets de la filière. Parmi les sous-produits issus de cette industrie, la pulpe de café est quantitativement et qualitativement le plus important. Nous présenterons sa composition, ses potentialités et les limitations rencontrées pour sa valorisation. Puis nous présenterons les composés phénoliques de la pulpe de café et les voies de valorisation de ces molécules à partir de la pulpe. Enfin, nous ferons le point sur les diverses techniques d'extraction des composés phénoliques et nous terminerons par la présentation des potentialités des techniques de séparation baromembranaires en vue d'obtenir un extrait enrichi en composés fonctionnels à partir de la pulpe de café.

1. Le café et la production de café vert

1.1. Le café

Le café en grain est l'un des produits agricoles les plus échangés à travers le monde. Une soixantaine de pays tropicaux et subtropicaux produisent en quantités importantes du café, ce produit étant pour certains d'entre eux le principal produit d'exportation agricole. L'importance économique du café est principalement due à sa consommation sous forme de boisson, une infusion préparée à partir des grains torréfiés et moulus. La plupart des boissons à base de café consommées dans le monde sont préparées à partir des espèces *Coffea arabica* (Arabica) et *Coffea canephora* (Robusta), la première étant considérée comme supérieure en raison de ses propriétés sensorielles et étant, par conséquent, la plus commercialisée sur le marché international (Esquivel et Jiménez, 2012).

La cerise de café est le fruit du caféier qui appartient à la famille des Rubiacées dont il constitue le genre *Coffea* (Figure 1). La couleur des fruits varie du jaune au rouge cerise selon la variété et l'exposition au soleil. Les fruits rouges sont commercialement les plus appréciés car considérés de meilleure qualité. La taille varie peu selon les variétés, en moyenne 10 mm de longueur, 6-7 mm de largeur et 3-4 mm d'épaisseur (Perraud-Gaime, 1995).



Figure 1. Rameau de cerises de café.

La coupe longitudinale du fruit (Figure 2) montre les différentes couches tissulaires. La pulpe est formée par l'exocarpe (épiderme) coloré et le mésocarpe (pulpe). La couleur de l'épiderme varie du vert (chlorophylles) au rouge (anthocyanes), voire au rouge foncé, parfois même jusqu'au violet et au noir lorsque les cerises sont trop mûres. Enveloppé par l'épiderme, le mésocarpe, épaisse couche de tissu spongieux de cinq millimètres d'épaisseur, riche en sucres et en pectines, entoure deux graines accolées par leur face plane. Les graines sont revêtues d'une double membrane : la première communément appelée parche (endocarpe mince, mucilage), et la deuxième, appelée pellicule argentée (tégument) adhérant à la graine. Les cerises sont généralement récoltées 5 ans après la plantation de l'arbre, quand l'épiderme du fruit devient rouge (Arya et Rao, 2007).

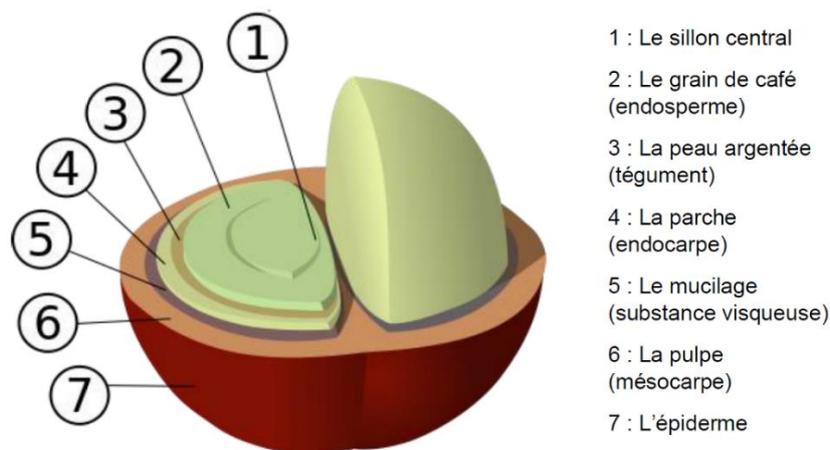


Figure 2. Anatomie de la cerise de café (MaxiCoffee, 2019).

1.2. Procédés de production du café vert

La production mondiale de café vert (grains de café) était estimée à environ 10 millions de tonnes en 2018, avec plus de 90 % de la production de café dans les pays en développement (Amérique centrale et du Sud, Afrique centrale et orientale, Asie) alors que la consommation a lieu principalement dans les économies industrialisées (ICO, 2019). Les fruits mûrs du caféier sont traités sur les lieux de production. Ils subissent un certain nombre d'opérations qui ont pour objet de dégager les graines de leurs enveloppes (pulpe, mucilage, parche, pellicule), de les conserver par séchage et d'améliorer leur présentation. Il existe deux techniques pour l'obtention du grain marchand (Figure 3). La méthode sèche est couramment utilisée pour le Robusta et produit la coque, alors que la méthode humide est principalement utilisée pour l'Arabica et produit la pulpe en tant que sous-produit (Janissen et Huynh, 2018). Les quantités de pulpe et de coque produites pour une tonne de café frais sont égales à 0,5 et 0,18 t respectivement (Roussos *et al.*, 1995).

La méthode dite de la voie sèche consiste simplement, comme son nom l'indique, à laisser les fruits sécher au soleil durant une vingtaine de jours. La cerise se déshydrate, notamment l'ensemble des enveloppes (la peau, la pulpe et la parche) qui forment alors la coque. Le café est sec quand le grain "sonne" dans la coque, et les cafés traités par cette méthode sont dits « nature ». L'autre technique, par voie humide, comporte plusieurs étapes dont le dépulpage, la démucilagination, le lavage et la classification densimétrique sous eau puis le séchage. Les deux premières étapes servent notamment à débarrasser le fruit de sa peau sans abîmer le grain. Puis, le café est lavé dans des bacs ou dans un canal qui permettra en plus, de trier les grains en fonction de leur densité et ainsi de se débarrasser des fruits les plus légers. Ce lavage permet de diminuer l'amertume du café, son astringence. Il en résulte un goût plus fin. Après cette étape, le grain entouré de sa seule parche, est mis à sécher et se déshydrate. Cette méthode permet d'obtenir des cafés dits « lavés » d'une bien meilleure qualité, en respectant davantage les caractéristiques organoleptiques du fruit (Murthy et Madhava Naidu, 2012).

La voie sèche est plus pratique et plus économique, mais porte préjudice à la qualité du café. Elle produit moins de déchets que la voie humide et apparaît plus respectueuse de l'environnement. Cependant, si les déchets secs ne sont pas utilisés immédiatement, ils se réhumidifient rapidement (pluie, humidité ambiante) et deviennent une sérieuse source de pollution environnementale. La voie humide est utilisée pour produire des cafés d'exportation de la variété Arabica, et demande davantage d'installations et d'investissements. Ce traitement

entraîne des volumes importants de déchets solides principalement la pulpe (40 % du poids de fruit frais) et le mucilage (22 %), et des liquides (eaux de process), à savoir, jusqu'à 15 m³ d'eau pour produire une tonne de café vert (Kivaisi *et al.*, 2010).

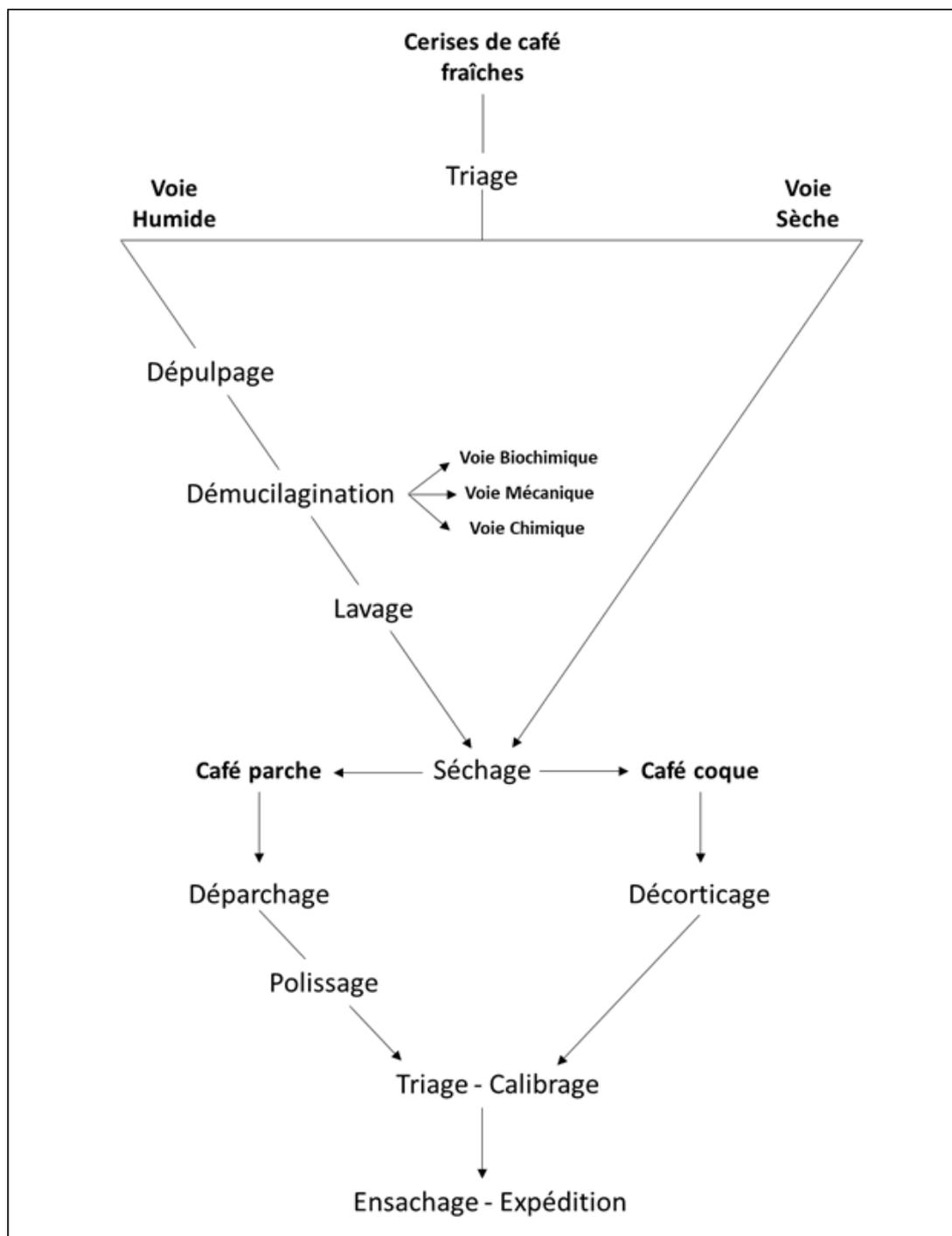


Figure 3. Procédés de production du café vert par voie humide et par voie sèche.

1.3. La problématique des déchets de la filière du café

Lors de la production du café vert par la voie humide, plus de 50 % de la masse des cerises ne sont pas utilisées et sont souvent mis en décharge près des sites de production. Ceci pose des problèmes de stockage (volumes importants de déchets) et de contamination des sols et des nappes phréatiques du fait de la toxicité des lixiviats (Woldesenbet *et al.*, 2016). L'utilisation et la gestion à grande échelle des déchets du café reste un défi dans le monde entier en raison de leurs teneurs importantes en caféine et en composés phénoliques, qui sont connus pour être très toxiques pour de nombreux écosystèmes (Fan *et al.*, 2003).

Les applications traditionnelles de valorisation de ces déchets (i.e. l'alimentation animale, le compostage et l'amendement des sols) étaient souvent inefficaces ou techniquement médiocres (Braham et Bressani, 1979; Roger *et al.*, 1999). Cependant, grâce à une meilleure connaissance de la composition des différents sous-produits de café, la gestion de ces derniers a évolué. Les voies de valorisation ont pu être diversifiées et améliorées, en regard de leur composition chimique. Parmi les différentes voies possibles, on peut citer les bioprocédés incluant la production de champignons, d'enzymes, d'acides organiques, de biocombustibles et d'engrais, la détoxification en vue de l'utilisation en alimentation animale et le vermicompostage (Janissen et Huynh, 2018; Pérez-Morales *et al.*, 2011; Shenoy *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2003).

Dans les publications dédiées à l'utilisation industrielle des sous-produits du café, la constante est souvent l'absence d'étude économique de faisabilité. Il manque également une estimation de l'impact environnemental de la transformation de ces sous-produits. Actuellement, c'est la biotechnologie qui ouvre le plus de perspectives pour l'utilisation des sous-produits agro-industriels, de façon rentable, en permettant l'obtention de produits finaux à haute valeur ajoutée (enzymes ou métabolites secondaires). Il semble ainsi possible d'obtenir à court terme des utilisations concrètes au niveau industriel des sous-produits du traitement du café (Moreno *et al.*, 2019; Janissen et Huynh, 2018; Roussos *et al.*, 1995).

2. La pulpe de café

Nous nous intéressons plus particulièrement, au cours de ce travail, à la pulpe issue du traitement par voie humide de la cerise de café de type Arabica.

Trois facteurs justifient l'étude de ce substrat :

- la grande quantité de pulpe disponible dans les pays producteurs ;
- les problèmes de pollution (Figure 4) engendrés par la production élevée de ce sous-produit ;
- la possibilité, d'après sa composition chimique, d'utiliser la pulpe de café comme matière première pour l'obtention de différents produits à haute valeur ajoutée.



Figure 4. Aire de stockage de la pulpe de café au Costa Rica.

D'autres facteurs, en revanche, limitent l'utilisation de ce sous-produit agricole :

- la nature saisonnière de la production (disponibilité de 3 à 5 mois par an) ;
- le taux d'humidité élevé de 80 à 85 % ;
- la présence de substances ayant un effet anti-nutritionnel, telles que la caféine et les composés phénoliques indésirables en alimentation animale.

2.1. Composition physico-chimique

La composition chimique de la pulpe a été étudiée par plusieurs auteurs. Elle diffère suivant la variété du caféier, la maturité du fruit, le type de traitement appliqué et le lieu de production. Le Tableau 1 présente une composition moyenne de la pulpe de café fraîche déshydratée.

Tableau 1. Composition chimique de la pulpe de café fraîche déshydratée (Rodríguez-Durán, 2016).

Composés	Valeurs (% m/m)
Lipides	1,3 - 3,8
Fibres	16,2 - 35,2
Protéines	8,0 - 15,0
Cendres	5,0 - 9,5
Glucides	66,5 - 84,4
Cellulose	10,5 - 28,6
Hémicellulose	1,0 - 15,5
Lignine	12,2 - 22,8
Tanins	0,7 - 4,6
Caféine	0,7 - 1,8

La pulpe est particulièrement riche en glucides (66,5-84,4 %) et relativement riche en protéines (8-15 %). La fraction glucidique de la pulpe contient, en outre des composés de la paroi cellulaire (cellulose, hémicellulose et lignine), des sucres réducteurs (12,4 %), des sucres non réducteurs (2,0 %) et des pectines (6,5 %)(Rodríguez-Durán, 2016).

Nous pouvons remarquer que dans la pulpe de café se trouvent des substances chimiques attractives pour l'alimentation animale (sucres, protéines, hémicellulose, cellulose) ; cependant on trouve d'autres substances (caféine et composés phénoliques) qui peuvent être toxiques pour certains animaux (bovins, poulets, porcs).

2.2. Les facteurs toxiques de la pulpe de café

La présence de composés antinutritionnels dans la pulpe de café est le principal frein à son utilisation en alimentation animale. En effet, les substances ayant un tel effet sont notamment la caféine, les phénols simples (acides hydroxycinnamiques) et les phénols polymérisés, c'est-à-dire les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Braham et Bressani, 1979).

La caféine (1-3-7-triméthylxanthine) est une purine (masse molaire 194,2 g.mol⁻¹) appartenant à la famille des alcaloïdes. Parmi les activités biologiques de la caféine, les effets connus de stimulant physique et diurétique semblent provoquer des dysfonctionnements physiologiques chez différents animaux, tels que la diminution de la rétention d'autres nutriments, la chute des poils, le tympanisme, des problèmes de peau ainsi qu'une augmentation de la sécrétion urinaire. Des pertes de poids ont été enregistrées chez des ruminants dont la ration alimentaire comportait 25 % de pulpe de café (Perraud-Gaime, 1995).

Concernant les composés phénoliques, l'effet antinutritionnel est principalement lié à la présence des tanins condensés dans la pulpe de café. Il a été démontré que le produit de la polymérisation des catéchines qui interagissent avec les protéines en réduisant le potentiel nutritif des aliments, n'est pas dégradé lors du passage dans le tractus intestinal des poulets ou de chèvres. De plus, d'après Angur *et al.* (2006), la croissance des veaux est retardée lorsqu'ils reçoivent une ration journalière contenant 15 % de pulpe de café.

La pulpe de café mise en décharge directement sur les sites de production génère une toxicité environnementale importante (sols, rivières, nappes phréatiques) en raison de sa forte charge organique (demandes chimique et biochimique en oxygène élevées), sa putrescibilité limitée (nuisance olfactive) et la présence de substances toxiques (décrites ci-dessus) à la fois pour la faune aquatique et terrestre (Murthy et Naidu, 2012a ; Torres-Mancera *et al.*, 2011).

2.3. Les voies de valorisation de la pulpe de café

La pulpe de café contient une grande quantité de nutriments qui pourraient être utilisés dans l'alimentation animale. Cependant, sa teneur élevée en composés toxiques et antinutritionnels limite son utilisation pour cette application. Il a été constaté que pour certains animaux tels que les vaches laitières, jusqu'à 20 % de pulpe de café peuvent être utilisés dans la ration sans effet négatif sur la croissance. Pourtant, pour d'autres animaux, tels que les poulets, la limite

admissible est nettement plus basse (5 % m/m). Une alternative pour l'utilisation de la pulpe consiste en la détoxification de ce déchet avant son utilisation dans l'alimentation animale. Cette détoxification de la pulpe peut se faire par fermentation en milieu solide avec des champignons filamenteux (Amalia Cabrera Núñez *et al.*, 2015; Brand *et al.*, 2000).

La pulpe de café peut également être utilisée comme engrais organique, principalement pour fertiliser les caféiers. Cependant, son utilisation en tant qu'engrais présente un inconvénient : sa manipulation est compliquée à cause de sa grande humidité. Par conséquent, il est conseillé de sécher la pulpe avant son utilisation comme engrais. Pour atteindre la composition chimique de 1 kg d'engrais organique, 5 à 10 kg de pulpe sèche sont nécessaires. Le compostage et le vermicompostage constituent une alternative pour améliorer les propriétés biofertilisantes de la pulpe (Aranda *et al.*, 2009).

Parmi les applications traditionnelles de la pulpe de café, la pulpe sèche peut être utilisée comme combustible pour la combustion directe dans les fours de torréfaction de grains de café. Cela permet d'économiser de l'énergie lorsqu'on utilise le séchage thermique. L'utilisation de la pulpe comme combustible est très limitée en raison de sa faible densité énergétique. Une alternative pour cette application est la production de combustibles solides compressés, tel que les pellets et les briquettes (Musisi, 2009).

La pulpe de café peut également être utilisée pour la production de combustibles gazeux. Pandey *et al.* (2000) ont rapporté que 133 m³ de biogaz peuvent être produits par la digestion anaérobie d'une tonne de pulpe de café. Ceci équivaut à la teneur de 100 L d'huile. Le principal inconvénient de ce processus est la faible valeur économique du biogaz, environ 0,4 USD.m⁻³, ainsi que le coût de transport des matières premières et du gaz produit. Récemment, des études ont été menées pour utiliser la pulpe séchée dans la production de bioéthanol (Shenoy *et al.*, 2011).

La pulpe est un bon substrat pour la production de molécules à hautes valeurs ajoutées, comme les composés d'arômes, les enzymes et les composés phénoliques. Medeiros *et al.* (2003) ont étudié la capacité de deux souches de *Ceratocytis fimbriata* pour produire des composés d'arômes par fermentation en milieu solide en utilisant la pulpe de café comme support et substrat. Ils ont détecté 11 composés volatiles présents dans la culture, l'acétate d'éthyle et l'éthanol étant les substances les plus abondantes. La pulpe a été utilisée pour la production d'enzymes ayant une activité sur les composés phénoliques, comme la tanase (Sobal *et al.*,

2003), la laccase (Mata *et al.*, 2005), la féruloyl estérase (Pérez-Morales *et al.*, 2011) et la chlorogénate hydrolase (Adachi *et al.*, 2008), et pour la production d'enzymes capables de digérer les glucides, tels que les pectinases (Nava *et al.*, 2011), la xylanase (Murthy et Naidu, 2012) et l' α -amylase (Murthy *et al.*, 2009).

Une application qui a récemment attiré l'attention est l'extraction de composés phénoliques présents dans la pulpe de café. Ces composés peuvent être extraits de la pulpe par des procédés chimiques ou biologiques, tels que par fermentation en milieu solide, afin de les commercialiser en tant que boisson, additifs alimentaires et pharmaco-cosmétiques (Palomino Garcia *et al.*, 2015; Arellano-González *et al.*, 2011; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Torres-Mancera *et al.*, 2011; Velissariou *et al.*, 2006).

3. Les composés phénoliques de la pulpe de café

L'extraction des composants phénoliques, en raison de la valeur commerciale élevée des extraits, semble être l'une des applications les plus attractives pour l'utilisation de la pulpe de café. La composition phénolique de la pulpe a été étudiée de manière exhaustive depuis plus de 20 ans. Différents composés phénoliques ont été identifiés et quantifiés dans la pulpe, tels que les flavanols, les flavonols, les anthocyanidines, les proanthocyanidines, les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques (AH) et leurs dérivés (Tableau 2).

3.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés phénoliques à 15 atomes de carbone (C₆-C₃-C₆) formés par deux cycles aromatiques reliés par un cycle hétérocyclique pyrane. Ces composés sont largement distribués dans le règne végétal et sont présents à des concentrations élevées dans l'épiderme des feuilles et dans la peau des fruits. Les principales sous-classes de flavonoïdes sont les flavonols, les flavones, les flavan-3-ols, les isoflavones, les flavanols et les anthocyanes. D'après la structure de base des flavonoïdes (Figure 5), de nombreuses substitutions sont possibles. Les plus courantes sont les groupes hydroxyle, méthyle et glycoside. Ces molécules peuvent se lier pour donner des proanthocyanidines oligomères ou polymères, également connues sous le nom de tanins condensés (Kumar et Pandey, 2013; Rodríguez-Durán, 2016).

Tableau 2. Concentration des composés phénoliques de la pulpe de café.

Composé	Concentration (g.kg⁻¹, base sèche)
Flavanols	
Catéchine	0,06 - 0,63
Epicatéchine	1,53 - 4,36
Total flavanols	0,60 - 4,94
Flavonols	
Rutine	0,09 - 0,70
Total flavonols	0,09 - 0,70
Anthocyanes	0,040 - 0,050
Proanthocyanes	
Prodelfinidines	7,00-7,01
Proanthocyanes	2,50 - 2,59
Total proanthocyanes	6,00 - 20,10
Acides hydroxybenzoïques	
Acide protocatéchique	0,09 - 4,70
Total acides hydroxybenzoïques	0,09 - 4,70
Acides hydroxycinnamiques	
Acide caféique	0,09 - 2,66
Acide férulique	0,05 - 0,26
Acide p-coumarique	0,08 - 0,16
Acide C5Q	2,38 - 12,80
Acide C4Q	0,30
Acide C3Q	0,20
Acide DiC3,5Q	0,20 - 1,13
Acide DiC3,4Q	0,90 - 4,45
Acide DiC4,5Q	0,00 - 1,22
Acide F5Q	0,00 - 0,20
Acide p-CQ	0,08 - 0,60
Total acides hydroxycinnamiques	2,98 - 15,98

Sources : (Rodríguez-Durán, 2016; Torres-Mancera *et al.*, 2011; Benoit *et al.*, 2006; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; De Colmenares *et al.*, 1994; Clifford et Ramirez-Martinez, 1991a, 1991b; Ramirez-Martinez, 1988).

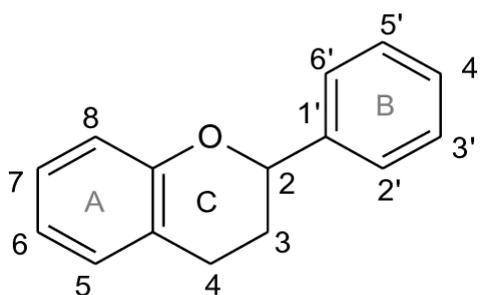


Figure 5. Structure de base des flavonoïdes.

Différentes classes de flavonoïdes et de composés dérivés ont été identifiées dans la pulpe de café. Ramírez-Martinez (1988) a analysé les composés phénoliques présents dans les extraits méthanoliques de la pulpe de café et a pu identifier et quantifier la catéchine, l'épicatéchine et la rutine. Plus récemment, Ramirez-Coronel *et al.* (2004) ont analysé les composés phénoliques de la pulpe de café par thiolyse directe suivie d'une analyse par CLHP et ont trouvé des flavanols sous forme de monomères et de proanthocyanidines. Les unités constitutives des proanthocyanidines étaient principalement de l'épicatéchine (plus de 90 %). Ils ont trouvé aussi des petites quantités de flavonols et d'anthocyanidines (masse totale de 0,4-0,6 g.kg⁻¹ en base sèche).

3.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques (Figure 6) sont des composés ayant un cycle aromatique avec au moins un groupe hydroxyle et un groupe carboxyle. Les acides phénoliques naturels sont classés selon leur structure en acides hydroxybenzoïques et en acides hydroxycinnamiques. Les acides hydroxybenzoïques sont dérivés de l'acide benzoïque et ont une formule de base de type C₆-C₁. Ils existent fréquemment sous forme d'esters ou de glucosides et peuvent également être intégrés dans des structures complexes comme certains tanins. Les acides hydroxycinnamiques représentent une classe très importante dont la structure de base (C₆-C₃) dérive de celle de l'acide cinnamique. Les molécules de base de cette famille de composés sont les acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique. Parmi les acides hydroxycinnamiques, l'acide caféique a une répartition quasi-universelle chez les végétaux où il est souvent présent sous forme d'acides chlorogéniques (ester 5-caféoylquinique et isomères) (Robbins, 2003; Sarni-Manchado et Cheynier, 2005).

Les acides phénoliques de la pulpe de café correspondent principalement aux acides hydroxycinnamiques (AH). Le seul acide hydroxybenzoïque identifié dans la pulpe est l'acide

protocatéchique, qui est présent à une concentration comprise entre 0,09 à 4,70 mg.kg⁻¹, en base sèche (Clifford et Ramirez-Martinez, 1991a; Ramirez-Martinez, 1988).

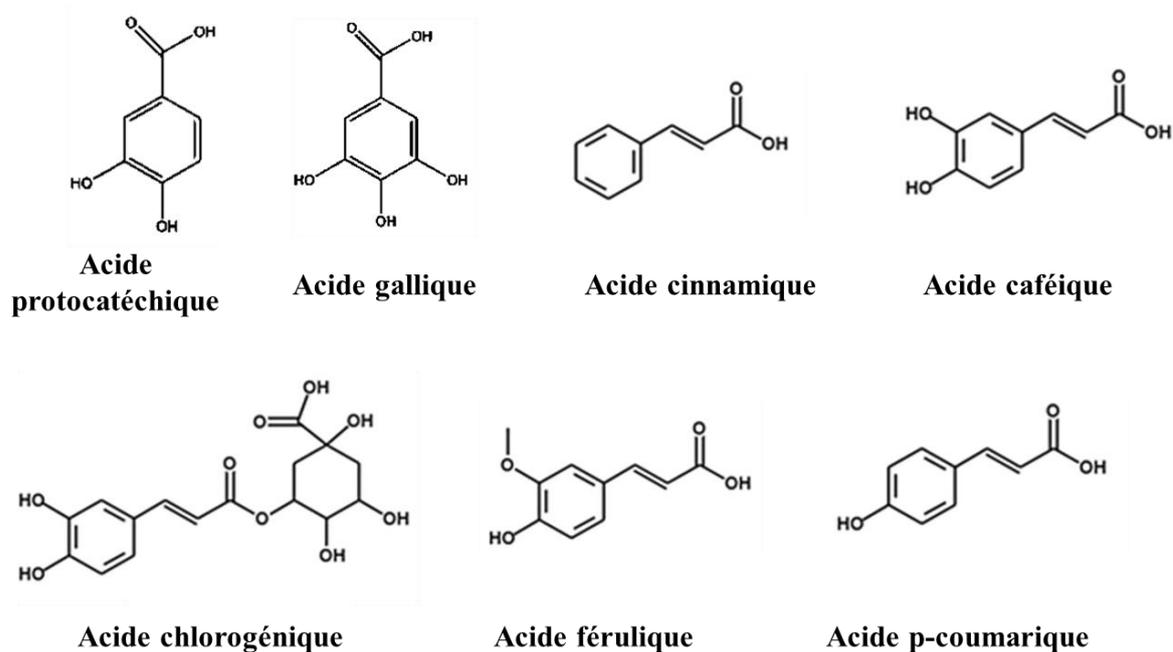


Figure 6. Les principaux acides phénoliques.

Les AH présents dans la pulpe de café sont trouvés sous forme d'acides libres, d'esters solubles ou d'esters insolubles. Les AH qui ont été identifiés et quantifiés dans la pulpe sont : l'acide caféique (AC), l'acide férulique (AF), l'acide p-coumarique (APC) et ses dérivés, à savoir, l'acide 3-caféoyl-quinique (C3Q), l'acide 4-caféoyl-quinique (C4Q), l'acide 5-caféoyl-quinique (C5Q), l'acide 3,5-dicaféoyl-quinique (DiC3,5Q), l'acide 3,4-dicaféoyl-quinique (DiC3,4Q), l'acide 4,5-dicaféoyl-quinique (DiC4,5Q), l'acide 5-féruloyl-quinique (F5Q) et l'acide p-coumaryl-quinique (pCQA) (Benoit *et al.*, 2006; Clifford et Ramirez-Martinez, 1991a; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Ramirez-Martinez, 1988; Torres-Mancera *et al.*, 2011).

L'acide chlorogénique C5Q est l'acide phénolique le plus abondant dans la pulpe de café. On le trouve à des concentrations de 2,4 à 12,8 g.kg⁻¹ en base sèche, ce qui représente de 51 à 91 % des AH dans la pulpe de café (Clifford et Ramirez-Martinez, 1991a, 1991b; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Ramirez-Martinez, 1988; Rodríguez-Durán, 2016).

Diverses études *in vitro*, *in vivo* et épidémiologiques ont attribué des avantages potentiels à la consommation des acides chlorogéniques (ACG) pour la santé humaine. Ces avantages

potentiels sont reliés à leurs propriétés antioxydantes, antivirales, hypoglycémiques et hépatoprotectrices (Marques et Farah, 2009). Ainsi, les ACG peuvent être potentiellement utilisés dans les industries chimique, pharmaceutique et alimentaire.

Commercialement, les ACG sont extraits des grains de café vert et de certaines plantes médicinales telles que le chèvrefeuille (*Lonicera japonica*) et l'arbre à gutta-percha (*Eucommia ulmoides*) (Chen *et al.*, 2007). Ces plantes sont cultivées spécifiquement dans ce but en raison de la valeur commerciale relativement élevée des ACG. La valeur commerciale des ACG varie entre 20 et 106 000 USD.kg⁻¹, selon le degré de pureté (25-95 %) (www.alibaba.com ; www.sigmaaldrich.com). C'est pourquoi il est intéressant de trouver de nouvelles sources d'ACG, qui pourraient être produites à plus faible coût tout en valorisant un déchet.

3.3. Stabilité des composés phénoliques

L'une des principales difficultés rencontrées lors de l'extraction des polyphénols concerne la stabilité de ces composés. Les composés phénoliques sont très instables et peuvent subir des dégradations (chimique, biochimique) dues à la température, la lumière, l'oxygène, au pH et aux enzymes. La lumière, la température et l'oxygène de l'air sont les principaux facteurs qui facilitent les réactions de dégradation. Les enzymes (principalement les enzymes oxydatives) déjà présentes dans le matériel végétal peuvent être libérées pendant le processus d'extraction et favoriser ces réactions de dégradation (Mäkilä *et al.*, 2016). Ainsi, pour construire une méthode d'extraction efficace, il est essentiel d'assurer la stabilité des composés phénoliques dans la solution.

Les acides hydroxycinamiques sont stables à un pH compris entre 3 et 5. Sous conditions basiques (pH > 7), ces composés peuvent subir des réactions d'isomérisation et d'oxydation. L'acidification de la solution constitue une des voies de prévention de la dégradation des phénols en ajustant le pH avec des régulateurs d'acidité. En effet, le pH optimal des enzymes telles que les polyphénols oxydases (PPO) se situant autour de pH 6-7, l'ajustement à un pH inférieur à 4 rend inopérantes ces enzymes (Narita et Inouye, 2013; Friedman et Jürgens, 2000). Un régulateur d'acidité typique est l'acide acétique, un acide organique traditionnellement utilisé pour améliorer la durée de conservation et la sécurité microbiologique des produits alimentaires.

Le dioxyde de soufre (SO_2) est aussi couramment utilisé comme agent réducteur et inhibiteur des oxydases endogènes dans la vinification (Blouin, 2014; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Sous sa forme bisulfite (HSO_3^-), il peut protéger efficacement les composés phénoliques des oxydations chimiques et enzymatiques. De plus, les ions sulfites présentent des propriétés antifongiques et antibactériennes, pouvant être utilisés comme agent stabilisant lors du stockage des produits alimentaires.

L'acide ascorbique est un autre conservateur alimentaire bien connu, un antioxydant hydrosoluble que l'on trouve naturellement dans de nombreux fruits et légumes. Dans l'industrie, l'acide ascorbique peut être ajouté aux produits à base de plantes pour préserver leur pouvoir antioxydant et assurer leur stabilité chimique. En outre, en présence d'oxygène, l'acide ascorbique a tendance à s'oxyder, consommant ainsi l'oxygène environnant et éliminant les risques d'oxydation des autres composés présents (Varvara *et al.*, 2016).

4. Extraction des composés phénoliques

L'extraction est l'étape principale pour la récupération des molécules bioactives à partir des matrices végétales. L'extraction des composés phénoliques est influencée par la nature chimique de ces composés, la méthode d'extraction utilisée, la taille des particules dans l'échantillon, les conditions et le temps de stockage, ainsi que la présence de substances interférentes.

La structure de ces composés dans les plantes peut varier de simple à hautement polymérisée avec des proportions variables en acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanes et tanins, entre autres. Ils peuvent aussi exister sous forme de complexes avec des glucides, protéines et autres composants végétaux ; certains de poids moléculaire élevé et leurs complexes peuvent être très insolubles. Ainsi, les extraits phénoliques de plantes sont toujours un mélange de différentes classes de composés phénoliques solubles dans le solvant utilisé pour l'extraction (Naczki et Shahidi, 2004).

Aujourd'hui, tout procédé de fabrication de biomolécules dans l'industrie cosmétique, la parfumerie, l'agroalimentaire, la pharmacie ou pour la valorisation de la biomasse met en œuvre, directement ou indirectement, l'extraction du végétal, qui est devenue incontournable dans ces différents secteurs d'applications (Chemat, 2011). Dans cette section, nous présenterons les méthodes d'extraction des composés phénoliques et les procédés

biotechnologiques qui sont de plus en plus utilisés dans le domaine de des biomolécules pour améliorer les performances d'extraction de ces composés.

4.1. Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide, encore appelé extraction par solvant, est la méthode la plus couramment utilisée pour l'extraction des phénols simples à partir des plantes. Il s'agit de mettre en contact un solide et un liquide afin de récupérer un ou plusieurs composés solubles, contenus dans le solide. Cette opération très ancienne est largement utilisée en industrie agro-alimentaire pour extraire des plantes, des composés alimentaires ou pharmaceutiques, en vue par exemple de la production de boisson ou de médicament (Cisse, 2010).

Les solvants couramment utilisés pour l'extraction des composés phénoliques sont des alcools (méthanol, éthanol), acétone, éther diéthylique et éthyle acétate. Toutefois, les acides phénoliques très polaires (acides benzoïques et cinnamiques) ne peuvent pas être extraits complètement par des solvants organiques purs, et des mélanges d'alcool et d'eau ou d'eau et d'acétone sont recommandés. Les solvants moins polaires (dichlorométhane, chloroforme, hexane, benzène) sont utilisés pour l'extraction de composés non polaires de la plante (cires, huiles, stérols, chlorophylle)(Stalikas, 2007).

L'extraction des AH de la pulpe de café à des fins analytiques a principalement été réalisée par des extractions conventionnelles solide-liquide. Ramirez-Coronel *et al.* (2004) ont étudié l'efficacité de l'extraction de composés phénoliques avec des solvants organiques. Ils ont procédé à une série d'extractions successives à l'hexane, au méthanol acidifié et à l'acétone acidifié. Le traitement au méthanol a permis d'extraire 60 à 66 % des AH de la pulpe, alors que l'extraction à l'acétone permet l'extraction de la quasi-totalité des AH (plus de 95 %). Pérez-Morales (2008) a évalué différentes concentrations en méthanol (60-100 %) pour l'extraction des AH de la pulpe de café. Plus tard, il a évalué l'effet combiné du temps d'extraction et de la température. Les meilleures conditions d'extraction ont été obtenues avec une solution à 80 % de méthanol, à la température de 56 °C et une durée d'extraction de 34 min.

L'extraction solide-liquide peut être utilisée pour extraire les AH libres et les esters solubles, tels que les ACG. Cependant, une fraction des AH sont estérifiés aux polyosides présents dans la pulpe et ne peuvent être extraits que par hydrolyse. L'extraction des AH estérifiés est généralement réalisée par hydrolyse alcaline. Torres-Mancera *et al.* (2011) ont étudié la

composition des AH libres et estérifiés dans la pulpe de café. Pour ce faire, ils ont comparé la quantité de AH extraits par hydrolyse alcaline, avec ceux obtenus par une solution de méthanol à 80 %. Selon leurs résultats, la plupart des AH (83,7 %) sont sous forme d'esters insolubles dans la pulpe.

Cependant, pour l'extraction à échelle industrielle de ces composés phénoliques, d'autres méthodes sont préférées telles que l'extraction assistée par ultrasons (EAU) ou l'extraction assistée par micro-ondes (EAM) (Acosta-Estrada *et al.*, 2014). L'EAU a été utilisée avec succès pour l'extraction des ACG à partir des feuilles de *Eucommia ulmoides* et de tabac (Li, 2005; Mazvimba *et al.*, 2012). L'EAM a été utilisée pour l'extraction des ACG à partir de *Lonicera japonica* et des grains de café vert (Upadhyay *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2008). L'EFSC a été utilisée dans l'extraction des ACG des grains de café vert (Azevedo *et al.*, 2008). Pourtant, ces méthodologies n'ont pas encore été utilisées à ce jour pour l'extraction des AH, et ACG, à partir de la pulpe de café.

Les solvants sont en effet, des substances très efficaces qui dissolvent les solutés contenus dans les matrices solides ou liquides et leur volatilité facilite leur élimination en fin de procédé. Cependant, les solvants organiques sont aussi, pour bon nombre d'entre eux, inflammables, très volatils et toxiques. De ce fait, leur utilisation est de plus en plus évitée compte-tenu de leur participation à la pollution environnementale et à l'effet de serre (Chemat, 2011).

Depuis quelques années, le domaine de l'extraction est entré dans une révolution « verte », en opérant une mutation vers l'« éco-extraction », pour développer et proposer aux industriels une chimie plus « durable » utilisant moins de solvants, moins d'énergie et diminuant les rejets, tout en assurant la qualité des produits finis. Les procédés biotechnologiques, tels que la liquéfaction enzymatique et la fermentation en milieu solide, sont de plus en plus utilisés dans le domaine de l'extraction du végétal pour augmenter le contenu phénolique des extraits par la rupture des liaisons esters entre les composés phénoliques et la paroi cellulaire de la plante. La libération de ces composés dans la solution d'extraction permet d'augmenter la teneur en composés bioactifs et par conséquent d'intensifier les propriétés fonctionnelles de l'extrait (Arellano-González *et al.*, 2011; Palmieri *et al.*, 2018). De plus, étant donné que les procédés biotechnologiques sont - en général - un outil doux, hautement sélectif et respectueux de l'environnement, leur application est envisagée pour le traitement des déchets et des co-produits alimentaires (Waldron, 2007).

4.2. Optimisation de l'extraction par des procédés biotechnologiques

4.2.1. Liquéfaction enzymatique

La liquéfaction enzymatique est une méthode spécifique et efficace pour libérer les composés phénoliques liés aux matrices végétales. Les enzymes qui hydrolysent les glucides comme les pectinases, les cellulases, les amylases, les hémicellulases et les glucanases ont été utilisées efficacement pour libérer des polyphénols. Des préparations enzymatiques commerciales à activités pectinase et estérase ont été utilisées pour solubiliser la plupart des acides phénoliques présents dans la pulpe de betterave sucrière afin d'obtenir des acides féruliques libres et estérifiés (Fazary et Ju, 2007). D'autres préparations enzymatiques ont été utilisées pour l'extraction des polyphénols à partir de pommes (Zheng *et al.*, 2009), de l'orge (Sancho *et al.*, 2001), de marc de cassis (Landbo et Meyer, 2001) et également à partir de pulpe de café (Rodríguez-Durán, 2016; Torres-Mancera *et al.*, 2011).

L'extraction enzymatique a été étudiée pour l'extraction des AH estérifiés à partir de pulpe de café. Benoit *et al.* (2006) ont utilisé une feruloyl estérase type B (FAE-B) pour extraire les AH totaux de la pulpe. Avec ce traitement, ils ont extrait en quantités importantes des ACG, 73 % de l'APC et 45 % de l'AF des AH de la pulpe. Torres Mancera *et al.* (2011) ont utilisé un extrait brut produit par *Rhizomucor pusillus* en fermentation en milieu solide et une pectinase commerciale pour l'extraction des AH de la pulpe. En utilisant cette combinaison ils ont réussi à extraire 54,4 % des ACG, 19,8 % de l'AF, 7,2 % de l'APC et 2,3 % de l'AC estérifié. Lors d'études ultérieures, en utilisant une combinaison d'extraits enzymatiques produites par *Aspergillus tamaraii*, *Rhizomucor pusillus* et *Trametes sp.*, ils ont réussi à extraire respectivement 36,1 % et 33 % des ACG et AC estérifiés (Torres-Mancera *et al.*, 2013).

Cependant, le traitement enzymatique n'est pas un procédé rentable car il nécessite de multiples étapes, y compris la production de multi-enzymes par des procédés de fermentation, leur extraction et purification avant d'être utilisé pour l'extraction des composés phénoliques. De plus, la plupart des enzymes utilisées dans ce domaine d'application ont des prix de vente élevés (Dey *et al.*, 2016).

La fermentation en milieu solide a fait l'objet d'études récentes pour l'extraction et la production de composés phénoliques. Lors du processus de fermentation, différentes enzymes extracellulaires sont produites et utilisées simultanément pour extraire les composés

phénoliques et les libérer de la matrice végétale, ainsi que pour générer de nouveaux composés phénoliques via le métabolisme secondaire des microorganismes. Ainsi, l'utilisation des procédés de fermentation présente un intérêt majeur pour le traitement des co-produits végétaux en regard d'une valorisation industrielle (Martins *et al.*, 2011; Sath *et al.*, 2018).

4.3. La fermentation en milieu solide pour l'extraction des composés phénoliques

La fermentation en milieu solide (FMS) est définie comme toute fermentation effectuée en l'absence d'eau libre sur des matières solides humides qui agissent à la fois comme support physique et source de nutriments pour les microorganismes. En raison de cette faible disponibilité en eau, un nombre limité de microorganismes, principalement des levures et des champignons, peuvent être utilisés en FMS (Thomas *et al.*, 2013).

Parmi les avantages et quelques inconvénients des FMS, on peut citer (Perraud-Gaime, 1995) :

Avantages

- Simplicité du milieu de culture ; parfois il suffit seulement d'ajouter de l'eau au substrat
- Faible demande en énergie
- Utilisation directe des produits fermentés
- Extraction facilitée par la concentration élevée des produits
- Réduction du coût opératoire lors de la récupération des composés phénoliques à valeur ajoutée
- Peu d'effluents liquides à traiter
- Peu de contrôle du processus
- Rendements élevés

Inconvénients

- Problèmes de transfert de chaleur et de masse
- Régulation difficile des paramètres de culture (pH, humidité,...)
- Nécessité, dans de nombreux cas, d'un prétraitement du substrat ou du support
- Possibilité de contamination par l'air ambiant au moment de l'inoculation
- Estimation de la biomasse difficile

Les facteurs les plus importants à considérer lors du développement d'un procédé de FMS concernent la sélection des microorganismes et des substrats. Les microorganismes particulièrement adaptés à la FMS sont les champignons filamenteux, car la technique simule leur habitat naturel. Dans ces conditions, ils sont capables de synthétiser des quantités considérables d'enzymes et d'autres métabolites. Bien que les champignons filamenteux soient considérés comme les microorganismes les plus appropriés pour la FMS, les levures sont également capables de se développer dans un environnement à faible activité d'eau, et sont les microorganismes les plus utilisées en FMS après les champignons filamenteux (Soccol *et al.*, 2017).

Les substrats les plus adaptés pour la FMS sont les résidus agricoles et forestiers, qui sont très abondants et normalement sous-utilisés. Parmi les résidus agricoles qui peuvent être utilisés en FMS, on retrouve la bagasse de canne à sucre, la bagasse de manioc, le son de céréales comme le son de blé, le son de riz, le son d'avoine et le son de soja, la pulpe et l'écorce de café, les pelures de fruits, les épis de maïs, les pailles et les balles de diverses origines. Ces matériaux sont essentiellement composés de cellulose, hémicellulose, lignine, amidon, pectine et autres fibres (Farinas, 2015; Singhania *et al.*, 2009; Soccol et Vandenberghe, 2003).

Les co-produits de la filière du café ont été précédemment utilisés dans les procédés de FMS et plusieurs études ont confirmé leurs potentialités pour la culture de différentes souches de champignons, telles que *Rhizopus*, *Phanerochaete*, *Aspergillus*, *Gibberella fujikuroi*, *Mucor*, *Penicillium*, and *Neurospora* (Brand *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2002, 2012; Pandey *et al.*, 2000b). L'utilisation d'une souche de *Gibberella fujikuroi* et de la coque de café a conduit à la production d'acide gibbérellique (Machado *et al.*, 2002). Murthy et Naidu (2012) ont utilisé la pulpe, la coque, le tégument et le marc de café dans la production de xylanase par le champignon *Penicillium sp.* et les résultats ont montré une activité enzymatique plus élevée lorsque la coque était utilisée.

L'utilisation des levures pour la production de composés phénoliques à partir des co-produits du café n'a pas encore été reportée dans la littérature. L'application des levures dans le domaine de la valorisation des co-produits alimentaires concerne particulièrement la production de bioéthanol (Akbas et Stark, 2016). Cette production d'éthanol par les levures pourrait présenter un avantage à l'extraction des composés phénoliques, compte tenu de la meilleure solubilisation de ces composés dans des mélanges eau-éthanol. La fermentation alcoolique par *Saccharomyces cerevisiae* à partir de biomasse lignocellulosique présente encore l'avantage de

produire efficacement de l'éthanol à partir de sucres simples sans avoir besoin d'oxygénation. De plus, ces levures ont une tolérance relativement élevée à l'éthanol et aux inhibiteurs (comme les polyphénols), elles ont un pH optimal bas et sont généralement reconnues comme des microorganismes sains pour un usage alimentaire (GRAS) pour la consommation humaine (van Maris *et al.*, 2006).

La FMS semble ainsi être une bonne alternative pour l'extraction des composés phénoliques des résidus de la filière café (Palomino Garcia *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2011). Dans la littérature, il n'existe pas d'études à notre connaissance qui ait été consacrée à la recherche des meilleures conditions de fermentation de la pulpe de café (pour maximiser la teneur en phénols extraits) et qui ait été validée à différentes échelles. C'est l'un des axes de ce travail.

5. Séparation de composés phénoliques par techniques membranaires

Les extraits obtenus à partir de la pulpe par les méthodes susmentionnées consistent en des solutions diluées de AH avec différentes impuretés. En fonction de l'application souhaitée pour ce produit, ces extraits nécessitent une certaine concentration et une certaine pureté. Jusqu'ici, il n'y a aucune étude publiée portant sur la purification des AH extraits à partir de la pulpe de café (Rodríguez-Durán, 2016).

Parmi les techniques de récupération des composés phénoliques, les procédés membranaires représentent une alternative valable en raison de leurs faibles coûts d'opération et d'entretien, des faibles températures et pressions de travail, de la simplicité du contrôle et de la mise à l'échelle du procédé, et enfin des sélectivités élevées de séparation. En particulier, les procédés baromembranaires, telles que la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), et la nanofiltration (NF), ont été largement étudiés pour la récupération, la séparation et la concentration des composés phénoliques de différentes matrices végétales (Conidi *et al.*, 2018; Bhattacharjee *et al.*, 2017; Castro-Muñoz *et al.*, 2016; Mudimu *et al.*, 2012; Díaz-Reinoso *et al.*, 2010; Russo, 2007).

Après quelques généralités apportées sur les techniques membranaires, nous présenterons des applications possibles de ces procédés pour la séparation, purification et concentration des composés phénoliques à partir de matrices végétales.

5.1. Généralités

5.1.1. Définition

La filtration membranaire est un procédé physique continu de séparation en phase liquide. Sous l'action d'une force motrice, l'alimentation est fractionnée en deux phases : le rétentat, également appelé concentrat, qui est composé des molécules et/ou des particules retenues par la membrane, et le perméat qui a traversé la membrane. La filtration peut être réalisée en mode frontal ou en mode tangentielle (Figure 7).

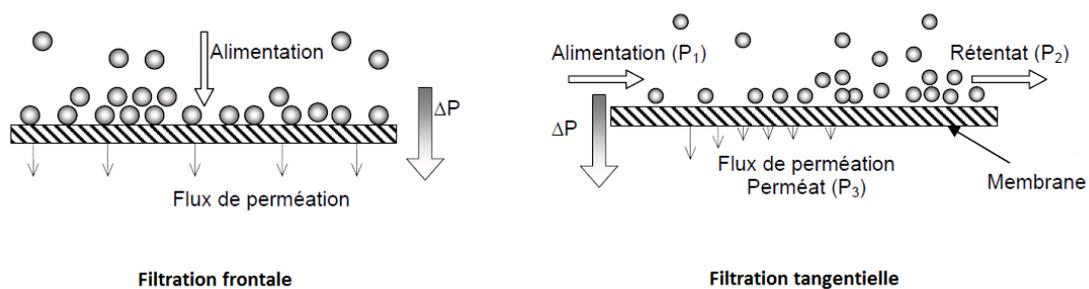


Figure 7. Modes de filtration membranaire (Siegfried et Justus, 2002).

La filtration frontale consiste à envoyer le fluide perpendiculairement à la membrane, toute la matière retenue s'accumule alors sur celle-ci. Ce procédé n'atteint jamais un état stationnaire et ne peut être adapté aux fluides fortement colmatants. Par contre, la filtration tangentielle consiste à faire circuler le fluide à filtrer parallèlement à la surface de membrane à une vitesse élevée qui engendre un gradient de cisaillement à la surface de la membrane limitant ainsi l'accumulation de matière (Siegfried et Justus, 2002).

5.1.2. Les procédés baromembranaires

Le transfert d'un ou de plusieurs solutés à travers la membrane est régi par une force motrice qui, dans le cas des procédés baromembranaires, est un gradient de pression. Ces procédés sont utilisés pour concentrer, fractionner et purifier les solutions diluées, en particulier les solutions aqueuses. Selon la nature et le type de solutés et la présence ou l'absence de particules en suspension, des membranes avec des tailles et des distributions de diamètre de pores différentes, ou même des membranes denses, peuvent être utilisées pour l'étape de séparation. Les principaux procédés baromembranaires sont la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI).

Les procédés de MF, UF, NF et OI sont une extension des procédés de filtration classiques qui, dans cet ordre, utilisent des médias filtrants (membranes) de plus en plus fermés, c'est-à-dire avec des pores de plus en plus petits. Dans le cas de l'OI, on considère que la surface de la membrane ne présente pas de pores. Les membranes avec des tailles de pores plus petits offrent une plus grande résistance au transfert de masse. Ainsi, afin d'obtenir des débits de perméat économiquement viables, il est nécessaire d'augmenter la pression de travail lors du passage de la MF à l'OI.

Le Tableau 3 illustre les espèces qui peuvent être retenues par les procédés baromembranaires. Le point commun à ces techniques est la vitesse de passage du liquide à traiter qui est parallèle à la membrane.

Tableau 3. Espèces retenues par les membranes de MF, UF, NF et OI.

Espèce	Masse Molaire (Da)	Taille (nm)	Procédé de séparation			
			OI	NF	UF	MF
Levures et champignons		$10^3 - 10^4$				X
Cellules bactériennes		$300 - 10^4$			X	X
Colloïdes		$100 - 10^3$			X	X
Virus		30 - 300			X	X
Protéines	$10^4 - 10^6$	2 - 10			X	
Polysaccharides	$10^3 - 10^6$	2 - 10		X	X	
Enzymes	$10^3 - 10^6$	2 - 5		X	X	
Sucres simples	200 - 500	0,8 - 1,0	X	X		
Acides organiques	100 - 500	0,4 - 0,8	X	X		
Ions	10 - 100	0,2 - 0,4	X			

Seuls les procédés de séparation MF, UF et NF sont présentés plus en détail ci-dessous, puisque l'OI n'a pas été étudiée dans ce travail.

5.1.2.1. Microfiltration tangentielle

La microfiltration (MF) est le procédé de séparation par membranes le plus proche de la filtration classique. Ce procédé utilise des membranes poreuses avec des tailles de pores comprises entre 0,1 et 10 μm et est donc indiqué pour la rétention des matières en suspension et en émulsion. Comme les membranes de MF sont relativement ouvertes, les pressions de travail utilisées sont faibles, rarement supérieures à 3 bar. Le fluide traité circule

tangentiellement à la membrane pour limiter l'accumulation de matière occasionnée par le flux de matière transversal généré par le gradient de pression au travers de la membrane. En MF, le solvant et tous les composés solubles sont récupérés dans le perméat. Seules les solides en suspension et les complexes macromoléculaires sont retenus par la membrane (Dornier *et al.*, 2018a).

5.1.2.2. Ultrafiltration

L'ultrafiltration (UF) est un procédé de séparation membranaire utilisé pour purifier et fractionner les solutions contenant des macromolécules. Les membranes d'UF ont des pores compris entre 1 et 100 nm, donc plus petits que ceux des membranes de MF. Les solutions contenant des solutés dans une large gamme de masse molaire ($10^3 - 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$) peuvent être traitées par ce procédé. Comme les pores des membranes d'UF sont plus petits, une plus grande force motrice (pression) est nécessaire pour obtenir des débits de perméat suffisamment élevés pour une application industrielle du procédé. Pour cette raison, les différences de pression à travers la membrane varient entre 2 et 10 bar.

En UF, le transfert de solutés se fait par convection. Ce transfert va être sélectif dans la mesure où la membrane va retenir des solutés dont le diamètre est plus gros que celui des pores. C'est une sélectivité purement physique liée au rapport de la taille des solutés à celle des pores de la membrane (Soro, 2012).

Les membranes d'UF sont normalement caractérisées par leur seuil de coupure, défini comme la valeur de la masse molaire pour laquelle la membrane a un coefficient de rejet de 90 %. Ainsi, une membrane avec un seuil de coupure de 15 kDa est une membrane capable de rejeter 90 % des molécules présentes dans une solution ayant une masse molaire de $15.000 \text{ g.mol}^{-1}$. Les flux de perméat UF sont généralement compris entre 150 et 250 $\text{L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ mais peuvent diminuer de façon importante en raison des phénomènes de polarisation de concentration et de colmatage, qui dépendent de la nature de la solution à traiter et des conditions de fonctionnement du système (Charcosset, 2012).

5.1.2.3. Nanofiltration

La nanofiltration est définie comme étant un procédé baromembranaire qui retient les molécules et particules dont le diamètre est de l'ordre du nanomètre. Avec des caractéristiques entre l'UF

et l'OI, les membranes de NF présentent une taille de pores généralement de 1 nm qui correspond à un seuil de coupure de 300-500 Da. Les pressions transmembranaires utilisées pour les différentes séparations sont comprises entre 5 et 30 bar (Cassano *et al.*, 2018).

Les membranes de NF en contact avec la solution aqueuse deviennent légèrement chargées en raison de la dissociation des groupes fonctionnels du matériau de la membrane ou de l'adsorption des solutés chargés à la surface de la membrane. Par exemple, les membranes polymériques de NF contiennent des groupes ionisables, tels que des groupes carboxyliques, qui peuvent être chargés en fonction du pH de la solution aqueuse (Mohammad *et al.*, 2015).

En NF, le transfert des solutés se fait par solubilisation-diffusion comme en OI et par convection comme en UF. La sélectivité entre les différents solutés va donc être à la fois d'origine chimique (OI) et d'origine physique (UF). En jouant sur les paramètres opératoires, il est possible de privilégier l'un ou l'autre des deux mécanismes, donc de moduler la sélectivité. Les paramètres physiques (pression, flux, température, etc.) ont une influence sur la convection, tandis que les facteurs chimiques (pH, complexation, concentration, etc.) ont une influence sur la diffusion (Soro, 2012).

5.1.2.4. Purification par diafiltration

La diafiltration est en fait un mode opératoire des procédés baromembranaires. Cette opération consiste essentiellement à faire fonctionner les procédés MF ou UF avec une alimentation continue de solvant à un débit égal au débit du perméat. Il s'agit en fait d'une opération de « lavage » de la solution à traiter. La diafiltration peut être utilisée lorsqu'on souhaite purifier un certain soluté dans une solution où les impuretés ont des dimensions plus petites que celles du soluté d'intérêt. Ainsi, les impuretés sont éliminées dans le perméat, tandis que la membrane conserve le soluté d'intérêt. Une fois la pureté désirée atteinte, l'ajout de solvant est arrêté et, si nécessaire, le soluté purifié peut être concentré. La diafiltration peut également fonctionner en régime semi-continu, le solvant étant ajouté par étapes. Bien que ce mode de fonctionnement soit plus courant pour les systèmes de MF et d'UF, il peut également être utilisé avec les membranes de NF (Pinto de Abreu, 2012).

5.1.3. Membranes et modules de filtration

Les membranes de filtration disponibles dans le commerce peuvent être de nature organique ou minérale. Les membranes organiques sont à base de polymères d'origine synthétique ou naturelle. Elles représentent aujourd'hui 80 % des membranes commercialisées. Elles se caractérisent par leur commodité d'emploi, leur disponibilité à différents seuils de coupure et leur coût de production maîtrisé. Le principal défaut des membranes organiques est leur faible résistance thermique, mécanique et chimique. Les membranes minérales peuvent être fabriquées en céramique, avec du carbone poreux, des métaux ou du verre. Elles se distinguent des membranes organiques par leur bonne tenue mécanique (pression élevée) et leurs excellentes résistances thermique et chimique. En effet, elles peuvent être utilisées dans des conditions de fonctionnement extrêmes (pH, température, fluide agressif, pression, etc.) (Habert, 2006).

Dans le commerce, les modules de filtration se trouvent sous différentes formes :

- **Module plan** : les membranes sont sous forme de feuilles agencées en compartiments. Ces derniers sont séparés par des joints pour assurer l'étanchéité. C'est la configuration la plus ancienne.
- **Module spiralé** : c'est un système d'enroulement de plusieurs membranes planes sous forme de spirale autour d'un tube creux. L'étanchéité entre les différents compartiments est assurée par collage. Cette configuration permet d'obtenir des surfaces filtrantes importantes pour un faible encombrement et un coût peu élevé.
- **Module tubulaire** : c'est un module poreux monocanal ou multicanaux (diamètre interne supérieur au centimètre). Ces modules sont conçus généralement pour les membranes minérales (céramiques) mais également pour des membranes en polymères.
- **Fibres creuses** : ce sont des membranes tubulaires de très faible diamètre (< 1 mm). Les fibres sont agencées parallèlement les unes contre les autres dans un carter. L'étanchéité entre les différentes fibres et le carter est assurée par un collage.

5.2. Performances et limitations des procédés baromembranaires

Les différentes techniques membranaires séparatives font intervenir des concepts fondamentaux communs dépendant de la membrane utilisée : la sélectivité et la productivité. Ces derniers déterminent l'efficacité du procédé. La sélectivité définit la capacité de la

membrane à retenir des composés d'intérêt. Elle est corrélée à un paramètre appelé la rétention R ou le taux de rejet (équation 1).

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_a} \quad (1)$$

Avec C_a , la concentration du soluté à retenir dans la solution en amont de la membrane (alimentation) et C_p , sa concentration dans le perméat.

La productivité est corrélée au débit de perméation J_p (ou densité de flux) (équation 2). Elle représente aussi la vitesse du fluide perpendiculairement à la surface de la membrane. Elle est exprimée en $L.h^{-1}.m^{-2}$.

$$J_p = \frac{Q_p}{S} \quad (2)$$

Avec Q_p , le débit de perméation ($L.h^{-1}$) et S , la surface utile de la membrane (m^2).

La diminution du flux de perméation lors de la filtration engendre une baisse de productivité. Cette diminution de l'efficacité du procédé résulte principalement de deux phénomènes : la polarisation de concentration et le colmatage. La polarisation résulte de l'équilibre qui s'établit entre le flux de perméation qui entraîne la matière vers la membrane et le transport rétro-actif de composés vers le fluide circulant. Le colmatage est la conséquence de l'ensemble des phénomènes physico-chimiques et microbiologiques qui se produisent à l'interface membrane-solution et/ou dans les pores de la membrane et qui modifient ainsi la sélectivité et la perméabilité de la membrane suite à l'obturation partielle ou totale des pores. La polarisation est un phénomène incontournable mais réversible alors que le colmatage dépend de la nature de la solution et des membranes.

Belfort *et al.* (1994) estiment que la réduction du flux se produit en trois phases :

- La première phase est caractérisée par une diminution importante et rapide du flux due à une sorption interne de macromolécules dissoutes.
- Au cours de la deuxième phase, la baisse du flux devient modérée. Elle est due à la mise en place des phénomènes de polarisation et l'augmentation de la pression osmotique.
- La dernière phase est caractérisée par une baisse très lente du flux. Elle est expliquée par formation d'un gâteau de filtration ou d'un gel de colloïdes.

Afin de diminuer le colmatage et augmenter la performance des procédés, il est nécessaire de comprendre les mécanismes de transfert et de séparation mis en œuvre lors de la filtration. La diffusion et la convection sont les phénomènes qui régissent le transfert de matière dans la membrane. Sous l'action d'une force motrice, le soluté est entraîné par convection vers sa surface. En fonction du diamètre de pore de la membrane, des particules et/ou des solutés vont être retenus au niveau de l'interface liquide-membrane et d'autres seront transmis. C'est ainsi qu'un gradient de concentration apparaît entre les compartiments perméat et rétentat, et engendre une accumulation de solutés dont découle une pression dite osmotique. Cette dernière s'oppose à la force motrice appliquée et permet par diffusion de générer un flux des zones concentrées (membrane) vers les zones diluées (solution).

La transmission ou la rétention des particules à travers la membrane est un phénomène complexe. Celui-ci dépend aussi bien des propriétés de la membrane que de celles du soluté. La rétention est gérée principalement par les réactions physicochimiques et électrostatiques et les lois hydrodynamiques qui peuvent se produire à l'interface soluté/membrane et à l'intérieur des pores.

Les deux phénomènes qui commandent la transmission sont :

- **Effets stériques** : ils sont dus au diamètre de pores de la membrane. Dans ce cas de figure, la transmission est fonction de la nature physique des composés, principalement, la forme et la taille des solutés ainsi que la dimension des pores de la membrane.
- **Effet électrostatique** : la transmission dépend particulièrement des propriétés chimiques et électrostatiques des solutés et de la membrane. Ces propriétés sont principalement l'hydrophobicité, la polarité, la charge et les groupements fonctionnels spécifiques (Baker, 2000).

5.3. Applications des procédés baromembranaires pour la séparation des composés phénoliques

Récemment, la récupération et la purification de composés bioactifs, en particulier de polyphénols solubles provenant des produits et des sous-produits de la transformation alimentaire, ont suscité un intérêt économique considérable (Cassano *et al.*, 2016; Heeger *et al.*, 2016; Azmir *et al.*, 2013). Les procédés baromembranaires couvrent une vaste gamme d'opérations impliquées dans la récupération de composés phénoliques à partir de produits

alimentaires (du prétraitement à l'étape de concentration). Ces procédés, combinés sous forme séquentielle ou avec d'autres technologies de séparation, offrent de nouvelles opportunités et perspectives pour la récupération efficace et sans perte d'activité des composés bioactifs le tout combiné à des coûts énergétiques, d'investissement et de main-d'œuvre peu élevés (Castro-Muñoz *et al.*, 2016; Galanakis, 2013).

La Figure 8 présente un aperçu de la stratégie de récupération des composés phénoliques par techniques membranaires. Généralement, cette stratégie de récupération comprend le fractionnement du produit par MF, UF et NF en séquence. L'étape de MF est utilisée pour éliminer les solides en suspension qui peuvent conduire à des problèmes opérationnels (encrassement précoce) dans les étapes suivantes. L'application de l'UF permet de retenir les macromolécules dans le rétentat tout en conservant les polyphénols dans le perméat. Enfin, l'étape de NF permet d'améliorer l'efficacité du procédé de récupération par la concentration des solutés dans le rétentat (Castro-Muñoz *et al.*, 2016).

Parmi les travaux de recherche publiés, de nombreuses études concernent la récupération des polyphénols par procédés membranaires lors du traitement des eaux usées provenant du lavage des olives (EUO) (Cassano *et al.*, 2013; Mudimu *et al.*, 2012; Galanakis *et al.*, 2010; Paraskeva *et al.*, 2007; Rahmanian *et al.*, 2014; Russo, 2007). Galanakis *et al.* (2010) ont évalué quatre membranes organiques d'UF (100, 25, 10 and 2 kDa) pour la clarification des EUO, montrant que la membrane la plus appropriée pour l'élimination des fractions des acides hydroxycinnamiques et des flavonols était la membrane de 25 kDa. A l'aide de cette membrane, presque tous les polyphénols initiaux ont été récupérés dans le perméat (rétention de 10 %). Puis, en utilisant une membrane de NF de 120 Da, une rétention élevée des polyphénols totaux a été obtenue (rétention de 70 % en moyenne et 99 % de récupération des acides hydroxycinnamiques et des flavonols initiaux). Les flux de perméat ont été assez élevés pour les membranes de 100 kDa, 25 kDa et 120 Da (76, 74 et 47 L.h.⁻¹.m⁻², respectivement) et très faible pour les membranes de 10 et 2 kDa (3 et 2 L.h.⁻¹.m⁻², respectivement).

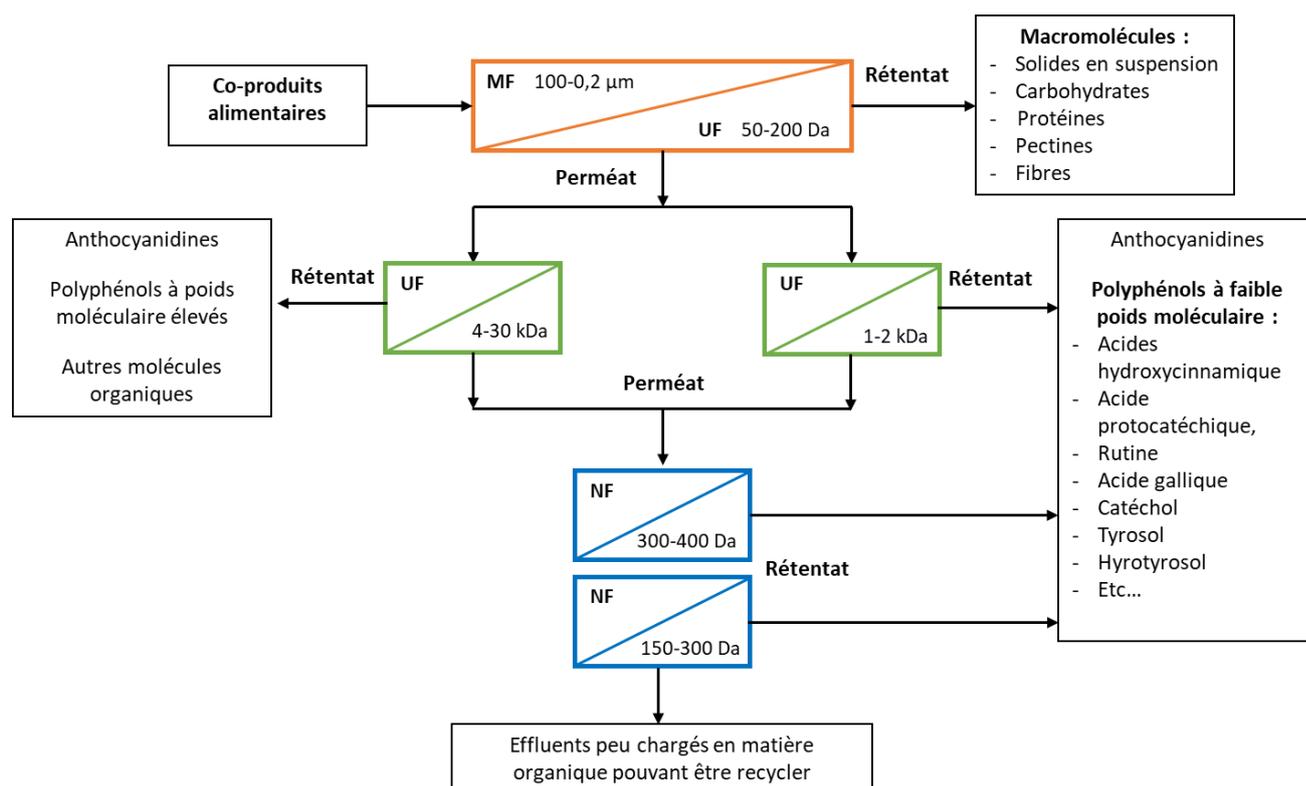


Figure 8. Combinaison de procédés membranaires pour le fractionnement des co-produits alimentaires (adaptée de Castro-Muñoz *et al.*, 2016).

Cassano *et al.* (2011) ont également évalué diverses membranes organiques planes d'UF (4, 5 and 10 kDa, Microdyn-Nadir) pour la récupération des composés phénoliques à partir des EUO après une première étape de microfiltration pour éliminer les solides en suspension. Les membranes en polyéthersulfone hydrophile (PES), de 10 et 4 kDa, ont été plus colmatées que les membranes en cellulose régénérée (5 kDa) et en PVDF (polyfluorure de vinylidène, 10 kDa), et les flux de perméat, après stabilisation, ont varié entre 39 et 20 kg.h⁻¹.m⁻² (10 kDa en cellulose et 5 kDa en PES, respectivement). Au niveau de la récupération des polyphénols dans le perméat, les membranes en cellulose régénérée ont présenté les meilleurs résultats (rétentions ≤ 5,5 %) en comparaison avec les membranes en PES (rétentions entre 9,3 - 17 %). Cette étude a mis en évidence que les polyphénols, probablement agrégés avec des polysaccharides, ont une plus grande affinité avec les membranes en PES polaires conduisant à un colmatage important par blocage des pores en UF.

Outre les EUO, d'autres co-produits alimentaires ont été étudiés. Par exemple, des composés phénoliques (flavonols, AH, proanthocyanidines, etc.) ont été récupérés à partir de pépins de raisin par extraction à l'éthanol-eau et ont été concentrés par UF (Nawaz *et al.*, 2006). Ce travail

a montré que l'intégration des étapes d'extraction et de concentration par UF a permis l'obtention des rendements d'extraction élevés, une haute sélectivité, un temps d'extraction court et des économies de main-d'œuvre importantes.

Les co-produits de l'industrie viticole ont aussi fait l'objet d'études dans ce domaine (Díaz-Reinoso *et al.*, 2010; Galanakis *et al.*, 2013), tout comme des extraits d'orange (Conidi *et al.*, 2012), le marc de raisin fermenté (Díaz-Reinoso *et al.*, 2009) et les co-produits du soja (Xu *et al.*, 2004). Ces études ont démontré que les procédés baromembranaires peuvent être utilisés pour récupérer les composés phénoliques à partir de co-produits alimentaires et que la polarité des solutés va être déterminante pour leur séparation sur des membranes organiques. Bien que la récupération complète de ces composés phénoliques dépende de la taille des pores de la membrane utilisée et de la composition du co-produit à traiter, la nature des molécules à récupérer joue également un rôle important. La présence de cycles aromatiques et de chaînes aliphatiques dans la structure moléculaire des polyphénols leur confère un caractère hydrophobe qui, suite à des interactions avec la membrane, réduit la performance du procédé (Castro-Muñoz *et al.*, 2016). De plus, des mélanges de polyphénols avec d'autres composants, tels que des polyosides, pourraient former des agrégats ayant une forte contribution au colmatage des membranes organiques (Ulbricht *et al.*, 2009).

A notre connaissance, l'extraction par membrane des acides phénoliques (principalement les acides hydroxycinnamiques) a fait l'objet d'une seule étude à ce jour (Velissariou *et al.*, 2006). Seul l'acide chlorogénique a été étudié à deux reprises dans l'artichaut et la yerba mate. Les résultats de Conidi *et al.* (2015) suggèrent qu'une membrane minérale (TiO₂) de seuil de coupure de 15 kDa permet d'extraire la totalité de l'acide chlorogénique d'un extrait aqueux d'artichaut (taux de rétention = 0 %) à un flux de perméat initial de 83 kg.h⁻¹.m⁻². L'étude de Prudêncio *et al.* (2012) a montré qu'une membrane organique (GE Osmonics) de seuil de coupure 150 Da permet de concentrer l'acide chlorogénique contenu dans un extrait aqueux de yerba maté à 97 % à un flux moyen de 22,8 L.h⁻¹.m⁻².

La performance des membranes organiques et inorganiques pour la séparation, la purification et la concentration des polyphénols à partir de leurs sources d'origine a été largement étudiée en fonction de la nature des interactions soluté-membrane. En effet, les interactions hydrophobes et électrostatiques, les phénomènes d'adsorption, les obstacles stériques ainsi que les effets de la solution sur la membrane, les propriétés soluté/membrane et les conditions

opérateurs jouent un rôle clé sur l'efficacité d'élimination et/ou la perméation des composés phénoliques au travers des membranes (Cassano *et al.*, 2017).

Ainsi, chaque produit à traiter aura un comportement particulier vis-à-vis de l'extraction, puis du fractionnement/concentration. Il est donc difficile de se référer aux travaux de recherche qui ont porté sur d'autres co-produits différents de la pulpe de café. Il est donc important de réaliser des investigations sur notre propre co-produit en considérant chaque étape de façon unitaire, puis de tester les combinaisons d'opérations unitaires afin de proposer des conditions appropriées de traitement pour obtenir un extrait de pulpe de café enrichi en composés phénoliques.

6. Conclusion

A l'issue de l'état de l'art réalisé sur l'agro-produit d'intérêt (pulpe de café) et sur les opérations unitaires utilisées pour l'extraction et la purification de composés phénoliques, une stratégie de traitement de la pulpe de café par fermentation alcoolique et par procédés membranaires est donc envisageable. Le travail expérimental consistera à étudier la faisabilité de ces procédés pour le traitement de la pulpe et à comparer les performances de chaque étape afin de sélectionner les meilleures conditions de traitement. Après l'étude de chaque opération, une réflexion sur l'intégration des différents procédés étudiés sera menée afin de proposer une ligne de production d'extraits phénoliques de la pulpe de café en vue de la valorisation industrielle de ce déchet.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel végétal et préparation de la pulpe brute

La pulpe de café de variété *Coffea arabica* utilisée au cours de ce travail, a été récoltée au Costa Rica pendant les campagnes des années 2015, 2017 et 2018 (Figure 1.a). Le lot de pulpe récolté en 2015 a été utilisé pour les études dédiées à la caractérisation de la pulpe et à la fermentation alcoolique à l'échelle laboratoire. Cette pulpe a été fournie par la coopérative de café « Beneficio Coopeunión » (Trés Rios, Costa Rica) ; elle a été congelée à -20 °C par lots de 3 kg et envoyée en France par avion dans un système à température contrôlée. A sa réception au CIRAD (Montpellier), la pulpe a été stockée à -20 °C à l'obscurité. Le lot de pulpe récolté en 2017 a été utilisé pour la validation de la fermentation alcoolique à l'échelle semi-pilote et pour l'étude de la microfiltration à l'échelle laboratoire. Cette pulpe, fournie par la coopérative « Beneficio Coopeunión », a été conditionnée au Costa Rica et envoyée en France de la même manière que pour le lot de pulpe de 2015.

Le lot de pulpe récolté en 2018 a été utilisé pour la validation de la fermentation alcoolique et de la microfiltration à l'échelle pilote au Costa Rica et pour la production des jus de pulpe pour les essais d'ultrafiltration et de nanofiltration réalisés à l'échelle laboratoire en France. Cette pulpe a été fournie par la coopérative de café « Beneficio San Diego » (San José, Costa Rica) la veille des essais de fermentation réalisés au Costa Rica ; elle a été stockée pendant une nuit à température ambiante et à l'obscurité avant son utilisation.



Figure 1. Pulpe de café réceptionnée (a) et pulpe de café broyée (b).

La pulpe brute a été préparée par broyage de la pulpe de café réceptionnée afin d'obtenir une matière première plus homogène (Figure 1.b). Pour les essais réalisés en France, des lots de 1 kg de pulpe décongelée ont été broyés à l'aide d'un Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Allemagne) pendant 1 min. à puissance maximale (niveau 10) sans apport de chaleur. Pour les essais de validation au Costa Rica, des lots de 10 kg de pulpe ont été broyés avec un cutter Cutmix SM45 (K + G Wetter, Biedenkopf, Allemagne) pendant 7 min. et à puissance maximale (niveau 2) sans apport de chaleur.

2. Caractérisation de la pulpe brute, des extraits et des sous-produits

2.1. Réactifs chimiques et composés de référence

Les solvants utilisés (méthanol, acétone, hexane et acétonitrile) sont tous de qualité CLHP et commercialisés par Honeywell (Seelze, Allemagne). L'eau est de qualité Milli-Q (Merck Millipore, Allemagne). L'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide formique, l'acide chlorhydrique, l'acide ascorbique, l'acide acétique glacial, l'acétate d'ammonium ainsi que le métabisulfite de sodium proviennent de Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne). L'hydroxyde de sodium provient de Honeywell (Seelze, Allemagne) et l'acide éthylènediamine-tétraacétique (EDTA) provient de Fisher Scientific Labosi (Paris, France).

L'étalon d'acides chlorogéniques contenant un mélange des acides : C3Q, C4Q, C5Q, F4Q, F5Q, Di3.4Q, Di3.5Q et Di4.5Q, a été fourni par International Development and Manufacturing (New Jersey, Etats-Unis). Le glucose, le fructose, l'éthanol, l'acide p-coumarique, l'acide caféique, l'acide férulique, l'épicatéchine, la caféine et le phloroglucinol proviennent de Sigma Aldrich (Steinheim, Allemagne).

2.2. Analyses physico-chimiques

Les méthodes d'analyses physico-chimiques classiques utilisées pour caractériser la pulpe de café, les extraits (jus de pulpe) et les sous-produits du procédé, sont résumées dans le Tableau 1. Seules les méthodes analytiques spécifiques sont décrites en détails dans les paragraphes 2.6 et 2.7.

Tableau 1. Méthodes d'analyses physico-chimiques courantes utilisées pour la caractérisation de la pulpe de café, des différents produits et sous-produits issus du procédé de traitement.

Analyse	Notation	Unité	Méthode	Matériel
Matière Sèche Totale	MST	kg.kg ⁻¹	Gravimétrie	Séchage à 100 °C pendant 48 h
Extrait Sec Soluble	ESS	°Brix	Réfractométrie	Réfractomètre Atago PAL-3
pH	pH	-	pH-métrie	pHmètre Schott Titroline
Acidité Titrable	AT	meq.L ⁻¹	Tritimétrie	Titrateur automatique Schott Titroline avec solution de soude de 0,1 N
Turbidité	TU	NTU	Turbidimétrie	Turbidimètre Hanna LP 2000
Couleur	-	-	Colorimétrie	Spectromètre Specord S600 Analytic Jena
Polyphénols Totaux	PPT	g.L ⁻¹ d'acide gallique	Folin-Ciocalteu	Appareil Tecan Spark 10 M
Sucres	-	g.L ⁻¹	CLHP	détecteur en UV ; 35 °C ; solution d'acide sulfurique 5 mM à un débit de 0,6 mL min ⁻¹ .
Caféine	-	g.L ⁻¹	CLHP	détecteur à barrettes de diodes ; 30°C ; solution eau/acide formique (98:2 v/v, solvant A) et méthanol (solvant B) ; élution du gradient : de 5 à 35 % B en 20 min, de 35 à 55 % B en 15 min, de 55 à 70 % B en 15 min, et enfin de 70 à 100 % B en 2 min, à un débit de 0,7 mL min ⁻¹ .

2.3. Extraction des acides hydroxycinnamiques libres

L'extraction des AH libres a été réalisée par extractions successives à l'hexane et au méthanol, comme décrit précédemment par Rodríguez-Durán *et al.* (2014). Une masse de 8 g de pulpe brute lyophilisée est soumise à 3 extractions successives à l'hexane (3 x 80 mL) pendant 15 min à température ambiante et sous agitation magnétique (150 rpm) pour éliminer les composés lipophiles. L'extrait hexanique est rejeté et le résidu solide est soumis à 3 extractions successives avec 80 mL d'une solution aqueuse à 80 % (v/v) de méthanol acidifiée avec de l'acide formique à 2 % (v/v). L'extraction est effectuée pendant 15 min sous agitation (100 rpm) à température ambiante. L'extrait méthanolique est concentré sous-vide et son volume final est ajusté à 10 mL avec du méthanol pur. L'extrait est filtré à travers un filtre de 0,45 µm avant son analyse par CLHP. Les acides hydroxycinnamiques (AH) extraits dans ces conditions sont

considérés comme libres (non liés aux parois cellulaires de la pulpe). Le résidu solide final est récupéré et conservé à l'obscurité jusqu'à son analyse.

2.4. Extraction des acides hydroxycinnamiques liés

L'extraction des AH liés a été réalisée par hydrolyse alcaline à la suite de l'extraction des AH libres, comme décrit précédemment par Rodríguez-Durán *et al.* (2014). Une masse de 600 mg de résidu solide issu de l'extraction des acides hydroxycinnamiques (AH) libres est soumise à une hydrolyse basique par addition d'une solution contenant 10 mL de NaOH, 10 mM d'EDTA et 1 % m/m d'acide ascorbique. Le rapport en masse pulpe/solvant est fixé à 1/20. Différents temps de réactions (30 min, 1 h, 2 h, 3 h) et différentes concentrations de soude (1 M et 2 M) sont testés afin de comparer les performances d'extraction des AH liés. La réaction est menée à température ambiante et sous agitation magnétique (150 rpm). A la fin du temps de réaction, le mélange est filtré sous-vide et la phase solide est rejetée. L'extrait filtré est neutralisé avec HCl 12 M jusqu'à l'obtention d'un pH inférieur à 3,0. L'extrait est filtré sur membrane de 0,45 µm et analysé par CLHP.

2.5. Extraction des tanins condensés et détermination du degré de polymérisation

Une masse de 8 g de pulpe brute lyophilisée est soumise à 3 extractions successives à l'hexane (3 x 80 mL, 5 min), puis au méthanol aqueux (40:60 v/v, 3 x 80 mL, 15 min) et enfin à l'acétone aqueuse (30:70 v/v, 3 x 80 ml, 15 min), à température ambiante et sous agitation magnétique (150 rpm). L'extrait d'hexane est rejeté tandis que les extraits de méthanol et d'acétone sont récupérés, puis lyophilisés (Cryonext modèle P6L85v, pendant 48 h). Le résidu solide final, après extraction par l'acétone aqueuse, est récupéré et conservé à l'obscurité jusqu'à son analyse (Kennedy and Jones, 2001).

Une masse de 10 mg d'extrait lyophilisé, ou 100 mg de résidu solide, est utilisée pour la réaction de phloroglucinolyse avec une solution de HCl 0,1 N préparées dans du méthanol contenant 50 g.L⁻¹ de phloroglucinol et 10 g.L⁻¹ d'acide ascorbique. La réaction est menée à l'obscurité et à 50 °C pendant 30 min (ou 60 min pour le résidu solide). Après ce laps de temps, le mélange est combiné avec de l'acétate de sodium aqueux à 300 mM dans un bain de glace fondante. La solution est filtrée sur membrane de 0,45 µm et analysée par CLHP. Le degré moyen de polymérisation des tanins est calculé en faisant la somme de toutes les sous-unités analysées

(monomères de flavan-3-ol et adduits de phloroglucinol, en moles) divisée par la somme de tous les monomères de flavan-3-ol (en moles).

2.6. Identification des composés phénoliques par CHLP-SM

L'analyse par CLHP-SM est réalisée sur une chaîne CLHP SURVEYOR, équipée d'un détecteur à barrette de diodes modèle UV6000LP, de pompes quaternaires P4000, d'un injecteur automatique AS3000 et couplée à un spectromètre de masse LCQ équipé d'une source d'ionisation électro-spray (THERMO FINNIGAN, San José, USA). La séparation est effectuée à l'aide d'une colonne ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m, AIT, France) thermostatée à 30 °C. La phase mobile est constituée d'une solution eau/acide formique/acétonitrile (99,1/0,1/0,8 v/v/v) (Solvant A) et acétonitrile (Solvant B). Les conditions d'élution sont décrites dans le Tableau 2. Le volume d'injection est de 10 μ L et le débit de la phase mobile est fixé à 0,7 mL.min⁻¹.

Tableau 2. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP-SM des acides hydroxycinnamiques.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	95	5
45	65	35
50	0	100
60	95	5
75	95	5

L'électro-nébulisation est réalisée en mode négatif. La plage de masses de travail est comprise entre 100 et 2000 Da, à 1 scan.s⁻¹. La température de désolvation est de 350 °C. La tension du spray est de 3600 V. Les fragmentations de type MSⁿ sont réalisées avec une énergie de collision de 35 %. La détection est effectuée à 330 nm pour les AH et à 280 nm pour les tanins. L'identification est réalisée sur la base de la masse moléculaire des ions et des spectres UV-visible.

2.7. Quantification des composés phénoliques par CHLP-DAD

La quantification est réalisée par CLHP à l'aide d'une chaîne CLHP Agilent Technologies 1200 équipée d'un détecteur à barrette de diodes, de pompes quaternaires et d'un injecteur automatique. La séparation est effectuée à l'aide d'une colonne ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, AIT, France) thermostatée à 30 °C. La phase mobile est constituée d'une solution eau/acide formique (98/2 v/v) (Solvant A) et méthanol (Solvant B). Les conditions d'élution sont décrites dans le Tableau 3. Le volume d'injection est de 20 µL et le débit de la phase mobile est de 0,7 mL.min⁻¹. La quantification est effectuée par étalonnage externe à 300 nm pour les AH et à 280 nm pour les tanins.

Tableau 3. Gradient d'élution utilisé pour l'analyse quantitative des composés phénoliques par CLHP-DAD.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	95	5
20	65	35
35	45	55
50	30	70
52	0	100
57	95	5
72	95	5

3. Procédé de traitement de la pulpe de café

3.1. Schéma du procédé complet de traitement

La Figure 2 présente les deux principales étapes du procédé de traitement de la pulpe de café. La première étape vise à l'obtention de l'extrait de la pulpe de café et l'étape 2 vise au fractionnement de l'extrait pour l'obtention d'un produit préconcentré/prépurifié. Dans l'étape 1 du procédé, la pulpe brute est traitée par fermentation alcoolique afin de libérer les acides hydroxycinnamiques liés et/ou emprisonnés dans les cellules végétales dans le but d'enrichir la phase soluble de la pulpe avec les composés ciblés. Ensuite, les acides hydroxycinnamiques sont stabilisés dans la pulpe par l'ajout d'un agent stabilisant. Enfin, le pressurage de la pulpe

fermentée produit l'extrait brut de pulpe et un résidu solide (gâteau) qui doit être valorisé/recyclé.

Dans l'étape 2 de fractionnement par techniques membranaires, l'extrait brut subit dans un premier temps une étape de clarification dont le but principal est l'élimination des fractions insoluble et colloïdale, puis ensuite passe par une étape de séparation des solutés (concentration/purification) afin d'obtenir l'extrait final. Comme pour l'étape 1, les déchets liquides (effluents) issus de l'étape de séparation par membranes pourront être recyclés et/ou réutilisés dans d'autres applications industrielles, selon leurs caractéristiques.

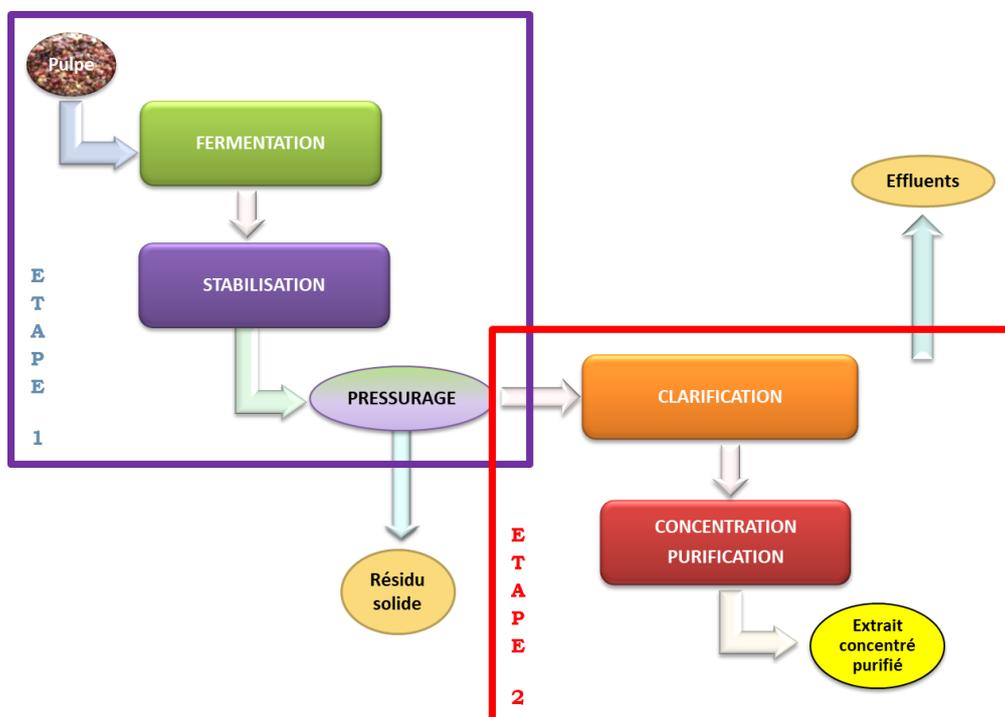


Figure 2. Schéma du procédé de traitement de la pulpe de café.

3.2. Obtention de l'extrait de pulpe

Le procédé d'obtention de l'extrait de pulpe de café comprend les étapes de fermentation alcoolique, stabilisation chimique et pressurage. Les études à l'échelle laboratoire et semi-pilote ont été effectuées en France au CIRAD (Montpellier) et la validation du procédé à l'échelle pilote a été effectuée au CITA (Université du Costa Rica) à San José, Costa Rica.

Les réacteurs utilisés pour la fermentation sont les suivants :

- échelle laboratoire : fermenteur à double paroi en verre (Legallais, Montferrier-sur-Lez, France) d'une capacité de 500 mL,
- échelle semi-pilote : autocuiseur ARTAME (Baguim do Monte, Portugal) avec une cuve inox 18/10 de 20 L,
- échelle pilote : bidon en polypropylène d'une capacité de 120 L, aseptisé avant utilisation.

Les souches de *Saccharomyces cerevisiae*, à 10^7 UFC.g⁻¹, ont été fournies par la société Lallemand (Toulouse, France). Ces souches ont été lyophilisées et conservées à 4 °C. Les levures sont réhydratées et multipliées pendant 30 min avec 10 fois leur masse d'eau stérile à une température de 35-37 °C. La pulpe broyée est ensuite inoculée à un ratio de 2,5 g de levures sèches par kg pulpe de café.

La fermentation alcoolique est menée à l'obscurité, à une température contrôlée de 28 °C et sans homogénéisation pour maintenir les conditions anaérobies de fermentation. Lors de l'échantillonnage, la pulpe est légèrement homogénéisée avec une spatule stérile afin d'assurer l'homogénéité du milieu. Les échantillons sont clarifiés par centrifugation à $8600 \times g$ pendant 15 min et le surnageant est utilisé pour les analyses.

La Figure 3 présente les différentes études réalisées à l'échelle laboratoire afin d'optimiser le procédé de fermentation (sélection des souches, étude des cinétiques de fermentation, couplage avec les ultrasons) et le dimensionnement du procédé aux échelles semi-pilote (12 kg) et pilote (90 kg).

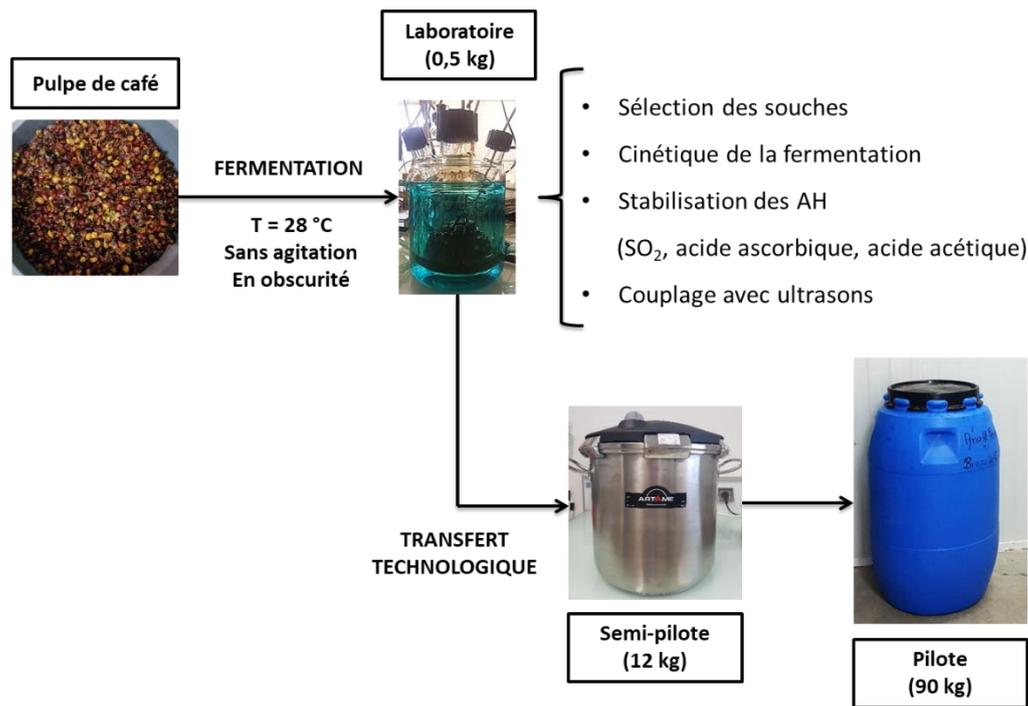


Figure 3. Etude de la fermentation alcoolique de la pulpe de café à l'échelle laboratoire et transfert technologique du procédé aux échelles semi-pilote et pilote.

L'étude de sélection des levures a été menée avec deux souches différentes, une à faible production de sulfite et l'autre à forte production de sulfite. Les teneurs en sucres et en acides hydroxycinnamiques de l'extrait ont été suivies pendant une période de 72 h après l'innoculation de la pulpe. La souche sélectionnée a été utilisée pour l'étude cinétique de la fermentation dans le but de trouver la durée optimale de fermentation. Dans ce cas, des prélèvements de pulpe ont été effectués toutes les heures afin de suivre la consommation des sucres et l'extraction des acides hydroxycinnamiques.

Pour l'étude du couplage avec un traitement par ultrasons, le fermenteur avec la pulpe inoculée a été placé dans un bain à ultrasons (Bransonic 3510E-MT 100 W, Danbury, Etats-Unis) avec une fréquence de 42 kHz. Les ultrasons ont été appliqués pendant 10 min (1) avant l'inoculation ou (2) pendant la fermentation, à une puissance totale de 250 W par kg pulpe de café.

Pour l'étude de la stabilisation de la pulpe, trois agents stabilisants à différentes concentrations ont été testés : (1) métabisulfite de sodium à 0,003, 0,05 et 0,5 % m/m ; (2) acide acétique glacial à 1 et 10 % m/m ; (3) acide ascorbique à 1 % m/m. L'agent stabilisant a été mélangé directement dans la pulpe avant l'inoculation ou pendant la fermentation, selon le cas, afin d'étudier l'effet sur la stabilité des AH et l'activité métabolique des levures.

À l'issue des étapes de fermentation et de stabilisation, la pulpe fermentée est pressée avec une presse hydraulique (Stossier LI P MO, Simaco, Bouzonville, France ou TC Y125, Owatonna Tool Company, Minnesota, Etats-Unis) pendant 30 min à 50 ou 60 bar pour obtenir l'extrait brut de pulpe (Figure 4). Les extraits de pulpe produits à l'échelle pilote au Costa Rica sont concentrés dans une boule de concentration sous-vide jusqu'à un tiers de leur volume initial, congelés à -20 °C et envoyés en France par avion dans un système à température contrôlée.



Figure 4. Extrait brut de pulpe de café fermentée après pressurage.

3.3. Fractionnement de l'extrait par techniques membranaires

La stratégie de fractionnement proposée est d'éliminer les particules présentes dans l'extrait de pulpe puis de séparer les solutés en fonction de leur taille (Figure 5). A ce niveau, différentes combinaisons de procédés membranaires (microfiltration, ultrafiltration, et nanofiltration) ont été testés afin de trouver des conditions adéquates de traitement (couple membrane/pression) en considérant à la fois les densités de flux de filtration (performances), la rétention des composés d'intérêt et des autres constituants qui constituent des impuretés. Les études de faisabilité du procédé (MF/UF/NF) ont été menées à l'échelle laboratoire en France (CIRAD et Institut Européen des Membranes) et un essai de transfert de technologie au niveau industriel a été effectué sur pilote semi-industriel de microfiltration au Costa Rica (CITA – Université du Costa Rica).

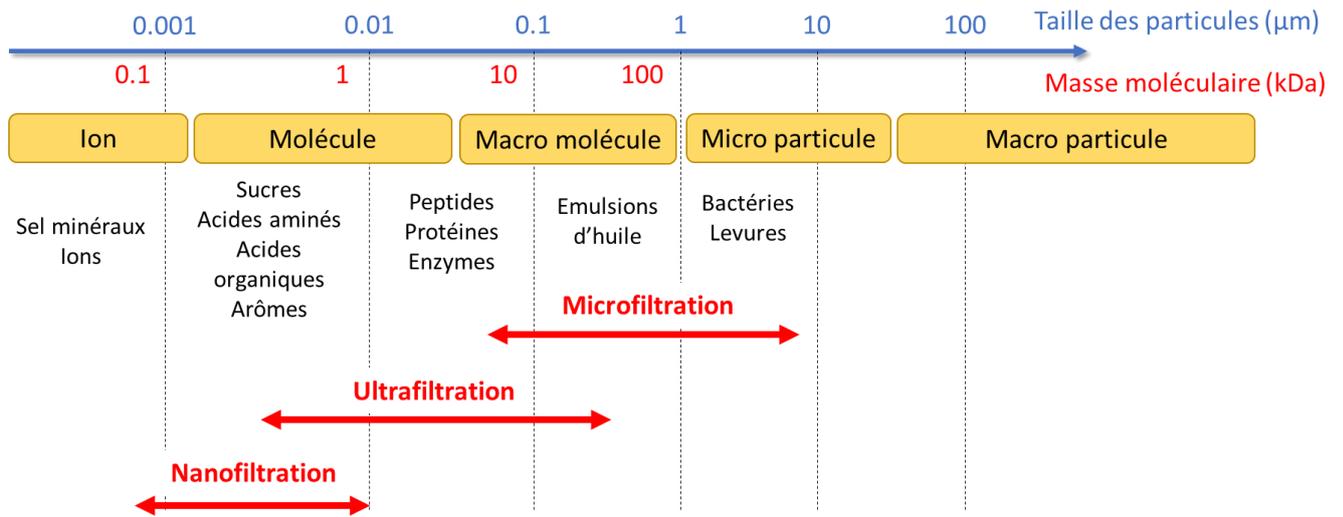


Figure 5. Stratégie de fractionnement par MF, UF et NF.

3.4. Caractéristiques des membranes

Les caractéristiques des membranes de microfiltration, d’ultrafiltration et de nanofiltration testées sont répertoriées dans le Tableau 4. Ces caractéristiques proviennent soit des fabricants de membranes soit ont été mesurées au cours des essais sur le pilote de laboratoire.

3.5. Exploitation des résultats

Les différentes techniques membranaires séparatives font intervenir des concepts fondamentaux communs dépendant de la membrane : la sélectivité et la productivité. Ces derniers déterminent l’efficacité du procédé.

L’efficacité d’une filtration dépend de la densité de flux de perméat (J), que l’on peut définir comme étant le rapport du débit volumique de perméat à la surface de la membrane utilisée, calculé selon l’équation 1.

$$J = \frac{Qp}{S} \quad (1)$$

avec J ($\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$), Qp , le débit de perméation ($\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$) et S , la surface de la membrane filtrante (m^2).

Tableau 4. Caractéristiques des membranes de microfiltration (MF), d'ultrafiltration (UF) et de nanofiltration (NF) utilisées au cours de l'étude.

Fabricant	Matériau	Référence commerciale	Codage	Géométrie	Diamètre moyen de pores (μm)	Seuil de coupure (Da)	Diamètre de tube (mm)	Surface membranaire (cm^2)	Perméabilité à l'eau [L/h.bar.m^2]
MF									
TAMI Industries	TiO_2	Inside CéRam	T1.4	Tubulaire monocanal	1,4	-	7	55	1803 ^a
		Inside CéRam	T0.2	Tubulaire monocanal	0,2	-	7	55	285 ^a
		Inside CéRam		Tubulaire multicanaux (8 canaux)	0,2	-	6	2,00E+03	2322 ^b
Pall Corporation	Al_2O_3	Membralox 1T1-70	M1.4	Tubulaire monocanal	1,4	-	7	55	429 ^a
		Membralox 1T1-70	M0.2	Tubulaire monocanal	0,2	-	7	55	148 ^a
		Membralox 1P19-40		Tubulaire multicanaux (12 canaux)	0,2	-	4	2,20E+03	1027 ^b
UF									
TAMI Industries	TiO_2	Inside DisRam	T50	Plane	-	50.000	-	52,7	277 ^c
			T15	Plane	-	15.000	-	52,7	68 ^c
			T5	Plane	-	5.000	-	52,7	36 ^c
			T1	Plane	-	1.000	-	52,7	20 ^c
NF									
GE Osmonics	Composite polyamide	GE	GE 1000	Plane	-	1.000	-	150	3,3 ^d
Microdyn-Nadir	Polyéthersulfone	NP010	NP 1000	Plane	-	1.000	-	150	10,7 ^d
Microdyn-Nadir	Polyéthersulfone	NP030	NP 600	Plane	-	600	-	150	2,5 ^d
GE Osmonics	Polyamide polysulfone	DL	DL 300	Plane	-	200	-	150	7,3 ^d

a = perméabilité à l'eau mesurée à 30 °C et à 2 bar.

b = perméabilité à l'eau mesurée à 25 °C et à 2 bar.

c = perméabilité à l'eau mesurée à 30 °C et à 20 bar.

d = perméabilité à l'eau mesurée à 30 °C et à 25 bar.

Lorsque l'on filtre un solvant pur comme de l'eau, le flux de perméat est proportionnel à la force motrice de transfert et s'écrit selon l'équation 2 (loi de Darcy).

$$J = \frac{\Delta P}{\mu.Rm} \quad \text{ou} \quad J = Lp. \Delta P \quad (2)$$

avec,

- J (m.s^{-1})
- ΔP : pression transmembranaire (Pa)
- Lp : perméabilité du solvant ($\text{m.s}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$)
- μ : viscosité dynamique du solvant (Pa.s)
- Rm : résistance hydraulique intrinsèque de la membrane (m^{-1})

La sélectivité d'une membrane peut être estimée par le taux de rétention des différents solutés présents dans la solution. Le taux de rétention du composé i (R_i) est calculé à partir de l'équation 3.

$$R_i = 1 - \frac{C_p}{C_a} \quad (3)$$

avec R_i (sans dimension) C_a , la concentration en solutés dans la solution d'alimentation et C_p la concentration en solutés dans le perméat.

La rétention d'un soluté peut être partielle ou complète tandis que le solvant passe librement à travers la membrane.

Lors des opérations de concentration, il est utile de suivre l'évolution du flux et de la rétention en fonction du Facteur de Réduction Volumique FRV (équation 4).

Le FRV est défini comme étant le rapport entre le volume total du jus ayant alimenté le circuit (V_0) et le volume de rétentat restant (Equation 4).

$$FRV = \frac{V_0}{V_0 - V_p} \quad (4)$$

avec V_0 , le volume de la solution d'alimentation et V_p , le volume cumulé de perméat filtré (ainsi $V_r = V_0 - V_p$).

La pureté du composé d'intérêt i par rapport à un autre composé j ($p_{i/j}$) se définit comme étant le rapport de sa concentration (c_i) sur la concentration de j (c_j). Le composé j pourra être la matière-sèche totale, l'extrait sec soluble ou encore les solides en suspension, (équation 5).

$$p_{i/j} = \frac{c_i}{c_j} \quad (5)$$

avec $p_{i/j}$ (kg.kg^{-1}) ; c_i : concentration du composé i ; c_j : concentration du composé j .

Enfin, le gain en pureté du composé d'intérêt i (GP_i), suite à une étape du procédé de traitement, se définit comme étant le rapport de sa pureté dans la solution finale après la filtration ($p_{i/jf}$) sur la pureté de i dans la solution d'alimentation ($p_{i/j0}$), selon l'équation 6 :

$$GP_i = \frac{p_{i/jf}}{p_{i/j0}} \quad (6)$$

avec GP_i (sans dimension) ; $p_{i/jf}$: pureté de i par rapport à j après filtration ; $p_{i/j0}$: pureté de i par rapport à j dans la solution d'alimentation.

3.6. Microfiltration

3.6.1. Unité de filtration

Pour la microfiltration tangentielle deux pilotes ont été utilisés : un pilote de laboratoire (France) et un pilote semi- industriel (Costa Rica).

Le pilote de microfiltration tangentielle (TIA, Bollène, France) a une capacité de 3 L et présente un volume mort d'un litre au niveau des carters et de la pompe. La circulation tangentielle du jus dans ce pilote est assurée par une pompe volumétrique à rotor excentré Moineau (modèle PCM, Levallois-Perret, France), qui maintient également sous pression le circuit rétentat. La vitesse tangentielle est fixée à 6 m.s^{-1} . L'équipement est constitué de quatre carters en série, contenant chacun une membrane céramique mono-tubulaire (55 cm^2). Un échangeur de chaleur, alimenté par un liquide de refroidissement dont la température est contrôlée par un cryostat

(modèle F34, Julabo GmbH, Seelbach, Allemagne) permet de réguler la température du jus à l'intérieur du pilote qui est mesurée grâce à un thermomètre placé à l'entrée de l'échangeur.

La pression est mesurée à l'aide de 2 manomètres placés à l'entrée du carter 1 (P_e) et à la sortie du carter 4 (P_s). Un troisième capteur de pression placé entre la sortie du carter 2 et l'entrée du carter 3 permet la mesure de la pression moyenne. Une vanne de contre-pression placée à la sortie du carter 4 permet la régulation de la pression moyenne dans les carters. Les pressions P_e et P_s sont fixées à des valeurs comprises entre 1 et 3 bar. Chaque membrane est caractérisée par une pression transmembranaire (PTM) qui est évaluée à partir des pressions d'entrée et de sortie, en supposant que le profil de pression est linéaire côté rétentat et en négligeant les pertes de charges générées par les deux coudes présents sur le circuit (Figure 6).

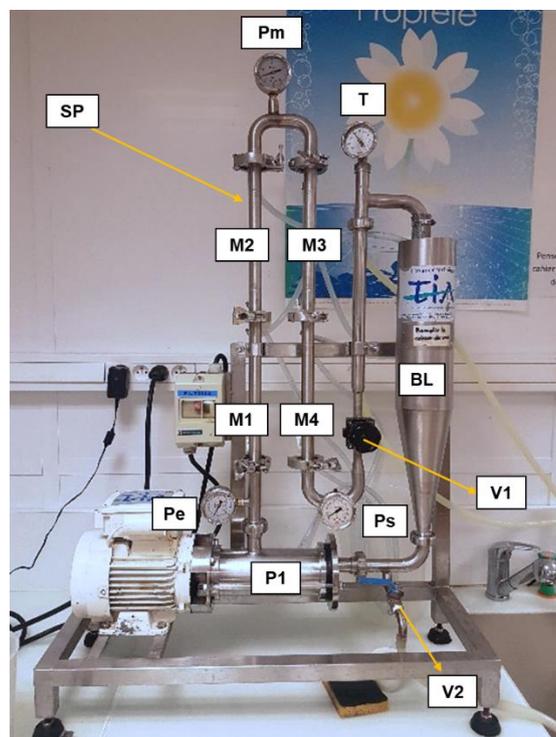


Figure 6. Pilote de laboratoire de microfiltration tangentielle (3 L) (surface membranaire : 55 cm²) : BL, bac d'alimentation ; SP, sorties perméat ; P_e , capteur de la pression d'entrée ; P_s , capteur de la pression de sortie ; P_m , capteur de la pression moyenne ; T, capteur de température ; V1, vanne de contre-pression ; V2, vanne de sortie du rétentat (vanne de vidange) ; P1, pompe Moineau ; M1-4, modules membranaires.

Le pilote industriel (CITA, San José, Costa Rica) a une capacité de 100 L et un volume mort de 4 L. Cette installation est munie d'un carter pour des membranes céramiques tubulaires

multicanaux ($0,2 \text{ m}^2$) et est alimentée par une pompe à déplacement positif. Cette pression est contrôlée manuellement pendant toute la durée des essais. La température est contrôlée grâce à un échangeur de chaleur tubulaire alimenté par de l'eau froide (Figure 7).

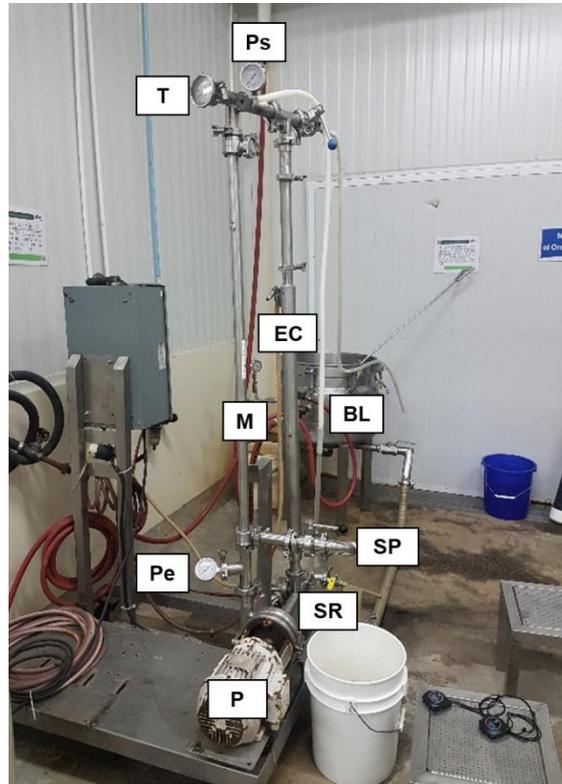


Figure 7. Pilote semi-industriel de microfiltration tangentielle (100 L) (surface membranaire : $0,2 \text{ m}^2$) : BL, bac d'alimentation ; SP, sortie perméat ; SR, sortie rétentat ; Pe, capteur de la pression d'entrée ; Ps, capteur de la pression de sortie ; T, capteur de température ; EC, échangeur de chaleur ; P, pompe à déplacement positif ; M, module membranaire.

3.6.2. Conduite des essais

Les essais de microfiltration sont réalisés avec l'extrait (jus) de pulpe fermentée obtenu par pressurage. Avec le pilote semi-industriel les essais ont été effectués à FRV croissant tandis qu'avec le pilote de laboratoire, les essais ont été réalisés soit à FRV 1 constant soit à FRV croissant.

Concernant le pilote de laboratoire, l'étude pour la sélection des membranes est réalisée avec un recyclage total des solutions (retour du rétentat et du perméat dans le bac d'alimentation pour maintenir une concentration constante dans le système) en utilisant des paliers de pression croissants (5 pressions transmembranaires testées, entre 0,8 et 3,3 bar). La température est fixée

à 30 °C et la vitesse tangentielle de circulation du jus dans les membranes est estimée à 6 m.s⁻¹. Les densités de flux de filtrat obtenues sur les différentes membranes testées ont été déterminées pendant 90 min en mesurant manuellement les débits de perméat toutes les 10 min. Ce mode de fonctionnement est utilisé uniquement pour étudier l'impact de la pression transmembranaire sur le flux de perméation.

Quant à la conduite des essais avec concentration (FRV croissant), le perméat est continuellement recueilli dans un récipient placé sur une balance pour la mesure de la masse de perméat au cours du temps. Les essais sur pilote semi-industriel sont réalisés à pression et température constantes, respectivement de 2,5 bar et 30 °C. La vitesse tangentielle de circulation est estimée à 5 m.s⁻¹. Au cours de la filtration, la température du rétentat ainsi que la pression moyenne du circuit sont ajustées pour respecter les valeurs de consigne. Le perméat est récupéré en continu dans un récipient en plastique aseptisé. La filtration est arrêtée lorsque le volume de rétentat correspond au volume mort de l'installation.

3.6.3. Nettoyage des membranes

Avant chaque essai de filtration, la perméabilité initiale des membranes est déterminée par une mesure du flux à l'eau désionisée à 30 °C. Une fois la perméabilité de la membrane propre vérifiée, la filtration du jus peut être réalisée. A la fin de la filtration, un lavage chimique classique à chaud d'abord à la soude, puis à l'acide nitrique est réalisé afin de retrouver la perméabilité initiale des membranes. La perméabilité à l'eau est mesurée après le lavage chimique. Si cette valeur est similaire à celle de la perméabilité initiale ($\pm 10\%$), les membranes sont considérées propres et une nouvelle opération de filtration peut être effectuée. Dans le cas contraire, un nouveau lavage chimique est réalisé jusqu'à l'obtention d'une perméabilité à l'eau acceptable.

3.7. Ultrafiltration

3.7.1. Unité de filtration

Les essais d'ultrafiltration à l'échelle laboratoire avec les membranes céramiques planes (T50, T15, T5 et T1) sont réalisées sur un module de filtration pseudo-tangentielle (porte-disque SPIRLAB (TAMI Industries, France) de surface filtrante 52,7 cm² (Figure 8). Le produit d'alimentation est envoyé dans le porte-disque à l'aide d'une pompe à engrenage (Gear Pump Drive, Cole Palmer). Le porte-disque comprend sur sa face supérieure (compartiment rétentat)

une entrée centrale pour l'alimentation et une sortie pour le recyclage du rétentat et sur sa face aval (compartiment perméat), une sortie pour le perméat. Le débit est enregistré en continu grâce au dispositif de collecte du perméat placé sur une balance connectée à un ordinateur.

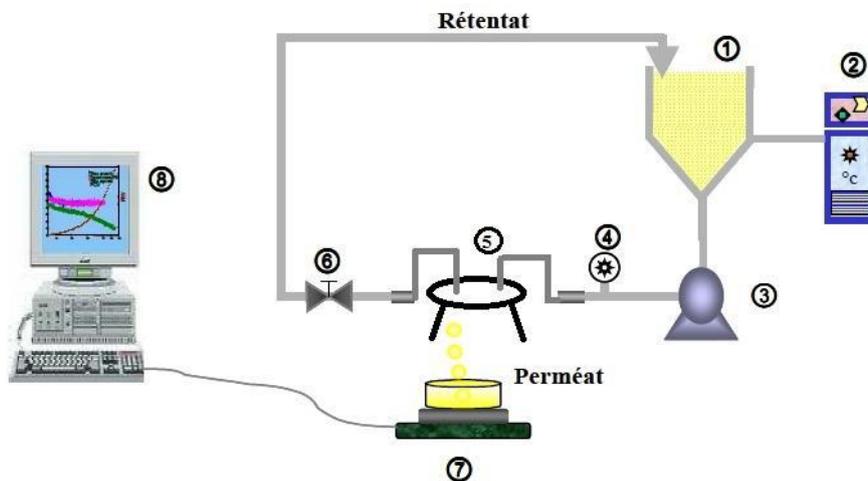


Figure 8. Installation d'ultrafiltration pseudo-tangentielle à l'échelle laboratoire (surface membranaire : $52,7 \text{ cm}^2$) : (1) bac d'alimentation ; (2) régulateur de température ; (3) pompe ; (4) manomètre ; (5) cellule SPIRLAB ; (6) vanne de contre-pression ; (7) balance ; (8) ordinateur.

3.7.2. Conduite des essais

Les essais d'ultrafiltration pseudo-tangentielle à l'échelle laboratoire sont réalisés avec deux extraits de pulpe, un extrait brut et un extrait clarifié, qui ont été produits à l'échelle semi-industrielle au Costa Rica. L'extrait brut a été utilisé pour déterminer l'intérêt de l'étape de microfiltration avant l'ultrafiltration et l'extrait clarifié pour tester différentes combinaisons MF-UF afin de fractionner l'extrait.

Pour chaque essai de filtration, la pression transmembranaire est fixée à $2,0 \text{ bar}$ et la vitesse tangentielle à $2,8 \text{ m.s}^{-1}$. Le perméat est collecté dans une cuve placée sur une balance reliée à un ordinateur. Ainsi l'évolution de la masse de perméat au cours du temps est enregistrée automatiquement et permet de déduire le débit du perméat, de calculer et suivre l'évolution des flux à différentes valeurs de FRV. La filtration est arrêtée lorsque le volume de rétentat est égal à 50 mL , ce qui correspond au volume mort de l'installation. Après la filtration, des échantillons de perméat moyen sont prélevés et congelés immédiatement pour les analyses et la membrane

est rincée à l'eau durant 15 min pour l'élimination du colmatage réversible. La perméabilité à l'eau est mesurée après le nettoyage chimique de la membrane.

3.7.3. Nettoyage des membranes

Le cycle de nettoyage comporte 3 phases importantes. La première consiste à faire circuler dans l'installation de l'eau chaude à 80 °C (élimination de la solution et préchauffage du pilote). La deuxième phase est un lavage alcalin : elle consiste à faire circuler une solution de soude (15 g.L⁻¹) durant 15 min sans pression puis 15 min sous une pression de 0,5 bar. La troisième phase (lavage acide) consiste à faire circuler une solution d'acide nitrique (7 g.L⁻¹, 0,34 %) durant 15 min sans pression. Il est important de faire suivre chacune des phases de lavage par un rinçage complet de la membrane (filtration d'eau osmosée jusqu'à l'obtention d'un perméat de pH neutre).

3.8. Nanofiltration

3.8.1. Unité de filtration

Le pilote de laboratoire de nanofiltration tangentielle a une capacité de 3 L et est composé d'un module plan pouvant recevoir une membrane organique d'une surface utile de 150 cm² (Osmonics Sepa ® CF) (Figure 9). Le pilote est équipé d'une cuve d'alimentation à double enveloppe permettant le maintien de la température à 30 °C. Le module membranaire est alimenté par une pompe à piston et la pression transmembranaire de travail est fixée grâce à une vanne en sortie de module côté rétentat. Des capteurs de pression et de température sont installés sur le pilote. Un système électronique d'acquisition des données permet d'enregistrer toutes les 10 s les valeurs de la pression transmembranaire appliquée et la masse de perméat recueilli au cours de l'essai grâce à une balance connectée.

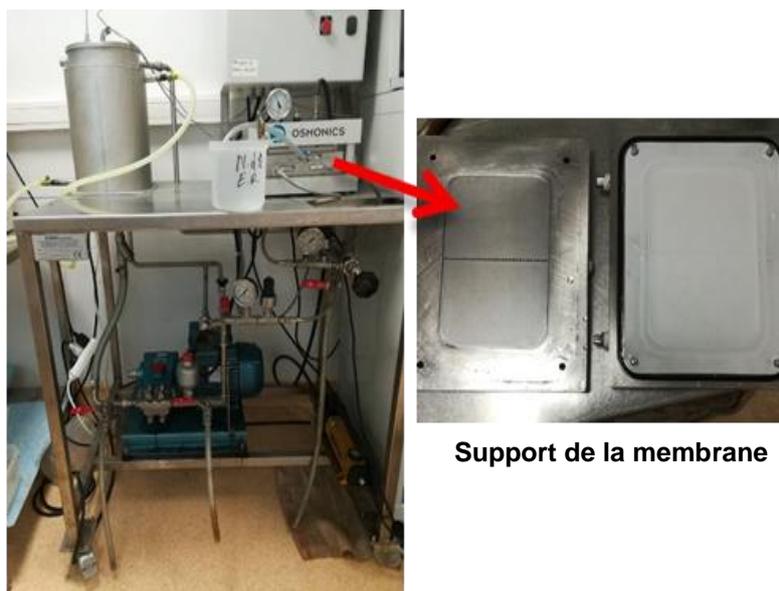


Figure 9. Pilote laboratoire de nanofiltration (3L) (surface membranaire : 150 cm²).

3.8.2. Conduite des essais

Les essais de nanofiltration sont réalisés en recyclage total avec retour du perméat dans le bac d'alimentation (FRV constant). Pour la détermination de la pression transmembranaire optimale, 3 L d'extrait microfiltré de pulpe sont versés dans le bac d'alimentation. Les densités de flux sont déterminées à 30 °C à des pressions transmembranaires (PTM) comprises entre 6 et 25 bar. Des prélèvements de rétentat initial et final, ainsi que du perméat sont réalisés à différentes PTM. Les membranes sont comparées en termes de densité de flux de perméat et de taux de rétention.

3.8.3. Nettoyage de l'installation

Le nettoyage du pilote est effectué après chaque filtration. La procédure de nettoyage consiste à rincer d'abord le pilote avec de l'eau à une pression de 5 bar, après production, jusqu'à ce que le rétentat soit parfaitement clair. Ensuite le lavage basique est réalisé pendant 30 min avec une solution de soude 2 % à pH 11, à la température de 40-45 °C et la pression de 5 bar. Le pilote est rincé à l'eau déminéralisée jusqu'à neutralité du perméat et du rétentat. On procède ensuite au lavage acide pendant 20 min avec une solution d'acide nitrique 2 % à pH 2 à 20-35 °C et 5 bar. Enfin l'installation est rincée avec de l'eau déminéralisée jusqu'à neutralité du perméat et du rétentat. Par précaution, une membrane neuve est utilisée pour chaque nouvel essai. La perméabilité des membrane est mesurée avant chaque essai, après 45 min de filtration d'eau distillée à température ambiante et sous une PTM de 30 bar.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Les résultats issus de ces travaux de recherche sont présentés et discutés à travers cinq (05) parties :

- caractérisation de la pulpe de café et effet du procédé de prétraitement sur la composition de la pulpe,
- extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe de café par fermentation alcoolique et étude de la stabilité de l'extrait de la pulpe,
- étude de la microfiltration et l'ultrafiltration de l'extrait de la pulpe,
- étude de la concentration de l'extrait de pulpe par nanofiltration,
- intégration des opérations unitaires pour le traitement complet de la pulpe.

A l'exception des 2 dernières parties, les résultats sont présentés sous forme de publications scientifiques. Dans ce cas, une présentation synthétique de l'article et des principaux résultats obtenus précède la publication. Par soucis de simplicité, l'ensemble des références bibliographiques citées sont regroupées dans la liste proposée en fin de mémoire.

1^{ère} partie : caractérisation de la pulpe de café et effet du procédé de prétraitement sur la composition de la pulpe

Cette première partie décrit, sous forme d'un article soumis à *Food Chemistry*, les travaux réalisés pour caractériser la matière première et pour mieux identifier les composés d'intérêt présents dans la pulpe de café. Suite à des extractions successives au méthanol, les composés phénoliques solubles dans la pulpe ont été identifiés par CLHP-SM. Les acides hydroxycinnamiques (AH) représentent le groupe principal des composés phénoliques solubles, l'acide 5-caféoylquinique étant le composé majoritaire. L'hydrolyse alcaline de la fraction liée des AH a libéré de l'acide caféique (AC), ce qui indique que les AH liés sont des dérivés de l'AC, comme les acides chlorogéniques. L'analyse des proanthocyanidines (tanins condensés) a permis de déterminer le degré de polymérisation des tanins dans les différents extraits de la pulpe, ce qui pourra contribuer à la compréhension de son extractibilité. La teneur en caféine de la pulpe était de 5,62 g.kg⁻¹ en base sèche, ce qui est en accord avec la littérature.

L'impact d'un procédé de prétraitement sur la composition de la pulpe a ensuite été étudié afin d'évaluer son intérêt pour la détoxification et la valorisation de la pulpe. Ce procédé, qui intègre une étape de fermentation alcoolique et une étape de pressurage, a permis de réduire la teneur en caféine de la pulpe de 50 %, tout en diminuant significativement les quantités de déchets solides de 64 %. De plus, ce procédé a pu générer un extrait contenant des composés à haute valeur ajoutée (caféine et AH) qui pourra potentiellement être commercialisé pour des applications industrielles. Ainsi, ce travail a démontré l'intérêt du prétraitement de la pulpe de café par fermentation alcoolique et pressurage pour la valorisation de ce co-produit et pour la diminution de l'impact environnemental de la filière de transformation du café.

Publication n° 1

Da Silvera J. S., Mertz C., Morel G., Lacour S., Belleville M-P., Durand N., Dornier M. Alcoholic fermentation as a potential tool for coffee pulp detoxification and reuse: analysis of phenolic composition and caffeine content by HPLC-DAD-MS/MS. Soumise à *Food Chemistry* en octobre 2019.

Abstract

High-performance liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD) and liquid chromatograph triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-MS/MS) were used to characterize raw and fermented coffee pulps in terms of their phenolic composition and caffeine content. The qualitative analysis showed no significant differences between the raw and the fermented pulps. Free hydroxycinnamic acids (HAs) were mainly chlorogenic acids, with 5-caffeoylquinic acid as the major compound. Bound HAs released caffeic acids during alkaline hydrolysis, and no bound ferulic and p-coumaric acids were detected. The fermentation process allowed the detoxification of the pulp from caffeine by 50%, while significantly reducing the amounts of residue by 64%. Moreover, the fermented products could be further processed to provide high added-value molecules with potential industrial applications, providing a new source of income for the small coffee producers.

Keywords: coffee pulp, fermentation, phenolic compounds, caffeine, detoxification

1. Introduction

Coffee pulp is the main by-product from the wet processing of coffee cherries and it represents around 40% of the weight of the fresh fruit. With an average annual production of ten million tons of coffee beans (“ICO”, 2019), a huge amount of pulp is generated in the coffee producing countries (Central and South America, Central and East Africa, Asia). Most of this residue is disposed by dumping into the nature causing serious environmental problems (contamination of soil and groundwater due to the leachate toxicity). Traditional applications of coffee pulp (as fertilizer, livestock feed, compost, etc.) only use a fraction of the available quantity due to its high content of caffeine and polyphenols, considered anti-nutritional to animals and toxic to nature (Murthy and Madhava Naidu, 2012). Recent attempts have been made to detoxify coffee pulp for improved application in agriculture, and to use it for producing several added-value-products such as enzymes, flavor, aroma compounds, organic acids, etc. (Murthy and Madhava Naidu, 2010).

Coffee pulp contains, in a dry weight basis, about 50% of carbohydrates, 20% fibers, 10% protein, 2.5% fat, 1.3% caffeine, and it also contains tannins and other phenolic compounds (Pandey *et al.*, 2000). Four major classes of polyphenols have been identified in coffee pulp: flavan-3-ols, flavonols, anthocyanidins, and hydroxycinnamic acids (HAs). Among them, HAs represent from 39 to 49% of total phenolic compounds, with chlorogenic acid 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) as the predominant compound (Rodríguez-Durán *et al.*, 2014). Torres-Mancera *et al.* (2011) studied the content of free and bound HAs in coffee pulp and have shown that most of these compounds were found to be covalently bound to the cell wall (about 74–97%) and that they could not be removed by solvent extraction. Food processes such as fermentation, enzymatic extraction, alkaline and acid hydrolyzes occasionally assisted by ultrasound or microwave have the potential to release phenolics bound to plant cell walls (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe, & Serna-Saldívar, 2014). Alkaline and acidic hydrolyzes are the most common means of releasing phenolic compounds, although these molecules are better released with alkaline hydrolysis than in acid hydrolysis conditions (Kim, Tsao, Yang, & Cui, 2006).

We have previously reported that alcoholic fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* can be used to enhance the HAs content in coffee pulp extracts through the breakage of ester bonds between these molecules and the pulp cell wall, increasing their concentration and consequently functional properties (Da Silveira *et al.*, 2019). The extract from the fermented pulp could potentially be marketed to the food and pharmaco-cosmetics industries, generating a new source

of income for the small coffee producers. Moreover, the remaining solid is expected to contain less phenolics and caffeine, which could facilitate its reuse as animal feed, fertilizer or composting substrate, minimizing the waste disposal in landfills without proper processing, and improving the environmental impact and economic sustainability of the coffee sector. The aim of this study was to analyze the composition of raw and fermented coffee pulps using chromatographic methods (HPLC-DAD-MS/MS) to evaluate the use of alcoholic fermentation for coffee pulp detoxification.

2. Material and Methods

2.1. Raw Material

Coffee pulp from the wet depulping and demucilaging process of coffee beans (*Coffea arabica* L.) was supplied by the Beneficio Coopeunión, a coffee-producer cooperative located in Trés Rios (Costa Rica) during the 2015 harvest. As soon as obtained, the coffee pulp was frozen at -20°C and shipped to France by aircraft in a controlled temperature system. Upon arrival, batches of 1 kg of coffee pulp were thawed at room temperature and ground using a mixer Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Germany) for 1 min at maximum power (level 10) and without heating. The coffee pulp was then split into hermetically sealed flasks and stored at -20°C until use.

2.2. Chemicals

Methanol, hexane, acetone, and acetonitrile were of HPLC-grade from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Deionized water was obtained with a Milli-Q Waters system (Millipore, Germany). Ammonium acetate, formic, hydrochloric, glacial acetic and ascorbic acids, were all of analytical grade from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium hydroxide was purchased from Honeywell (Seelie, Germany) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was purchased from Fisher Scientific Labosi (Paris, France). Standards of caffeic, p-coumaric, and ferulic acids, (-)-epicatechin, caffeine, and phloroglucinol were all of analytical grade purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Standard of chlorogenic acids was purchased from International Development and Manufacturing (New Jersey, USA), which contained a mixture of: 3-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 4-feruloylquinic acid, 5-feruloylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid.

2.3. Coffee pulp samples

The raw coffee pulp sample was prepared by lyophilization during 48 h to obtain a powder that was kept dry and under darkness until use. The fermented pulp samples were obtained after alcoholic fermentation as we previously reported (Da Silveira *et al.*, 2019) using a commercial strain of *Saccharomyces cerevisiae* (10^7 CFU g⁻¹) kindly provided by Lallemand (Toulouse, France). First, the yeast was re-activated and multiplied using deionized water at 35°C for 30 min, at a ratio of 10 mL of water per g dried yeast, then the coffee pulp was inoculated at a ratio of 2.5 g yeast/kg pulp. Alcoholic fermentation was carried out in the dark without aeration or agitation, in a 600 mL double-walled glass fermenter (useful volume of 400 mL) for 24 h. The temperature was fixed at 28°C thanks to a thermostatic water bath, and the pH was monitored using Almemo measuring instrument (Ahlborn, Ilmenau, Germany). Glacial acetic acid at 1.0% and sodium metabisulfite at 0.5% were used to stabilize HAs in the coffee pulp during (at $t = 8$ h) and after the fermentation, respectively. At the end of the fermentation, the pulp was pressed using a hydraulic press (Stossier LI P MO, Samarco, Bouzonville, France) at 50 bar for 30 min. Two products were obtained after the fermentation process: pulp juice and pulp press cake. The juice was clarified by centrifugation at 8600 g for 15 min and preserved at 4°C until use, while the press cake was ground into a fine powder and kept dried until use. Both samples were kept under darkness.

2.4. Evaluation of moisture content

The moisture content of samples was evaluated by gravimetric method after 48 h at 100°C.

2.5. Extraction of free hydroxycinnamic acids

The extraction of free HAs was performed by successive extractions with hexane and methanol as previously described by Rodríguez-Durán *et al.* (2014). First, 8 g of raw pulp (or press cake) were extracted 3 times with 80 mL of hexane for 15 min under agitation (150 rpm) at room temperature to eliminate lipophilic compounds. Hexane extracts were discarded, and the remaining solid was extracted 3 times with 80 mL of aqueous methanol (20:80, v/v) acidified with 2% (v/v) formic acid. Methanolic extraction was carried out for 15 min under agitation (100 rpm) at room temperature. The methanolic extracts were combined, concentrated under vacuum, and the final volume was adjusted to 10 mL with pure methanol. For HPLC analysis, the extract was filtered through a 0.45 µm pore size filter. The HAs extracted under these conditions were considered as free (not linked to the pulp cell wall). All extractions were carried

out in triplicate. The free HAs in the pulp juice were analyzed by filtering the juice through a 0.45 μm pore size filter prior to HPLC analysis.

2.6. Extraction of bound hydroxycinnamic acids

Bound HAs were extracted by alkaline hydrolysis following the extraction of free HAs (Section 2.5). First, 600 mg of the remaining solid obtained after methanolic extraction of free HAs were hydrolyzed using a solution of 10 mL of NaOH at 1.0 or 2.0 M, 10 mM of EDTA and ascorbic acid at 1.0%. The mixture was incubated for 30 to 180 min under darkness at room temperature and under constant agitation (150 rpm). After the reaction, the mixture was filtered under vacuum and its pH was adjusted to 3.0 ± 0.2 with 12 M HCl. Prior to HPLC analysis, the mixture was filtered through a 0.45 μm pore size filter. All extractions were carried out in triplicate.

2.7. Extraction of caffeine

First, 1 g of raw pulp (or press cake) was extracted under agitation (150 rpm) at room temperature with hexane (3 x 10 mL, 5 min each), then with aqueous methanol (40:60, v/v) acidified with 2% (v/v) formic acid (4 x 10 mL, 15 min each). The methanolic extracts were combined and concentrated under vacuum. Then, the volume of the extract was adjusted to 30 mL with pure methanol. For HPLC analysis, the extract was filtered through a 0.45 μm pore size filter. All extractions were carried out in triplicate. The caffeine in the pulp juice was analyzed by filtering the juice through a 0.45 μm pore size filter prior to HPLC analysis.

2.8. Extraction of proanthocyanidins

For the extraction of proanthocyanidins, 8 g of raw pulp (or press cake) was successively extracted with hexane (3 x 80 mL, 5 min each), then with aqueous methanol (40:60, v/v) acidified with 2% (v/v) formic acid (3 x 80 mL, 15 min each), then with aqueous acetone (30:70, v/v)(3 x 80 mL, 15 min each). All extractions were carried out under agitation (150 rpm) at room temperature. Hexane extracts were discarded, while methanol and acetone extracts were recovered and then lyophilized. The solid residue, obtained after the extraction with aqueous acetone, was recovered and kept dry until use. The juice sample was prepared directly by lyophilization.

For the reaction with phloroglucinol, 10 mg of dried extract (or 100 mg of solid residue) were used as starting material. A solution of 0.1 N HCl in methanol containing 50 g L⁻¹ phloroglucinol and 10 g L⁻¹ ascorbic acid was prepared. Phloroglucinolysis reaction was carried out using 2 mL of this solution, under darkness at 50°C for 30 min (or 60 min for the solid residue). After the reaction, the mixture was put on ice-bath and neutralized with 2 mL of 300 mM aqueous sodium acetate. The extract was filtered through a 0.45 µm pore size filter and analyzed by HPLC-DAD-MS/MS.

To calculate the apparent mean degree of polymerization (DP_n) of proanthocyanidins, the sum of all subunits (flavan-3-ol monomers and phloroglucinol adducts, in moles) was divided by the sum of all flavan-3-ol monomers (in moles).

2.9. Qualitative analysis by HPLC-MS/MS

The identification of phenolic compounds was carried out using an HPLC chain SURVEYOR, equipped with a diode array detector model UV6000LP, a quaternary pump P4000, an auto sampler AS3000 and coupled to a mass spectrometer LCQ equipped with an electro-spray ionization source (THERMO FINNIGAN, San Jose, USA). A column ACEC18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm, AIT, France) thermostated at 30°C was used. The solvents were a mixture of water/formic acid (99.8/0.2 v/v; solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient elution was from 5 to 35% B in 45 min, and from 35 to 100% B in 5 min, after which the column was washed during 10 min with 100% B, then equilibrated for 15 min with 5% B. The flow rate was 0.7 mL min⁻¹, the injection volume was 10 µL, and the detection was carried out between 200 and 600 nm. Experiments were performed in negative mode. Scan range was 100–2000 and scan rate, 1 scan s⁻¹. The desolvation temperature was 350°C. High spray voltage was set at 3600 V. Nitrogen was used as the dry gas at a flow rate of 75 mL min⁻¹. MS⁻ and MS² were carried out using He as the target gas, with a collision energy of 35%. Identification was achieved on the basis of the ion molecular mass and UV–visible spectra.

2.10. Quantitative analysis by HPLC-DAD

The quantification of phenolic compounds and caffeine was performed by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using an Agilent Technologies 1200 chromatograph (Santa Clara, USA) equipped with a diode-array detector DAD, a vacuum degasser, quaternary pumps, an automated sample injector, column ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, AIT France), with

identical pre-column, thermostatically controlled at 30°C. The injection volume was 20 µL. The solvents were a mixture of water/formic acid (98/2 v/v; solvent A) and methanol (solvent B). The gradient elution was as follows: from 5 to 35% B in 20 min, from 35 to 55% B in 15 min, from 55 to 70% B in 15 min, and finally from 70 to 100% B in 2 min, at a flow rate of 0.7 mL min⁻¹. The column was washed with 100% B for 5 min, then equilibrated for 15 min with 5% B. Quantification was carried out by external calibration using calibration curves of standard solutions ($R^2 > 0.99$) at 330 nm for HAs, and at 280 nm for epicatechin and caffeine.

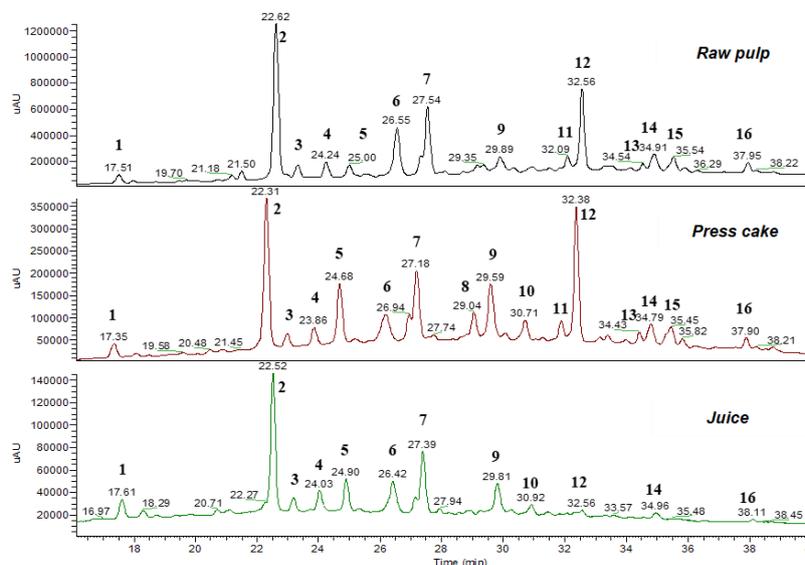
3. Results and discussion

3.1. Identification of free hydroxycinnamic acids

Identification of free HAs was carried out on the basis of UV-visible spectra, mass molecular ions and fragment ions and compared to literature data. The UV-visible characteristics and the mass data obtained by HPLC-MS/MS as well as the chromatogram at 330 nm are presented in Table 1. The numbers of the peaks were assigned according to the order of appearance in the chromatographic run.

According to the results, the main HAs identified in the pulp samples were chlorogenic acids, including caffeoylquinic acid isomers (peaks 1-3), 3 dicaffeoylquinic acid isomers (peaks 11, 12, and 15), and feruloylquinic acid (peak 7). The identity of these compounds was confirmed by co-injection with a commercial standard. Two co-eluted compounds, 4-caffeoylquinic acid and caffeoyl hexose, were detected in all three samples (peak 3). Other compounds identified were caffeic acid (peak 5) and a derivate of p-coumaric acid (peak 6). These HAs have been previously identified in coffee pulp by several authors (Heeger *et al.*, 2016; Duangjai *et al.*, 2016; Rodríguez-Durán *et al.*, 2014; Rios *et al.*, 2014; Martínez and Clifford, 2000; Ramirez-Martinez, 1988).

Table 1. Free hydroxycinnamic acids identified by HPLC-MS/MS in the raw pulp, press cake, and juice (chromatograms at 330 nm).



Peak nr.	R_t (min)	λ_{max} (nm)	MS^- (m/z)	MS^2 (m/z)	Tentative identification	Sample		
						Raw pulp	Press cake	Juice
1	17.3-17.6	300sh, 328	353	191 (100%), 179 (50%)	3-caffeoylquinic acid	X	X	X
2	22.3-22.6	300sh, 329	353	191 (100%), 179 (10%)	5-caffeoylquinic acid	X	X	X
3	23.0-23.5	300sh, 327	353	173	4-caffeoylquinic acid	X	trace	X
		300sh, 327	341	-	caffeoyl hexose	X	trace	X
4	23.8-24.2	un.	nd.	-	ni.	X	X	X
5	24.7-25.0	300sh, 327	179	-	caffeic acid	X	X	X
6	26.2-26.5	316	337	-	p-coumaric acid derivate	X	X	X
7	27.2-27.5	300sh, 324	367	193	5-feruloylquinic acid	X	X	X
8	29.0	300sh, 313	nd.	-	ni. (HA)	-	X	-
9	29.6-29.9	300sh, 313	nd.	-	ni. (HA)	X	X	X
10	30.7-30.9	300sh, 326	nd.	-	ni. (HA)	-	X	X
11	31.8-32.1	300sh, 330	515	179	3,4-dicaffeoylquinic acid	X	X	-
12	32.3-32.6	300sh, 331	515	179	3,5-dicaffeoylquinic acid	X	X	trace
13	34.4-34.5	un.	nd.	-	ni.	X	X	-
14	34.8-34.9	256, 360	nd.	-	ni. (flavonoid)	X	X	trace
15	35.4-35.5	300sh, 332	515	179	4,5-dicaffeoylquinic acid	X	X	-
16	37.9	226, 360	nd.	-	ni. (flavonoid)	X	X	trace

R_t = retention time; λ_{max} = maximum spectral absorption; MS^- : molecular ion mass in negative mode ; MS^2 : fragment ion mass in negative mode ; un. = undefined; nd. = not detected; ni. = not identified; HA = hydroxycinnamic acid

Some compounds were not detected by mass spectrometry and could not be identified. Nevertheless, based on their maximum spectral absorptions, it was possible to determine their polyphenol family. Peaks 8, 9 and 10 display the characteristics of HAs, while peaks 14 and 16 display the characteristics of flavonoid compounds. Peaks 4 and 13 could not be identified since it was not possible to determine their λ_{\max} and mass spectra. In a qualitative point of view, no significant differences were observed between the raw and the fermented pulp samples. Peak 8 was only present in the press cake, and peak 10 was only detected in the fermented pulp samples (press cake and juice). These two compounds were probably formed during the fermentation process, which could explain their absence in the raw pulp. Peaks 11-15 were either not detected or present in traces in the juice, possibly due to a lower solubility of these compounds in the juice, or due to their degradation.

The use of HPLC-MS/MS allowed to not only verify the phenolic profile of the coffee pulp but also to identify new phenolic structures formed during the fermentation process. Further studies need to be carried out in order to complete the identification of the unknown compounds as well as to analyze minor compounds that were not studied in this work.

3.2. Mean degree of polymerization of proanthocyanidins

The different pulp extracts and solids were analyzed for proanthocyanidins and characterized in terms of their mean degree of polymerization (DPn). Due to problems encountered during the lyophilization step of the fermented pulp samples and the methanolic extract from the raw pulp, only the acetic extract and the solid residues from the raw pulp were analyzed.

After phloroglucinolysis, only one phloroglucinol adduct was detected (m/z 413, fragment ion at m/z 289) and only epicatechin was detected as flavan-3-ol monomer terminal subunit. Results show that proanthocyanidins with higher DPn were solubilized in the aqueous acetone extract (DPn 9.2) as compared to the solid residue (DPn 5.6). Ramirez-Coronel *et al.* (2004) also studied the characteristics of coffee pulp proanthocyanidins and found values of DPn 7.6 in the acetone extract and DPn 5.7 in the solid residue.

By using a method based on phloroglucinolysis in conjunction with reversed-phase HPLC analysis, it was possible to characterize the raw pulp proanthocyanidins on a molecular weight basis giving information on their nature, proportion and distribution. For further studies, it could be of great interest to characterize the fermented pulp in order to verify any changes in

the polymerization degree of proanthocyanidins, which could possibly have a strong impact on the nutritional and ecological qualities of the treated pulp.

3.3. Optimization of extraction conditions for bound hydroxycinnamic acids

A preliminary study was carried out to investigate the optimum conditions of alkaline hydrolysis for the recovery of bound HAs from coffee pulp. The effect of the NaOH concentration (in the presence of ascorbic acid and EDTA) and the incubation time was evaluated using the raw pulp. Figure 1 shows the time course of caffeic acid extracted from the sample during the alkaline hydrolysis using two different NaOH concentrations (1.0 and 2.0 M).

In Figure 1, we observe a continuous increase in the amount of caffeic acid with the incubation time up to 2 h, followed by a decrease of this compound for longer incubation times, irrespective to the NaOH concentration. This observation can be explained by the coexistence of at least two reactions: First, the hydrolysis of the HAs covalently bound to the pulp cell wall that releases caffeic acid, and then a second reaction of degradation by oxidation (auto-oxidation, dimerization, dismutation) in such basic medium, that transforms the caffeic acid into other compounds (quinonic species, dimers, etc.), thus decreasing their content in the solution (Farah and Donangelo, 2006).

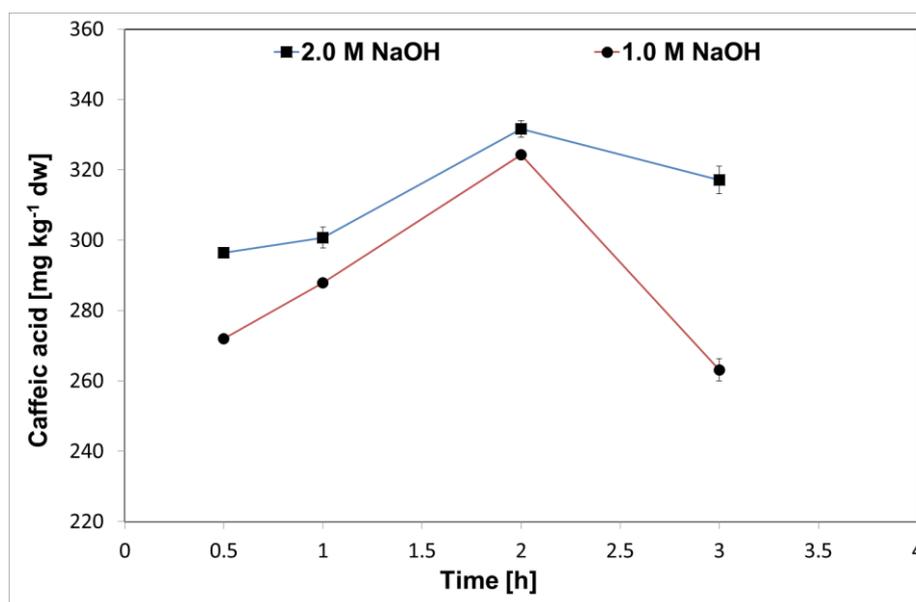


Figure 1. Time course of caffeic acid concentration during alkaline hydrolysis of raw coffee pulp with two different concentrations of NaOH (in the presence of 1% ascorbic acid and 10 mM EDTA).

Caffeic acid was the only compound detected after the hydrolysis reaction, which indicates that the bound HAs are caffeic acid derivates, like caffeoylquinic acids, that release caffeic acid when hydrolyzed. Bound ferulic and p-coumaric acids were not detected in the coffee pulp. These observations are in accordance with studies carried out by Rodríguez-Durán *et al.* (2014).

Give the above, the optimum conditions for the extraction of bound HAs from coffee pulp are achieved with a solution of 2.0 M NaOH and an incubation time of 2 h at room temperature. Therefore, we used these conditions for the analytical procedure.

3.4. Effect of alcoholic fermentation on coffee pulp composition and ecotoxicity

Figure 2 shows the concentration of each compound, in a dry weigh basis (dw), in the different pulp samples.

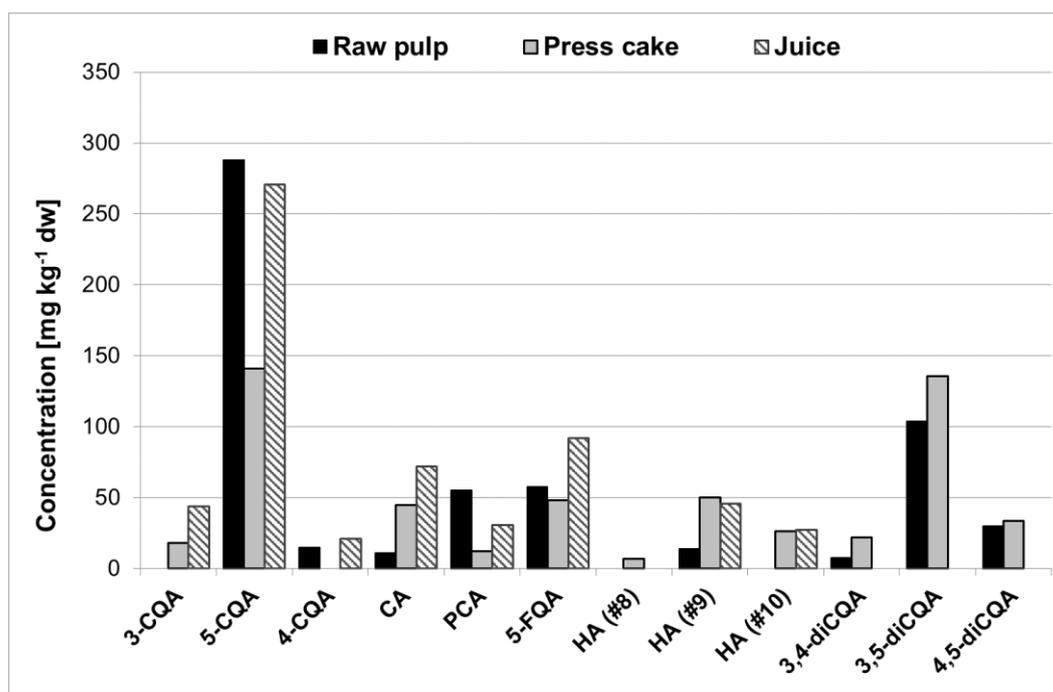


Figure 2. Concentration of free HAs per compound in the raw pulp, press cake and juice (dw = dry weight).

The most abundant compound is 5-CQA, which was found at 290 mg kg⁻¹ dw in the raw pulp, followed by 3,5-DiCQA (104 mg kg⁻¹) and 5-FQA (58 mg kg⁻¹). CQA isomers account for about 50% of total free HAs, and DiCQA isomers for about 25%, in the raw pulp. Data on coffee pulp chlorogenic acids (CGA) is usually given in total CGA content, which makes it difficult to compare values. Moreover, studies have shown that coffee pulp composition can

vary due to the characteristics of coffee fruits (cultivar, place of production, culture conditions, maturity, etc.), the postharvest management (methods of depulping, drying, storage, etc.), or even the analytical methods used (Duangjai *et al.*, 2016; Rios *et al.*, 2014; Rodríguez-Durán *et al.*, 2014).

Caffeic acid was found in concentrations 4.1 times higher in the press cake and 6.6 times higher in the juice as compared to the raw pulp, which could indicate either the release of this compound from the pulp cell walls or the conversion of other compounds into caffeic acid during the fermentation process. Most of the free HAs identified were recovered in the juice, with the exception of the dicaffeoylquinic acids, although higher amounts of HAs can be expected in the juice if the stabilization of these compounds during the fermentation process is achieved (Da Silveira *et al.*, 2019).

Table 2 shows the content of free and bound HAs, 5-CQA and caffeine in the different products. The content of free HAs was estimated as the sum of the compounds completely identified by HPLC-MS/MS (Section 3.1), i.e.: 3-caffeoylquinic acid (3-CQA), 5-caffeoylquinic acid (5-CQA), 4-caffeoylquinic acid (4-CQA), caffeic acid (CA), p-coumaric acid derivate (PCA), 5-feruloylquinic acid (5-FQA), 3,4-dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA), 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-diCQA), and 4,5-dicaffeoylquinic acid (4,5-diCQA).

Table 2. Characteristics of the raw pulp, press cake, and juice in terms of dry matter, hydroxycinnamic acids and caffeine.

Characteristic	Raw pulp		Press cake		Juice	
	wet basis	dry basis	wet basis	dry basis	wet basis	dry basis
Dry matter [kg kg ⁻¹]	0.16		0.24		0.07	
Free HA [mmol kg ⁻¹]	0.25	1.51	0.30	1.24	0.12	1.68
Bound HA [mmol kg ⁻¹]	0.30	1.80	0.50	1.95	0.00	0.00
5-CQA [mg kg ⁻¹]	47	288	34	141	20	271
Caffeine [g kg ⁻¹]	0.9	5.6	0.6	2.6	0.6	8.6

Caffeine was found at 5.62 g kg⁻¹ dw in the raw pulp, which is in accordance with literature data (Juliastuti *et al.*, 2018; Rios *et al.*, 2014; Braham and Bressani, 1979), although some authors have reported higher values of caffeine in coffee pulp up to 18 g kg⁻¹ dw (Ulloa Rojas *et al.*, 2003; Mazzafera, 2002; Pandey *et al.*, 2000b). The analysis of free and bound HAs

showed that about 55% of these compounds were found covalently bound to the pulp cell wall, in agreement with reports by Torres-Mancera *et al.* (2011) who found even higher portions of bound HAs, above 70% of total content. This ratio of bound HAs was also found in the press cake, which indicates that the fermentation process impacted preferably the free HAs trapped into the pulp cells and not so much the covalently bound HAs.

The fermentation process reduced the amount of caffeine in the press cake by 47% in a dry basis, and by 49% of 5-CQA. Since these compounds are considered as toxic to nature (“ecotoxic”) and are present in important concentrations in the pulp, alcoholic fermentation could be used as a pretreatment to detoxify the coffee pulp prior to its reuse in agriculture. Moreover, these compounds could be recovered from the juice and marketed to several industries due to their functional properties.

Table 3 summarizes the mass balance of the fermentation process in terms of the total amounts of compounds for 100 kg of raw pulp (64% of recovery yield for the pressing step and no mass losses during the fermentation process). Considering the amounts of each compound recovered in both press cake and juice, as compared to the raw pulp, we observed losses of 32% of HAs, 47% of 5-CQA, and 32% of caffeine that could be related to their degradation due to oxidation, light, enzymes, or even caused by the yeast activity (Mäkilä *et al.*, 2016; Mazauric and Salmon, 2005), despite the use of stabilizing agents (glacial acetic and sulfite) during the fermentation process. The ratio of free/total HAs slightly increased from 0.46 in the raw pulp to 0.51 in the fermented one, but considering the losses mentioned above, this ratio difference could have been much greater if the HAs extracted were successfully stabilized.

The positive effect of the process was also noticeable in terms of the amounts of residue to dispose, 64% less pulp than without pretreatment, and with 50% less caffeine in the pulp residue (press cake). This remaining residue could be potentially used for obtaining organic carbon, applicable in agriculture as a fertilizer or as a precursor for biofuel, and as a raw material in a flash pyrolysis to obtain a rich bio-oil containing valuable molecules applicable to industry (Ruiz Bailon, 2018). The juice, formed mainly by water (93%), can be further fractionated and purified to provide a natural extract rich in high added-value molecules (polyphenols and caffeine), while the water can be recovered during the downstream processing and reused in the process to obtain green coffee.

Table 3. Mass balance through the process for 100 kg raw pulp.

	Raw pulp	Fermented Pulp	
		Press cake	Juice
Total mass [kg]	100	36	64
Dry matter [kg]	16.3	8.7	4.7
Free HA [mmol]	24.7	10.7	8.0
Bound HA [mmol]	29.5	18.0	0.0
Total HA [mmol]	54.3	28.7	8.0
5-CQA [g]	4.7	1.2	1.3
Caffeine [g]	92.2	22.6	40.5

The overall environmental impact of the different products can be evaluated in terms of their ecotoxicity (content of total HAs and caffeine) and the amounts of residue generated (Figure 3). As we can observe, the fermentation process transformed the raw pulp into two products of inferior ecotoxicity, which could increase the opportunities for their reuse. Furthermore, the important decrease in pulp residue generated after the pretreatment would strongly contribute to the sustainable management of the coffee sector, considering the huge amounts of pulp generated every year worldwide (around ten million tons). Finally, we showed that with a simple fermentation process which addresses the goal of green chemistry, it is possible to detoxify the coffee pulp from caffeine, while providing a providing a new source of income for the small coffee producers.

The pretreatment process could be improved by studying new stabilizing agents to preserve the compounds extracted during the fermentation and by optimizing the operating conditions. It could also be relevant to characterize both raw and fermented pulps as soon as they are obtained to avoid losses of phenolic compounds caused by environmental stressors (light, temperature, oxygen) and storage methods, proving more precise values of coffee pulp composition. Other analytical methods could be tested to further characterize the products, giving more information on the potential industrial applications.

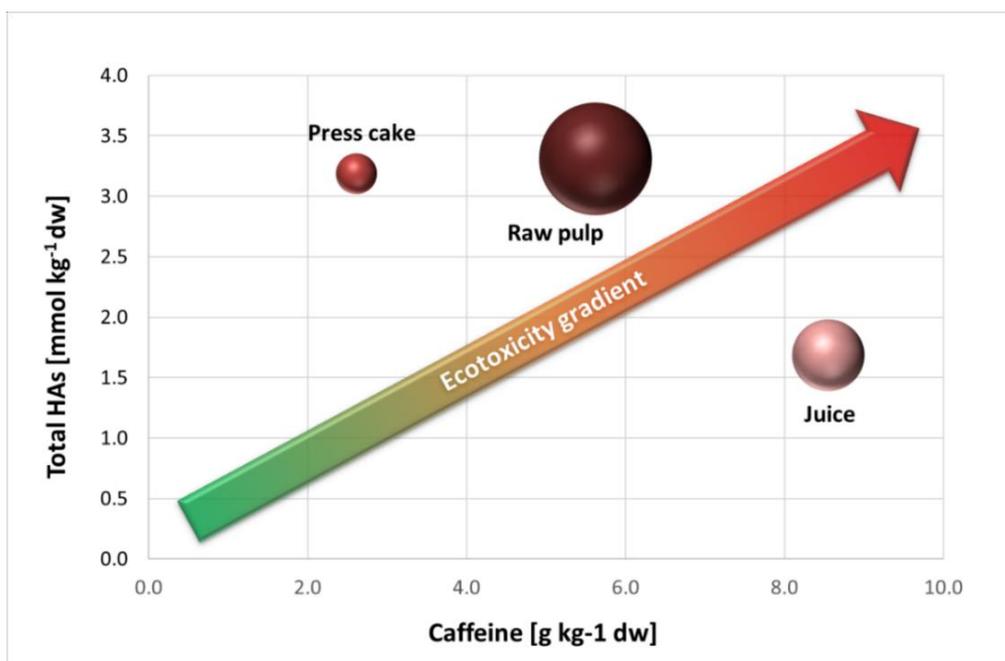


Figure 3. Effect of the fermentation process on the environmental impact of the coffee pulp products in terms of their ecotoxicity (caffeine and total hydroxycinnamic acid contents) and the amounts of residue generated (ball size).

4. Conclusion

This study allowed us to characterize a raw coffee pulp and to evaluate the effect of a new pretreatment process combining alcoholic fermentation and pressing on the composition of the pulp products in terms of the hydroxycinnamic acids (HAs) and caffeine contents using chromatographic methods (HPLC-DAD-MS/MS). Chlorogenic acids were the main compounds identified in the free form of HAs, with 5-caffeoylquinic acid as the major compound. The alcoholic fermentation released bound HAs linked to the pulp cell wall, providing a natural extract with valuable molecules, and decreased by half the amount of caffeine in the residue, contributing for its reuse in agricultural applications. The pretreatment significantly reduced the amounts of pulp to dispose, which would reduce the waste disposal and environmental impact of the coffee sector. However, further characterization studies are needed to gain more insight in the polyphenol content of both raw and fermented products. The fermentation process should continue to be optimized in order to achieve higher recovery yields and to avoid losses of valuable compounds.

2^{ème} partie : extraction des composés phénoliques à partir de la pulpe de café par fermentation alcoolique et étude de la stabilité de l'extrait de la pulpe

La plupart des acides hydroxycinnamiques (AH) se trouvent dans la pulpe de café sous forme insoluble, probablement en partie liés par une fonction ester aux polysides de la paroi cellulaire. Comme l'activité biochimique de l'extrait, et par conséquent sa valeur commerciale, est directement corrélée à sa teneur en composés phénoliques, la solubilisation des AH liés dans la pulpe est une étape-clé du procédé de traitement que nous cherchons à développer. Nous avons présenté dans le chapitre de synthèse bibliographique l'intérêt des procédés de fermentation pour la récupération des composés à haute valeur ajoutée à partir de co-produits alimentaires. Dans ce contexte, l'objectif du travail présenté dans la publication n° 2, est d'étudier la fermentation alcoolique de la pulpe pour améliorer les rendements d'extraction des AH.

Tout d'abord, des essais de fermentation à l'échelle du laboratoire (0,5 kg) ont été menés pour sélectionner une souche de levures capable d'extraire les AH liés aux parois de la pulpe et pour optimiser les conditions d'extraction. Le procédé de fermentation a permis d'augmenter de 2 à 3 fois la teneur en acide 5-caféoylquinique (C5Q) dans l'extrait de pulpe après 8 h de fermentation. Cet effet s'explique à la fois par l'action enzymatique des levures, qui va favoriser la libération de ces composés dans la phase liquide, ainsi que par la production d'éthanol pendant la fermentation qui peut favoriser la solubilisation de ce composé et son extraction.

Néanmoins, la dégradation du C5Q a été mise en évidence au-delà de 8 h de fermentation. Pour pallier ce problème, divers stabilisants ont été testés (bisulfites, acide acétique et acide ascorbique à différentes concentrations). Les meilleurs résultats ont été obtenus en additionnant 0,5 % m/m de bisulfite de sodium après 8 h de fermentation. Dans ce cas, la concentration en C5Q dans l'extrait de pulpe a pu être multipliée par 4 après 24 h de fermentation. La voie de stabilisation par acide acétique semble également présenter un bon potentiel, mais son efficacité est très sensible à la dose mise en œuvre.

Ensuite, une étude d'optimisation du procédé de fermentation a été menée afin d'évaluer l'effet du couplage d'un traitement par ultrasons sur l'extraction des AH liés. Les résultats ont montré que ce couplage n'apporte aucune amélioration significative par rapport à la seule fermentation.

Après l'optimisation des conditions opératoires de la fermentation, ce procédé a été testé à l'échelle semi-pilote (12 kg) en France et en pilote semi-industriel (90 kg) au Costa Rica. Malgré les différences de composition de la matière première et les limitations rencontrées lors du changement d'échelle du procédé (transfert de masse et de chaleur), les performances du procédé de fermentation alcoolique ont été confirmées, avec une multiplication par 3 de la teneur en C5Q dans l'extrait de pulpe après 24 h de fermentation.

Enfin, la fermentation de la pulpe par *Saccharomyces cerevisiae* a permis non seulement de produire un extrait enrichi en AH mais également de purifier partiellement l'extrait grâce à la consommation des sucres. De plus, après pressurage de la pulpe fermentée, la quantité de résidus solides est considérablement réduite. Nous avons démontré que la fermentation de la pulpe de café à l'échelle semi-industrielle avec un équipement très simple peut être utilisée pour obtenir un extrait enrichi en composés d'intérêt. Ce procédé peut être facilement mis en œuvre dans les pays producteurs de café, sans nécessiter de gros investissements financiers et avec des coûts d'exploitation limités. Il permet de diminuer l'impact environnemental de la filière et de générer une nouvelle source de revenus pour les petits producteurs de café.

À la suite de ces travaux, il sera important d'étudier la concentration et la purification de l'extrait de pulpe obtenu afin de produire un extrait plus adapté à de futures applications industrielles.

Publication n° 2

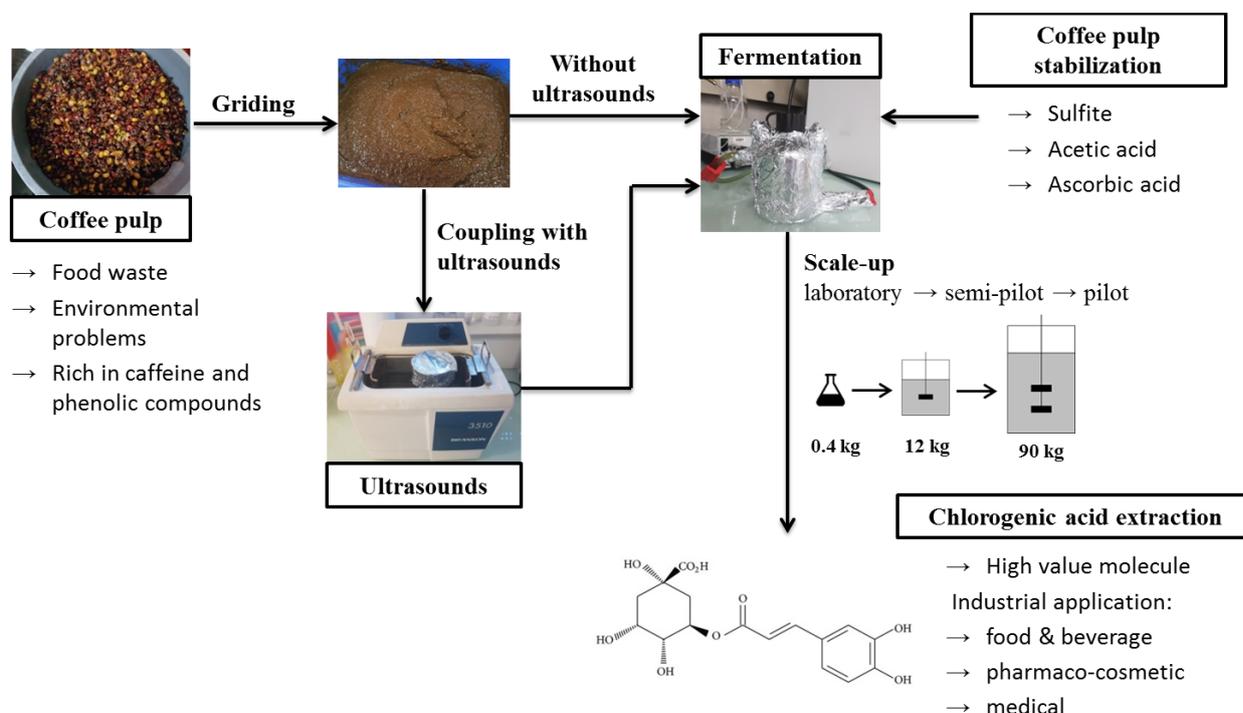
Da Silvera J. S., Durand N., Lacour S., Belleville M-P., Perez A., Loiseau G., Dornier M., 2019. Solid-state fermentation as a sustainable method for coffee pulp treatment and production of an extract rich in chlorogenic acids, *Food and Bioproducts Processing*, 115, 175-184.

Abstract

In this study, coffee pulp was used as carbon source in solid-state fermentation to produce a phenol-rich extract for industrial applications. Fermentations were carried out at laboratory (0.4 kg), semi-pilot (12 kg) and pilot (90 kg) scales in presence of 2.5 g kg⁻¹ yeast strains and with three different coffee pulp materials. The extract stability was investigated using different stabilizing agents: SO₂, ascorbic and acetic acids. Then, a study was conducted to determine the effect of ultrasound treatment on extraction yields. Results showed that higher concentrations of chlorogenic acids were obtained with fermentation without ultrasound treatment and by adding sulfite at 0.5 wt% at 8 h of fermentation. Despite of variations in coffee pulp composition, the process was validated at semi-pilot and pilot scales, providing an extract 400% richer in chlorogenic acids (600 mg per kg of coffee pulp) and with lower sugar amounts to separate during the downstream processing.

Keywords: coffee pulp, food waste treatment, alcoholic fermentation, phenolic compounds extraction, chlorogenic acids

Graphical Abstract



1. Introduction

Worldwide, population growth has accelerated the agro-industrial residues generation causing major environmental, economic and societal problems (water/soil/air pollution, toxicity, waste treatment and disposal). The coffee production sector, one of the most important commodity in the world, generates huge amounts of residues, such as coffee pulp, husk, skin, among others (Esquivel and Jiménez, 2012), which contribute about 50% of the total coffee fruit production. According to data from the International Coffee Organization (“ICO” 2017), global green coffee production in 2017 was estimated to be around 9.5 million t with over 90% of coffee production taking place in developing countries (Central and South America, Central and East Africa, Asia), whereas consumption is mainly in the industrialized economies. Coffee pulp is the main residue (40% mass of coffee fruit) obtained from the wet processing of coffee cherries and is considered as both ecotoxic and antinutritional to animals due to its polyphenols, tannins, and caffeine content (Murthy and Madhava Naidu, 2012). Nevertheless, coffee pulp is rich in sugars, proteins, minerals, amino-acids and also contains functional molecules of high industrial interest (phenolic compounds with antioxidative, anti-inflammatory, antimutagenic, antibacterial, and anticancer properties; caffeine with well-known psychotropic and diuretic properties) (Shahidi and Chandrasekara, 2010; Arellano-González *et al.* 2011).

Studies have shown that the data on coffee pulp composition can vary due to the characteristics of coffee fruits (cultivar, place of production, culture conditions, maturity, etc.), the postharvest management (methods of depulping, drying, storage, etc.), or even the analytical methods used (Duangjai *et al.*, 2016; Rios *et al.*, 2014; Rodríguez-Durán *et al.*, 2014). Four major classes of phenolic compounds were identified in recent studies: flavonols, flavan-3-ols, anthocyanidins, hydroxycinnamic acids and chlorogenic acids as the predominant phenolic compound (Heeger *et al.*, 2016). These molecules find evident applications in pharmaco-cosmetic, food and medical industries (Quideau *et al.*, 2011). Moreover, hydroxycinnamic acids (HA) including chlorogenic acids (CGA) can be converted into products of even higher added value (vanillin hemisynthesis as an example) (Di Gioia *et al.*, 2011). However, most of these molecules are found in coffee pulp conjugated to sugars as glycosides. Compounds such as chlorogenic acids are found in an ester form bonded to cell wall forming highly complex polysaccharide structures (Aster *et al.*, 2002).

Biotechnological processes such as solid-state fermentation can be used to enhance the phenolic content in plant extracts through the breakage of ester bonds between phenolics and the plant

cell wall, increasing their concentration and consequently functional properties (Palmieri *et al.*, 2018; Arellano-González *et al.* 2011). Solid-state fermentation is defined as any fermentation process performed on moist solid materials in the absence of free-flowing water that acts both as physical support and source of nutrients for microorganisms. Due to this low water availability, a limited number of microorganisms, mainly yeasts and fungi, can be used for solid-state fermentation (Thomas *et al.*, 2013).

Saccharomyces cerevisiae is an important microorganism used worldwide for producing food and beverages. This yeast has several advantages for ethanol production from lignocellulosic biomass: efficient ethanol production from simple sugars, it does not require oxygenation, has a relatively high tolerance to ethanol and inhibitors, has low pH optimum and is generally recognized as safe (GRAS) as a food additive for human consumption. The production of ethanol during alcoholic fermentation also presents an advantage for the recovery of phenolic compounds from agri-food solid wastes, as mixtures of water/ethanol have been shown to enhance the solubilization of phenols (Benmeziane *et al.* 2014).

Solid-state fermentation offers numerous advantages over other techniques such as lower energy requirements and the absence of sophisticated and complex machinery and control systems, providing a low-cost process in a sustainable framework. The main drawbacks of this method concern the process scale-up (heat transfer and culture homogeneity) and production yields. Several researchers have studied the application of ultrasound-assisted extraction to increase the conversion of starch materials to glucose as well as overall ethanol yield during fermentation processes by destroying plant cell wall and making it easier to microorganisms to access sugars from plant matrix (Chemat *et al.*, 2017; Nikolić *et al.*, 2010). Ultrasonication has been applied widely in various biological and chemical processes. However, the use of ultrasound-assisted extraction coupled to solid-state fermentation to treat food waste has not been widely investigated. The use of ultrasonics has the potential to break the pulp cell wall and to release sugars due to acoustic cavitation, enhancing ethanol production and phenolic compounds recovery.

A major concern expressed with regards to the extraction of polyphenols has been in relation to their stability. Phenolic compounds may undergo degradation due to temperature, light, oxygen, enzymes, and pH. Light and oxygen in the air are the two most important factors that facilitate degradation reactions. Enzymes (mainly oxidative enzymes) already present in the plant material can be released during the extraction process and promote such degradation

reactions (Mäkilä *et al.*, 2016). Therefore, to build an efficient extraction method, it is crucial to keep the stability of phenolic compounds. One way to avoid phenol degradation during extraction is by adding a stabilizing agent to the solution. In addition to presenting antifungal and antibacterial properties, sulfur dioxide (SO₂) is commonly used as a reducing agent and as an inhibitor of endogenous oxidases in winemaking (Blouin, 2014; Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Especially under its bisulfite form (HSO₃⁻), it can efficiently protect phenolics from chemical and enzymatic oxidations. Another well-known food preservative is ascorbic acid, a water-soluble antioxidant naturally found in many fruits and vegetables. In industry, ascorbic acid can be added to plant-based products to preserve its antioxidant capacity and provide chemical stability. Furthermore, in the presence of oxygen, ascorbic acid tends to oxidize, removing the environmental resources of oxygen (Varvara *et al.*, 2016).

The acidification of the solution presents an alternative to prevent phenol degradation by adjusting the pH with acidity regulators. The pH optimum of enzymes, such as polyphenol oxidase (PPO), ranges around pH 6-7 and becomes inactive below pH 4. Hence, the role of acidity regulators is to maintain the pH well below that necessary for optimal catalytic activity. Moreover, it is well-known that hydroxycinnamic acids are stable at lower pH (3-5), unlike basic conditions where isomerization and oxidation reactions can occur (pH≥7.0) (Friedman and Jürgens, 2000; Ma *et al.*, 2011; Narita and Inouye, 2013). A typical acidity regulator is acetic acid, an organic acid that has traditionally been used to improve the shelf-life and microbiological safety of food products. Glacial acetic acid can potentially be used during fermentation processes to enhance phenolic compounds extraction and stability by acidification of the medium, but can cause yeast death at certain concentrations (Leão *et al.*, 2001).

Based on these premises, the aim of this study was to investigate the extraction and stabilization of chlorogenic acids from coffee pulp during solid-state fermentation using commercial yeast strains. First, the process optimization was investigated at laboratory scale under well-controlled conditions. Then, the fermentation process was applied to larger scales in real condition of production in order to evaluate its interest for industrial application. The outcomes of this study are expected to contribute to the development of a sustainable and competitive method for coffee pulp treatment, applicable to all regions where coffee is produced by the wet processing method (around 50% of the worldwide production).

2. Materials and Methods

2.1. Raw material

Coffee pulp from the wet depulping and demucilaging process of coffee beans (*Coffea arabica*) was supplied by the Beneficio Coopeuni3n, a coffee-producer cooperative located in Tr3s Rios (Costa Rica), during the 2015 and 2017 harvests for assays at laboratory and semi-pilot scale, respectively. As soon as obtained, raw coffee pulp was split into lots of 3 kg, frozen at -20°C, and shipped to France by aircraft in a controlled temperature system. Upon arrival, the bags containing frozen coffee pulp were stored at -20°C. Prior to experiments, batches of 1 kg of coffee pulp were thawed at room temperature and ground using a mixer Thermomix TM31 (Vorwerk, Wuppertal, Germany) for 1 min at maximum power (level 10) and without heating. The coffee pulp was then split into hermetically sealed flasks and stored at -20°C.

For the fermentation at pilot scale, coffee pulp was supplied by the Beneficio San Diego, a coffee-producer cooperative located in San Jos3 (Costa Rica), during the 2018 harvest. The night before the experiment, coffee pulp was collected and stored at room temperature. Prior to the experiment, batches of 10 kg of coffee pulp were ground using a Bowl Cutter SM 45 (K+G Wetter, Biedenkopf, Germany) for 7 min at maximum power (level 2) and without heating. All batches of coffee pulp were gathered in a sterilized container and placed in a room at 28°C.

2.2. Chemicals

Methanol, sulfuric acid, and phosphoric acid were all of analytical grade from Honeywell (Seelze, Germany). Standard of chlorogenic acids containing a mix of 3-Caffeoylquinic acid (3-CQA), 5-Caffeoylquinic acid (5-CQA), 4-Caffeoylquinic acid (4-CQA), 4-Feruloylquinic acid (4-FQA), 5-Feruloylquinic acid (5-FQA), 3,4-Dicaffeoylquinic acid (3,4-diCQA), 3,5-Dicaffeoylquinic acid (3,5-diCQA), and 4,5-Dicaffeoylquinic acid (4,5-diCQA), was purchased from International Development and Manufacturing (New Jersey, USA). Standard of glucose, fructose and ethanol were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). L(+)-ascorbic acid, glacial acetic acid, and sodium metabisulfite, used to stabilize the chlorogenic acids during the assays, were all of analytical grade purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3. Solid-state fermentation

Two *Saccharomyces cerevisiae* strains used for solid-state fermentation, with a population of 10^7 CFU g⁻¹, were kindly provided by Lallemand (Toulouse, France). The yeast strains were dried and stored at 4°C.

Fermentations at laboratory scale were carried out using a double-walled glass reactor (Legallais, Montferrier-sur-Lez, France) with a working volume of 400 mL. The day prior to experiments, samples of 400 g of coffee pulp were thawed at room temperature under darkness. The yeast strain was re-activated and multiplied using deionized water at 35°C for 30 min, at a ratio of 10 mL of water per g dried yeast. During this time, the coffee pulp was maintained at 28°C in the fermentation vessels. The temperature of the outer jacket was controlled with a thermostatic water bath. Coffee pulp was inoculated at a ratio of 2.5 g yeast/kg coffee pulp, and solid-state fermentation was carried out at a fixed temperature of 28°C, in darkness and without stirring to maintain anaerobic conditions during the fermentation. Prior to sampling, coffee pulp was gently mixed using a sterilized laboratory tool to ensure homogeneity of the mixture. Samples were clarified by centrifugation at 8603 x g for 15 min.

Semi-pilot and pilot scale fermentations were carried out respectively in France in a 20 L stainless steel tank (Artame, Baguim do Monte, Portugal) containing 12 kg of coffee pulp and in Costa Rica in a 200 L sterilized polypropylene drum (Lacoplast S.A., Guatemala) containing 90 kg of coffee pulp. The tanks were placed in climate rooms set and preheated at 28°C for temperature control. Fermentations were carried out at 28°C, without stirring and under darkness. Coffee pulp was inoculated, sampled and clarified as described for laboratory scale. The coffee pulp extract was separated from the mash by pressing using a hydraulic press (Stossier LI P MO, Simaco, Bouzonville, France or TC Y125, Owatonna Tool Company, Minnesota, USA) at 50-60 bar for 30 min.

2.4. Stabilization procedures for chlorogenic acid stability

In order to prevent chlorogenic acid (CGA) degradation during the fermentation process, the performance of different stabilizing agents was studied at laboratory scale. Sulfur dioxide was used as sodium metabisulfite at 3 concentrations: 30 mg kg⁻¹ according to data from the yeast supplier as the limit sulfite concentration supported by their *Saccharomyces cerevisiae* strains, 500 mg kg⁻¹ a concentration used for sulfitic maceration of musts in winemaking that favors

polyphenol extraction rate (Blouin, 2014), and 0.5 wt% a very high concentration which guarantees total protection against oxidation. Glacial acetic acid was chosen as an acidity regulator at two concentrations: 1 wt% to stabilize CGA and allow yeast growth, and at 10 wt% to stabilize CGA and inhibit yeast activity. Finally, ascorbic acid at 1 wt% was used as an antioxidant (Narita and Inouye, 2013). The stabilizing agent was directly mixed to the coffee pulp before inoculation or at a certain time during the fermentation to study its effect on the stabilization of CGA and on yeast activity.

2.5. Ultrasound-assisted extraction

For particular experiments, the fermentation at laboratory scale was coupled to ultrasound-assisted extraction in order to evaluate the possible enhancement of chlorogenic acid extraction. The ultrasound treatment was carried out using a Bransonic model 3510E-MT 100 W ultrasound equipment (Danbury, USA) using 42 kHz as frequency. Ultrasounds were applied during 10 min (1) prior to inoculation or (2) at a selected time during fermentation where the maximum amount of CGA was extracted. Total power used was 250 W/kg of coffee pulp.

2.6. Analytical methods

The moisture of the raw coffee pulp was determined by gravimetric method in triplicate at 100°C after 48 h. The pH and temperature were obtained using an ALMEMO measuring instrument (Ahlborn, Ilmenau, Germany). The concentration of sugars and ethanol was determined by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) using a Dionex Ultimate 3000 chromatograph (Thermo Scientific) that was equipped with a refractive index detector (RID-10A Shimadzu), a UV detector (210 nm), and an Aminex HPX87H column that was operated at a temperature of 35°C using 5 mM sulfuric acid as the eluent at a flow rate of 0.6 mL min⁻¹.

The concentration of chlorogenic acid isomers was determined by HPLC on a system consisting of Shimadzu (Kyoto, Japan) Model LC 20AD pumping units, an automated sample injector (Shimadzu SIL 20 AXR), a variable-wavelength UV detector (Shimadzu SPD20A), column Uptisphere type ODB 5 (5 µm particle size, 250 x 4.6 mm), with identical pre-column, thermostatically controlled at 30°C. The elution program used two solvents, A and B. Solvent A was 4 mM phosphoric acid and solvent B was methanol. The following elution program was used: A—B mixture 95/5 v/v from min 0 to 35, to A—B mixture 25/75 v/v from min 35 to 40,

then pure solvent B from min 40 to 50, to A—B mixture 95/5 v/v from min 50 to 55. Flow rate was 1 mL min⁻¹. UV detection was at 327 nm, which corresponds to maximum CGA absorption.

Samples were filtered through 0.45 µm pore size filter before HPLC injection. The compounds (sugars, ethanol, CGA) were identified by comparison of their retention times with the retention times of certified standards. The quantification of compounds was performed using calibration curves with 5 different concentrations of standard solutions ($R^2 > 0.99$).

3. Results and Discussion

3.1. Coffee pulp

This study explored the fermentation of coffee pulp at three different scales: laboratory, semi-pilot, and pilot. Different batches of coffee pulp with different pretreatment conditions were used during the experiments, which resulted in a variability of the raw material composition. A chemical characterization of coffee pulp was carried out to determine its initial composition in terms of fermentable sugars, ethanol and chlorogenic acid 5-CQA (Table 1).

The chlorogenic acid 5-CQA was reported as being the most abundant simple polyphenol present in fresh coffee pulp (Martínez and Clifford, 2000) and its concentration was followed in all assays of this work. For laboratory scale experiments, eight samples of coffee pulp from the 2015 batch were used. Fermentation at semi-pilot and pilot scales was carried out only once due to limitations in coffee pulp supply. According to results, we observed a difference in coffee pulp composition between samples of the same batch (2015) as well as significant differences between the three batches. Glucose and fructose contents varied by less than 10 % within the laboratory scale samples whereas changed by 41% (glucose) and 36% (fructose) between batches at different scales. Traces of ethanol were found in coffee pulp in concentrations inferior to 1 g L⁻¹, probably due to a natural (but very limited) fermentation of coffee pulp during storage.

The biggest difference was found in terms of the amount of 5-CQA. We observed that the highest concentration of 5-CQA, 198 mg L⁻¹, was found in the 2018 batch that was only stored for one night prior to the experiment. Much lower concentrations were found in the coffee pulp batches of 2015 that were milled, frozen and stored for several months. An intermediate value was obtained for the batch of 2017 that was stored for a shorter period than the 2015 batch. This can be explained by the high sensitivity of phenolic compounds, such as chlorogenic acid 5-

CQA, to isomerization and/or oxidation by external factors (temperature, light, oxygen) (Narita and Inouye, 2013; Xie *et al.*, 2011) that can occur during the pretreatment and storage steps, leading to CGA degradation.

Table 1. Characterization of raw coffee pulp from different batches in terms of origin, pretreatment steps, local and year of assays, pH, moisture, sugar, ethanol and 5-CQA content.

Laboratory scale					
Harvest year	2015	Supplier	Coopéunion	Pretreatment steps	Freezing, grinding and freezing
Year of assay(s)	2016-2017	Local of assay(s)	France		
		Moisture [%]	85 ± 0.6		
		pH	4.4		
		Glucose [g L ⁻¹]	Fructose [g L ⁻¹]	Ethanol [g L ⁻¹]	5-CQA [mg L ⁻¹]
Upper value	35.16	48.35		0.85	12.7
Lower value	28.93	37.13		0.36	4.3
Average(σ) _n	31.73(1.84) ₈	42.97(4.17) ₈		0.65(0.15) ₈	7.93(3.22) ₈
Semi-pilot scale					
Harvest year	2017	Supplier	Coopéunion	Pretreatment steps	Freezing, grinding and freezing
Year of assay(s)	2018	Local of assay(s)	France		
		Moisture [%]	85 ± 0.8		
		pH	4.3		
		Glucose [g L ⁻¹]	Fructose [g L ⁻¹]	Ethanol [g L ⁻¹]	5-CQA [mg L ⁻¹]
	14.39	21.42		0.6	54.91
Pilot scale					
Harvest year	2018	Supplier	Beneficio San Diego	Pretreatment steps	Grinding
Year of assay(s)	2018	Local of assay(s)	Costa Rica		
		Moisture [%]	85 ± 0.8		
		pH	4.3		
		Glucose [g L ⁻¹]	Fructose [g L ⁻¹]	Ethanol [g L ⁻¹]	5-CQA [mg L ⁻¹]
	19.47	28.44		0.65	198.66

This finding illustrates the importance of studying the initial coffee pulp composition. Even though the same biomass is used as a substrate for fermentation, quality of the raw material may lead to different ethanol production and chlorogenic acid extraction during fermentation, and this can be a challenge for industrial scale productions.

3.2. Study of the fermentation process at laboratory-scale

3.2.1. Selection of yeast strains and kinetics of CGA extraction

A preliminary study was carried out to select a *Saccharomyces cerevisiae* strain for coffee pulp fermentation with the view to enhance chlorogenic acid extraction. Two strains were tested, Yeast A and Yeast B, which differed in terms of sulfite production during fermentation (Yeast A presenting lower SO₂ production). Table 2 presents the relative concentration (ratio between the final and initial concentrations of a compound) for the glucose, fructose, ethanol and 5-CQA after 24 h of fermentation.

Table 2. Relative concentration C/C_0 (ratio between the final and initial concentrations) of glucose, fructose and ethanol after 24 h of fermentation and final concentration of 5-CQA obtained at laboratory scale for both yeast strains tested (Yeast A and Yeast B) and for a control of coffee pulp non-inoculated.

	Relative concentration (C/C_0) after 24 h			Final concentration of 5-CQA after 24 h [mg L ⁻¹]
	Glucose	Fructose	Ethanol	
Control	1.00	1.00	0.98	8
Yeast A	0.01	0.11	42.80	30
Yeast B	0.01	0.11	42.60	4

Results from the control (non-inoculated coffee pulp) show that no alcoholic fermentation occurred within the 24 h period and that the final coffee pulp extract contained 8.0 mg L⁻¹ of 5-CQA. Stability of the raw coffee pulp even with its endogenous flora is probably correlated with its high phenolic content that inhibits microorganism growth. Both yeasts were able to ferment coffee pulp and lead to very similar performances in terms of sugar consumption and ethanol production. Nevertheless, only one strain was capable of increasing the concentration of 5-CQA in the extract from coffee pulp. While the fermentation using Yeast A increased by almost 4 times the concentration of 5-CQA compared to the control, results with Yeast B showed the degradation of this molecule during the fermentation process. This result is probably correlated to a difference in the production of pectinases, β -glucanases and other hydrolytic enzymes that are able to facilitate the release of the 5-CQA out of plant cells (Alimardani-Theuil *et al.*, 2011; Pinelo *et al.*, 2006). This shows that only specific strains can be used for

the extraction of chlorogenic acids from coffee pulp. The Yeast A was then selected for all the experiments presented in this work.

To better understand the fermentation and extraction processes, a kinetic study was carried out with coffee pulp inoculated with Yeast A and the results were compared to a control experiment (non-inoculated coffee pulp). Figure 1 presents the evolution of glucose, fructose and ethanol concentrations during the solid-state fermentation for both samples.

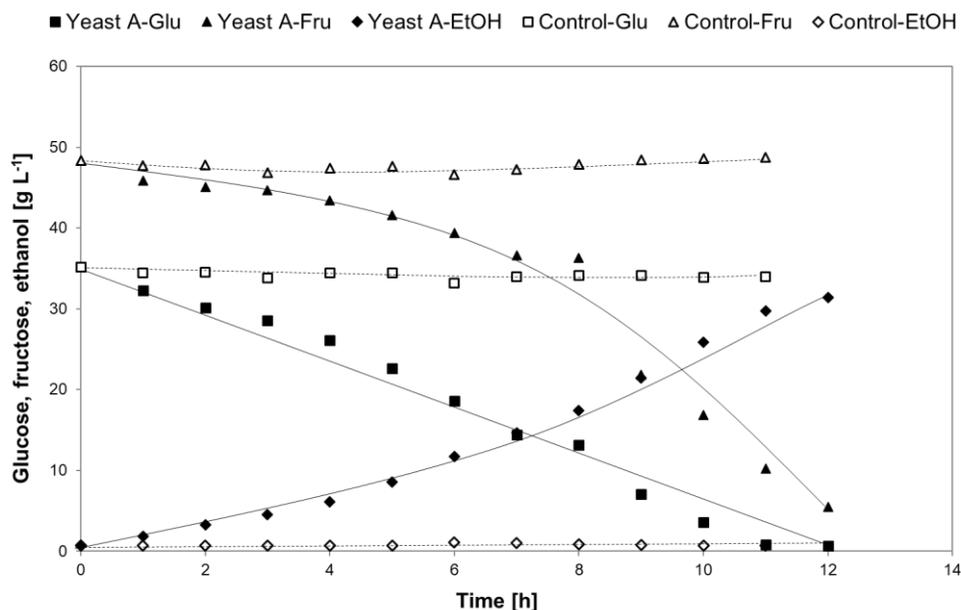


Fig. 1. Substrate consumption (glucose, fructose) and ethanol production during solid-state fermentation of coffee pulp carried out at lab scale with Yeast A, compared to a control non-inoculated.

Results showed that glucose was the preferred carbon source, followed by fructose as usual. Both sugars were almost completely consumed after 12 h of fermentation. The production of ethanol was correlated to the consumption of sugars, increasing during fermentation and levelling off to a final concentration of 31.4 g L⁻¹ (around 4% vol.) at t = 12 h, when sugar stocks reached a very low level (glucose < 1 g L⁻¹; fructose < 6 g L⁻¹). No fermentation occurred in the control.

Figure 2 presents the evolution of chlorogenic acids (CGA) extraction in the inoculated coffee pulp compared to the control. The CGA identified were: 5-CQA, 4-CQA, 4-FQA, 5-FQA, and 4.5-diCQA. The evolution of the total amount of these five chlorogenic acids is also presented (total CGA).

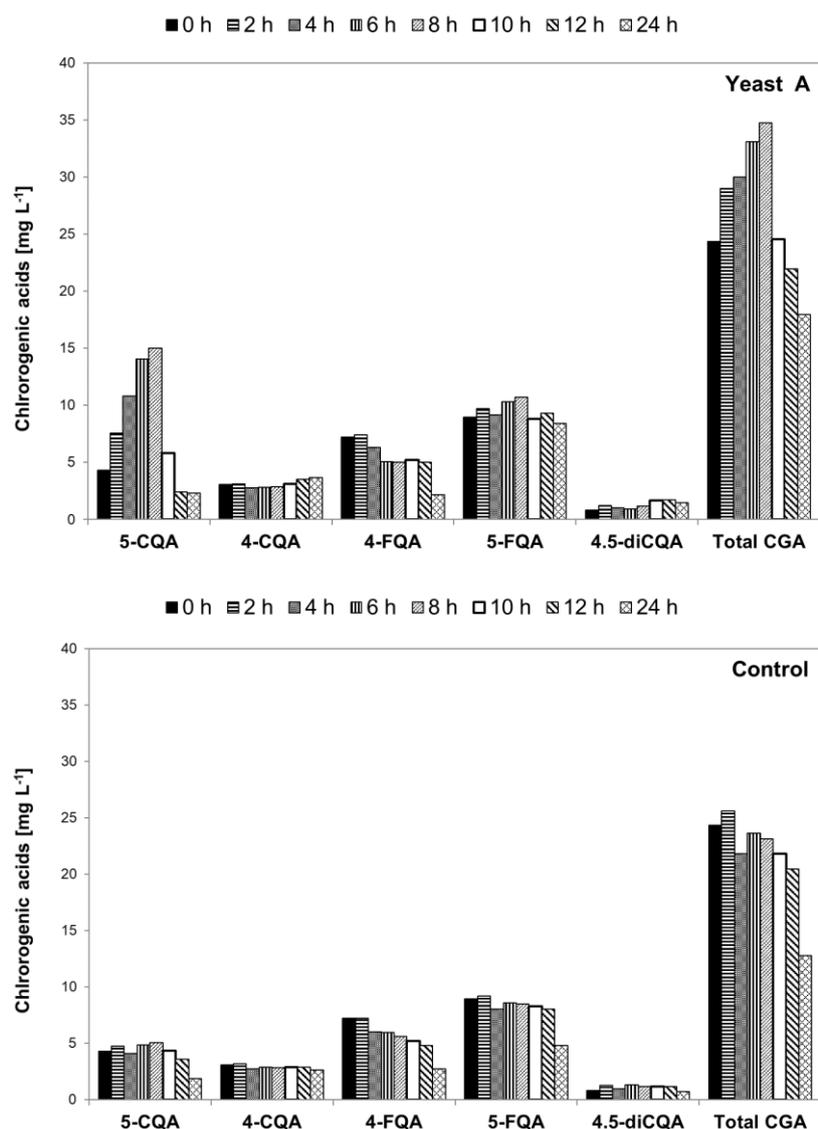


Fig. 2. Extraction of chlorogenic acids from coffee pulp during fermentation at lab scale with yeast A compared to control non-inoculated.

During fermentation, different behaviors were observed. Surprisingly for 5-CQA the concentration increased over time reaching a maximum at 8 h and then decreased drastically. It was already reported that the hydroxycinnamic acids are mostly present in the coffee pulp under linked-form with cell walls whereas the soluble compounds could be mainly located inside the plant vacuoles (Rodríguez-Durán *et al.*, 2014). The enzymatic pool of the yeast which is responsible for the cell wall weakening could favor the wall-bonded 5-CQA release as well as the increasing ethanol concentration could favor the solubility of this compound and its extraction. Losses of 5-CQA become predominant after 8 h of fermentation through oxidation reactions by chemical, enzymatic and even fermentation pathways or through adsorption by the yeasts itselfs (Mazauric and Salmon, 2005). Furthermore, with lower sugar stocks in the

media, chlorogenic acids could become the carbon source in its turn. Figure 3 summarizes the possible pathways of extraction and degradation of CGA during coffee pulp fermentation.

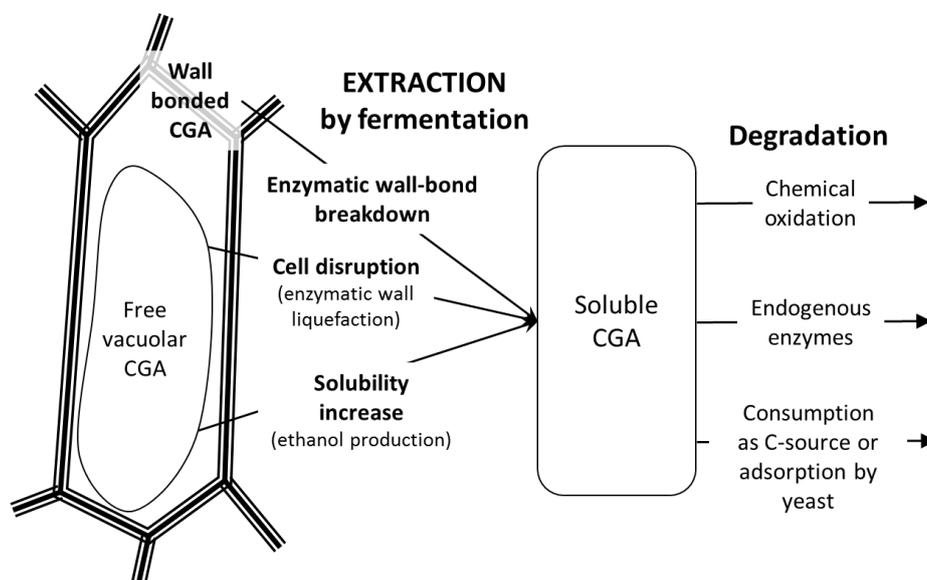


Fig. 3. Suggested competing pathways of the extraction and degradation of chlorogenic acids (CGA) during fermentation of coffee pulp.

Finally, chlorogenic acids may also undergo various isomerization reactions (Liang and Kitts, 2015; Moon *et al.*, 2009) and could explain the surprising stability observed in Figure 2 for 4-CQA, 5-FQA and 4.5-diCQA, compared to 5-CQA and 4-CQA, during fermentation (as an example, 5-CQA could be partially converted into 4-CQA and 5-FQA into 4-FQA).

To conclude this part of the study, these results showed that it was possible to significantly extract the 5-CQA using solid-state fermentation. In fact, alcoholic fermentation with Yeast A allowed an increase of 3.5 times of 5-CQA initial concentration, from 4.3 mg L⁻¹ to 15 mg L⁻¹, at only 8 h of fermentation. However, in order to preserve the 5-CQA extracted during the fermentation process, it is important to develop a stabilization method for chlorogenic acids.

3.2.2. Stabilization of chlorogenic acids

A study was carried out to compare different strategies for the stabilization of chlorogenic acids in the coffee pulp. Initially, two concentrations of sulfite were chosen to stabilize coffee pulp prior to inoculation: 30 and 500 mg kg⁻¹. It was found that when adding this agent at the beginning of the fermentation, there were either complete yeast inactivation resulting in no chlorogenic acid extraction (500 mg kg⁻¹ of SO₂) or coffee pulp fermentation but no chlorogenic

acid stabilization (30 mg kg^{-1} of SO_2). So, under those tested conditions, the stabilization step applied to the coffee pulp before the fermentation process was not suitable. A complementary study was then performed comparing 3 different stabilizing agents (sulfite 0.5 wt%, ascorbic acid 1 wt%, and acetic acid 1 wt% and 10 wt%) added into the culture medium at the optimal time of 5-CQA extraction, i.e. at 8 h of fermentation (as previously shown in Figure 2). This new strategy aimed to stabilize the 5-CQA at its highest concentration in the extract and to study the effect of the addition of stabilizing agent on the yeast activity.

Figure 4 presents the evolution of glucose and 5-CQA concentrations for the different assays. Since 5 coffee pulp samples from batch 2015 were used during the experiments, the concentrations were expressed in terms of the relative concentration of each compound (C/C_0) due to raw material variability. Indeed, it is worth noting that, irrespective to the fermentation trials, fructose consumption and ethanol production showed the same evolution as previously described that confirmed the good reproducibility of the fermentation of the pulp by yeast. For this reason, the evolution of glucose concentration was used as the fermentation indicator in all the following results.

From Fig.4, the addition of ascorbic acid at 1 wt% or acetic acid at 1 wt% didn't affect yeast activity; the concentration of glucose continued to decrease over time as it was observed in the experiment done without any stabilizing agent. As expected, the addition of sulfite at 0.5 wt% or acetic acid at 10 wt% stopped the fermentation process, which indicates that, at the given concentration, sulfite and acetic acid inhibited yeast activity. Both of these stabilizing agents are known for acting through a strong acidification of intracellular content and, also by an intrinsic toxic activity like in the case of HSO_3^- , by blocking many carbonyl functions that disrupt the cell metabolism (Blouin, 2014).

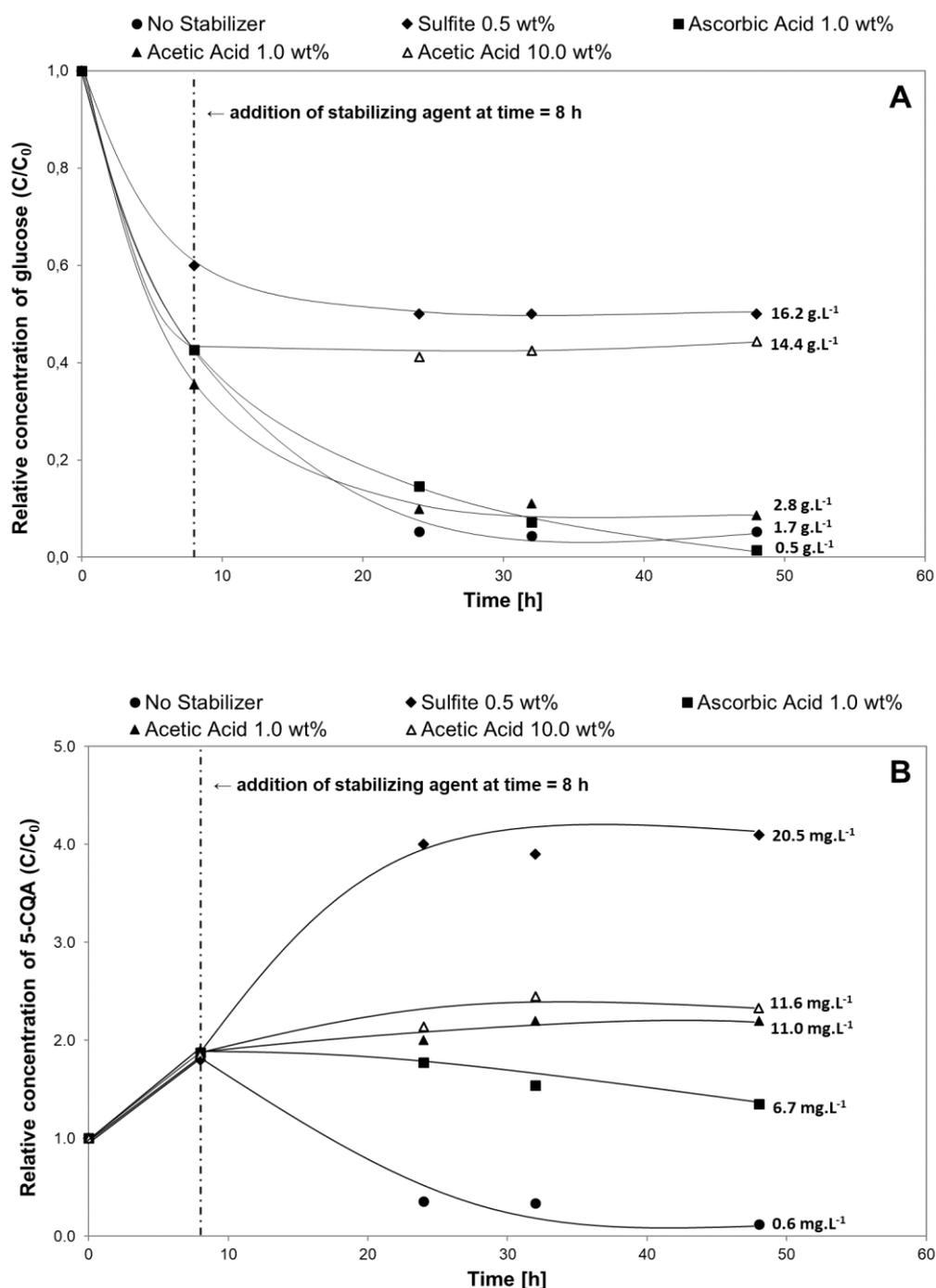


Fig. 4. Effect of different stabilizing agents on the (A) glucose consumption and (B) 5-CQA extraction during solid-state fermentation at lab scale with yeast A (glucose: $C_0 = 32.5 \pm 1.5$ g L⁻¹; 5-CQA: $C_0 = 5 \pm 2$ mg L⁻¹).

Concerning the extraction of 5-CQA, the addition of ascorbic acid tended to stabilize the 5-CQA until 24 h of fermentation. Afterward, due to a gradually oxidation of ascorbic acid, the 5-CQA started to degrade faster. The acetic acid, in both concentrations tested, was successful to stabilize the 5-CQA. Surprisingly, the addition of sulfite not only stabilized the 5-CQA, but

also increased its concentration over time, reaching a maximum at 24 h of fermentation and representing an enhancement of 400% of 5-CQA concentration compared to its initial concentration. This can be explained first by the fact that 5-CQA can undergo reversible electrochemical reactions (Tomac and Šeruga, 2016), that is to say, oxidized forms of 5-CQA can be reversibly reduced by the redox action of sulfite, unlike the other stabilizing agents tested in the study. Second, this result could also be due to a faster destruction of the plant cells resulting in higher amounts of 5-CQA being released. This well-known phenomenon in winemaking is often called the “dissolvent activity” of sulfites (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006).

Combining the results in terms of glucose consumption and 5-CQA extraction, two stabilizing agents could be used for the fermentation of coffee pulp: acetic acid at 1 wt% that allows yeast growth while stabilizing the 5-CQA gradually extracted, and the sulfite at 0.5 wt% that stops fermentation, stabilizes and enhances 5-CQA extraction. For acetic acid, the advantage is a complete consumption of sugars during the fermentation. So, the low sugar content of the final extract should considerably simplify the further purification steps during downstream processing. The use of sulfite will provide an extract richer in chlorogenic acids but less pure (with more sugars), and the use of acetic acid at 1wt% will provide a purer extract, but with lower antioxidant capacity. Therefore, a compromise must be found when choosing a stabilizing agent for this process.

3.2.3. Study of the process optimization using ultrasound-assisted extraction

Two strategies were chosen to combine ultrasound-assisted extraction to the fermentation process: prior to fermentation (i.e. before addition of yeasts) or after 8 h of fermentation when the highest concentration of 5-CQA was achieved (according to results in Section 3.2.2). Even if ultrasounds can disrupt also the yeast cells causing yeast death and thus stop the fermentation as it was recently reported (Chemat *et al.*, 2017), the fermentation during the first hours could potentiate ultrasound effects and thus favor CGAs' extraction. Since the main purpose of our process was to enhance the amount of CGA in the coffee pulp extract, the use of ultrasounds during the fermentation was an interesting strategy to explore. Figure 5 presents the results for glucose consumption and 5-CQA extraction during the fermentation process. In that case, coffee pulp was stabilized using acetic acid at 1 wt% in order to preserve the 5-CQA while allowing the fermentation process to continue.

Results showed that glucose consumption was similar for both systems. Surprisingly, the glucose was not completely consumed even after 48 h of fermentation, compared to previous results that showed the glucose being mainly consumed at 24 h of fermentation (Figure 4). A moderate 5-CQA extraction optimization could be obtained with ultrasound-assisted extraction, as the content of 5-CQA at 8 h of fermentation was only increased by around 280% (US at 8 h) or 220% (US prior to fermentation) compared to 200% (fermentation without ultrasounds). Moreover, 5-CQA became unstable after 24 h of fermentation, which could be explained by the possible release of endogenous oxidative enzymes due to the ultrasound treatment.

Another proposed explanation for the 5-CQA instability relies on the fact that the ultrasound treatment could release other compounds that could interact with the 5-CQA throughout chemical reactions causing its degradation. Additionally, ultrasound treatment could enhance the extraction of many phenolic compounds from the coffee pulp that in turn could create an inhibitory environment for yeast growth, leading to the decrease of fermentation activity. Under the experimental conditions applied in this work, the coupling of ultrasounds prior or during the fermentation process is not an interesting method to improve the extraction yields of 5-CQA from coffee pulp. It didn't improve the 5-CQA extraction yield as expected, and even slowed down the fermentation process. Therefore, no ultrasound treatment was applied on further studies.

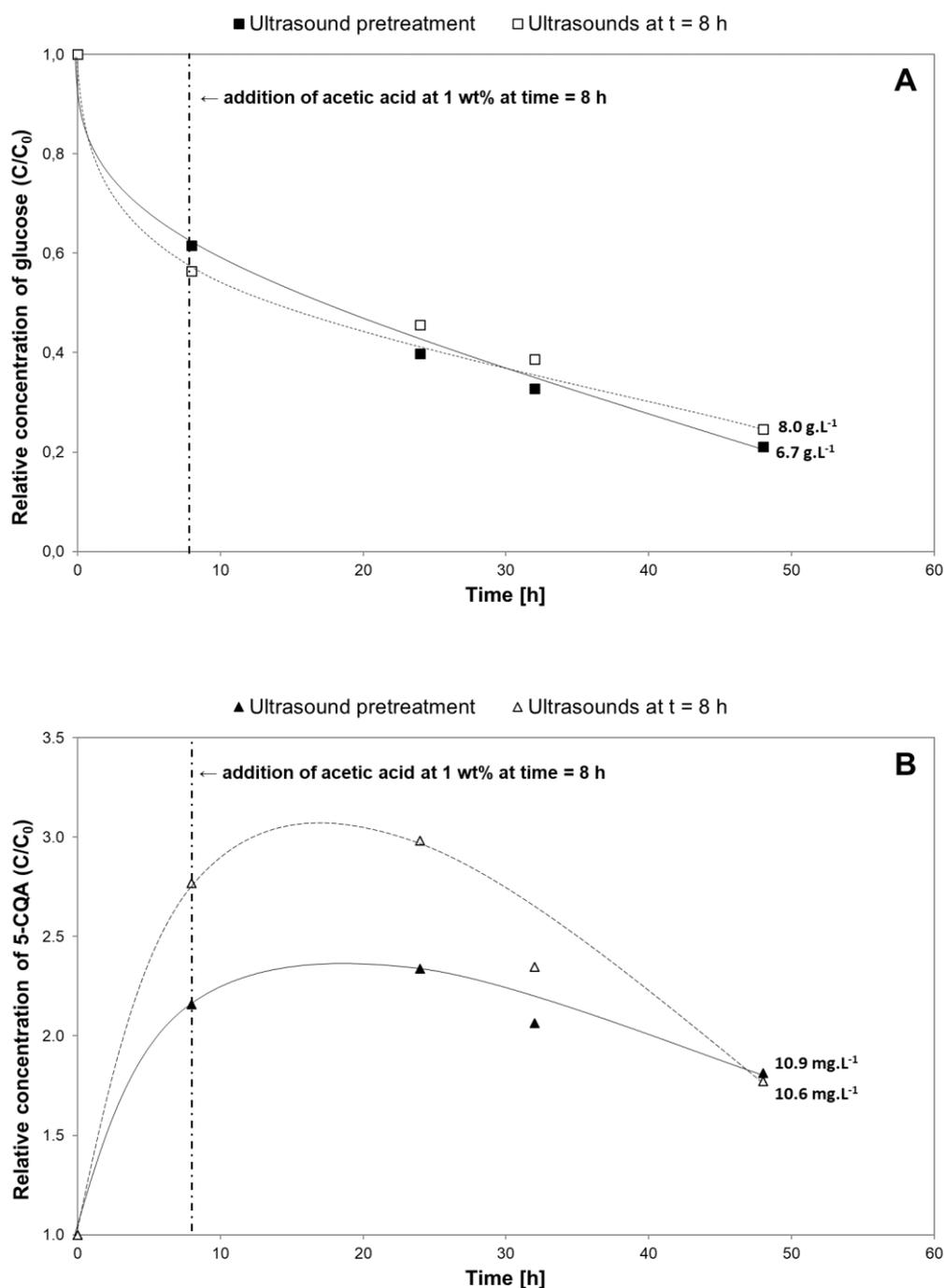


Fig. 5. Effect of ultrasounds on glucose consumption (A) and 5-CQA extraction (B) during fermentation at laboratory-scale. (Glucose: $C_0 = 31.9 \pm 1.8 \text{ g L}^{-1}$; 5-CQA: ($C_0 = 6 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$).

3.3. Application of the fermentation process at larger scales

To evaluate the validity of the results obtained at laboratory scale, fermentation at semi-pilot scale was carried out and monitored during 24 h. Sulfite at 0.5 wt% was chosen as the best stabilizing agent for the coffee pulp stabilization after a first step of fermentation. As mentioned in Section 3.1, a different batch of coffee pulp was used for this assay (batch of 2017), which

resulted in differences on the initial concentrations of sugars and chlorogenic acids compared to the coffee pulp used for laboratory scale experiments (batch of 2015). The batch of 2017, used for this study, contained lower concentrations of sugars and a higher initial amount of 5-CQA, as presented in the Table 1 and discussed in Section 3.1. Figure 6 presents the results for the glucose consumption and 5-CQA extraction during the fermentation process.

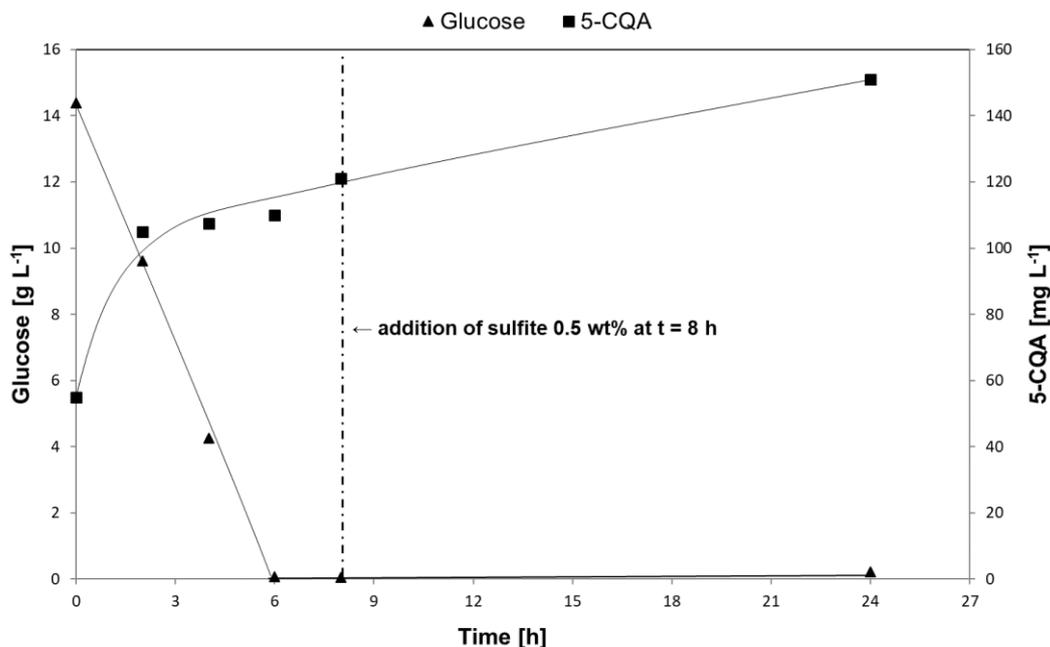


Fig. 6. Glucose consumption and 5-CQA extraction during fermentation at semi-pilot scale.

The glucose was completely consumed after only 6 h of fermentation, which can be explained by the lower initial amount of sugars in the coffee pulp from batch 2017 (14.39 g L^{-1} of glucose and 21.42 g L^{-1} of fructose) compared to the coffee pulp from batch 2015 (31.73 g L^{-1} of glucose and 42.97 g L^{-1} of fructose). With most of the fermentable sugars being consumed before 8 h of fermentation, the addition of sulfite at $t = 8 \text{ h}$ did not disturb the yeast activity since the fermentation was already completed at this time.

The concentration of 5-CQA increased over time as previously observed at laboratory scale, even after the addition of the sulfite (as explained in Section 3.3), up to a final concentration of 151 mg L^{-1} of 5-CQA at $t = 24 \text{ h}$, 275% higher than the initial concentration (55 mg L^{-1} of 5-CQA). When the fermentation was carried out at laboratory scale, using sulfite at 0.5 wt% at $t = 8 \text{ h}$ as the stabilizing agent, the content of 5-CQA in the coffee pulp extract was increased by 400% at $t = 24 \text{ h}$, against 275% at semi-pilot scale. Nevertheless, it was shown that the fermentation of coffee pulp and the extraction of chlorogenic acids were successful at semi-

pilot scale, despite of the differences in coffee pulp composition (Table 1) and of the limitations encountered (reduced mass and heat transfers during the process scale-up).

Finally, to evaluate the process in a coffee producing country, fermentation was carried out at pilot-scale in Costa Rica with 90 kg of fresh coffee pulp nearby the green coffee production area. In order to compare the results from the semi-pilot fermentation, sulfite at a concentration of 0.5 wt% was used to stabilize the chlorogenic acids extracted during the fermentation. Table 3 summarizes the results for the fermentation performed at different scales. As mentioned in Section 3.1, the coffee pulp composition varied due to the year of harvest and the storage time, so the relative concentration (C/C_0) of each compound (glucose, fructose, ethanol and CGA) was chosen instead of direct concentrations (C) values.

Table 3. Overview of the year of coffee pulp batches, the average temperature during the fermentation process (T) and the relative concentration (ratio between the final C and initial C_0 concentrations) of glucose, fructose, ethanol and 5-CQA after 24 h of fermentation at laboratory, semi-pilot and pilot scales.

Scale	Batch	T [°C]	Relative concentration (C/C_0) after 24 h			
			Glucose	Fructose	Ethanol	5-CQA
Laboratory	2015	28	0.50	0.72	11.67	4.00
Semi-pilot	2017	26	0.02	0.10	24.00	2.75
Pilot	2018	22	0.14	0.22	22.86	3.09

For all three scales, sulfite at 0.5 wt% was used to stabilize the 5-CQA extracted, added at 8 h of fermentation. At laboratory scale, the fermentation was immediately stopped when sulfite was mixed to coffee pulp (Figure 4), which explains the higher relative concentrations of glucose and fructose in the product after 24 h. This was not the case for the 2017 and 2018 batches, which had lower initial concentrations of sugars, allowing the almost complete consumption of glucose and fructose prior to the addition of sulfite. In that cases, ethanol production yields reached a quite high level between 0.37 and 0.41 g ethanol / g sugar which corresponds to 72 and 80% of the maximal theoretical conversion yield (0.51 g ethanol / g sugar). Nevertheless, the extraction of 5-CQA was very similar for all three scales, with an augmentation of around 300% of its initial concentration in less than 1 day of fermentation.

Although the operating temperature was set at 28 °C, the average temperature of coffee pulp varied with the scale of the process. Obviously the bigger the amount of pulp used as substrate, the harder the temperature control of the coffee pulp. Since no stirring was applied during the fermentation, heat transfer became an important problem for the process. However, even at lower temperatures, solid-state fermentation using a commercial yeast (Yeast A) was able to ferment coffee pulp and to produce a rich phenol-extract containing more than 600 mg of 5-CQA per kg of coffee pulp and purer in terms of the lower concentration of sugars (5 g L⁻¹ of glucose and 12 g L⁻¹ of fructose). We showed that the fermentation of coffee pulp at a pre-industrial (pilot) scale with very simple equipment can be used to obtain a valuable product. It was important to develop a process that could be easily implemented in the coffee producing countries, without big financial investment and operating costs, lower environmental impact and that could generate a new source of income for the small coffee producers.

4. Conclusions

Solid-state fermentation was used to produce a valuable product from coffee pulp at laboratory, semi-pilot and pilot scales. *Saccharomyces cerevisiae* consumed the sugars releasing chlorogenic acids that are found linked to the plant cell wall probably as glycosides. Investigation of the extract stability and the effect of ultrasounds revealed that higher extraction yields were obtained when fermentation was carried out without ultrasound treatment and by using sulfite at 0.5 wt% as the stabilizing agent. Irrespective of the scales, a phenol-rich extract was obtained containing 300-400% more chlorogenic acids than its initial concentration, within less than 24 h of fermentation. After fermentation and solid/liquid separation steps, the quantity of the remaining solid residue was considerably reduced. This final by-product will contain much less caffeine and phenolics (compounds considered as anti-nutritional and eco-toxic), which could facilitate its reuse as animal feeding, fertilizer or composting substrate. For further studies, it could be of great interest to test other yeast strains and to optimize fermentation conditions for even increasing the extraction yield. In order to find the best stabilizing method, in terms of (1) CGA preservation, (2) effect on the fermentation activity and (3) cost and environmental impact, new stabilizing agents must be tested at larger scales. To obtain a ready-to-market product, the concentration and the purification of the extract need to be performed and investigated using sustainable technologies. Finally, the characterization of the final product will have to be carried out, e.g., in terms of antioxidant activity, to better determine its market added value and to enlighten about the economic feasibility of the process.

3^{ème} partie : étude de la microfiltration et l'ultrafiltration de l'extrait de la pulpe

Comme nous l'avons souligné dans la synthèse bibliographique (chapitre 1), les procédés baromembranaires peuvent être utilisés pour la récupération des composés à haute valeur ajoutée à partir de produits et co-produits alimentaires. L'application des procédés de microfiltration tangentielle (MF) et d'ultrafiltration (UF) pour le traitement de l'extrait de pulpe va être évaluée au cours de ce travail (Publication n° 3).

Quatre membranes tubulaires céramiques de MF avec différents diamètres des pores (1,4 μm et 0,2 μm) ont été testées pour la clarification de l'extrait brut de pulpe fermentée. Les essais ont été réalisés sur pilote de laboratoire (3 L) à un facteur de réduction volumique (FRV) constant et égal à 1. Ces essais ont permis de choisir les conditions optimales de traitement (couple membrane/pression) en considérant à la fois les densités de flux de filtration (performances), la rétention des composés d'intérêt (à minimiser) et celle des autres constituants qui sont considérés comme des impuretés (à maximiser). Les résultats ont montré que les membranes de diamètre de pores de 0,2 μm , TAMI (T0,2) et Membralox (M0,2), permettent non seulement de clarifier l'extrait brut en éliminant les solides en suspension, mais également de retenir des pigments bruns qui peuvent être considérés comme des impuretés. Ces deux membranes ont présenté les meilleures performances de filtration, avec une densité de flux de perméat de 216 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ avec T0,2 et 138 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ avec M0,2. Par conséquent, ces deux membranes ont été sélectionnées pour l'essai en mode concentration (FRV croissant) sur le pilote semi-industriel au Costa Rica. Les résultats obtenus confirment l'intérêt de la MF pour éliminer totalement la fraction insoluble contenue dans l'extrait mais aussi pour diminuer la concentration en certains composés solubles indésirables, notamment les composés colorés. Dans les conditions opératoires définies comme optimales, les performances et la sélectivité de la séparation sont prometteuses et a priori compatibles avec une utilisation industrielle.

Pour les essais d'UF, quatre membranes planes céramiques ont été testées (50, 15, 5 et 1 kDa) sur deux extraits de pulpe : un extrait brut et un extrait clarifié par MF. La membrane de 50 kDa a été utilisée pour la clarification de l'extrait brut afin de déterminer l'intérêt de l'étape de MF dans le procédé de fractionnement de l'extrait. Lors de cet essai, la membrane s'est colmatée très rapidement à cause de la présence de particules en suspension dans l'extrait. Ces dernières se sont accumulées à la surface et/ou dans la membrane, conduisant à une médiocre filtrabilité de l'extrait (presque nulle pour un FRV supérieur à 1,5). Ce résultat montre l'importance de

l'étape MF avant l'UF pour éviter le colmatage rapide de la membrane et pour obtenir des rendements de récupération de perméat plus élevés nécessaires à une application industrielle du procédé.

Les quatre membranes d'UF ont été testées sur l'extrait clarifié par MF afin d'évaluer la séparation des solutés de l'extrait. Les résultats ont montré que, pour les seuils de coupure les plus élevés, les performances de filtration sont satisfaisantes. Toutefois, à partir des indicateurs biochimiques et physicochimiques utilisés, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence la purification des composés d'intérêt (AH). Pour les seuils de coupure plus faibles, l'ultrafiltration permet de réduire considérablement la couleur de l'extrait mais les faibles flux de perméat obtenus remettent en cause l'intérêt économique de l'opération. Au final, l'intérêt d'introduire une étape d'ultrafiltration dans la cascade de séparation n'est donc pas démontré.

Publication n° 3

Da Silvera J. S., Dornier M., Lacour S., Perez A., Belleville M-P. Evaluation of microfiltration and ultrafiltration technologies for the preliminary step of chlorogenic acid recovery from coffee pulp juice. Soumission prévue à *Journal of Food Engineering* en mars 2020.

Abstract

Microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) technologies were tested as the first step of the recovery process of chlorogenic acids (CGA) from coffee pulp juice obtained from fermented pulp. The different membranes investigated were compared in terms of their filterability performance and retention rates of the analyzed compounds. The MF step allowed the elimination of insoluble solids and other impurities (brown pigments) from the pulp juice while maintaining the initial solutes profile. The average permeation flux was relatively high during MF in laboratory and pilot scales ($>100 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ for the selected membrane), and the permeate recovery yield was above 93%. Results also showed the importance of the MF step prior to UF to avoid fast membrane fouling and poor filterability performance. The tested UF membranes presented low retention of total dry matter (TDM) and no significant gain in purity of CGA (relative to TDM content). This apparent lack of purity gain was due to the low initial TDM content of the pulp juice. The filtration of the clarified juice by a 50 kDa membrane followed by a 5 kDa membrane allowed to obtain a satisfactory volume reduction ration of 4.7, and a high retention of colored pigments ($> 50\%$) while transferring almost 90% of CGA in the permeate. Further studies are still needed to determine the interest of the UF step to treat the pulp juice at an industrial scale.

Keywords: coffee by-product treatment ; microfiltration ; ultrafiltration ; chlorogenic acids recovery;

1. Introduction

Coffee pulp is the main agroindustrial waste obtained during the wet and semi-dry processing of the coffee cherries to obtain coffee beans. It consists essentially of carbohydrates, proteins and minerals (especially potassium), and it also contains appreciable amounts of polyphenols and caffeine (Murthy and Madhava Naidu, 2012). According to the data available, the average annual production of coffee beans is around 10 million tons worldwide, and as a result, a huge amount of pulp is generated as by-product (“ICO”, 2019). This bio-waste has a negative impact on the ecosystem as it causes environmental pollution especially in rivers and groundwater areas, where coffee pulp is drained. High amounts of the coffee organic matter in freshwater lead to an increase in Chemical and Biological Oxygen Demands with negative effects on ecosystem stability (Magoni *et al.*, 2018). Due to the content of caffeine and polyphenols, coffee pulp reuse is limited, especially in agriculture, leading to serious food waste management problems in the coffee-producing countries (Heeger *et al.*, 2016).

Traditionally, coffee pulp has been used to produce bioethanol, biogas, compost, substrate for mushrooms and animal feed (Ameca *et al.*, 2018). More recently, biotechnological processes such as solid-state fermentation are being used for the production of enzymes, organic acids and aroma compounds (Pleissner *et al.*, 2016). These functional molecules are considered high value-added products, justifying their isolation from the food wastes for industrial applications (Murthy and Madhava Naidu, 2010). We have previously reported that alcoholic fermentation can be used to extract chlorogenic acids from coffee pulp, producing a natural extract with bioactive properties that could find applications in the pharmaco-cosmetic, food and medical industries (Da Silveira *et al.*, 2019). Chlorogenic acids (CGA), the major class of phenolic compounds in coffee pulp (Rodríguez-Durán *et al.*, 2014), are esters formed between quinic acid and one or more trans-hydroxycinnamic acid derivatives, most commonly caffeic, p-coumaric, and ferulic acids. These compounds are known for their pro-health properties including anti-cancer and anti-aging activities, which contributes to the growing interest in products rich in CGA (Wianowska and Gil, 2018; Upadhyay and Mohan Rao, 2013).

The separation and purification of phenolic compounds from their original sources is a complicated procedure since these molecules are generally present in very complex matrices at low concentration that either cause application challenges, unacceptable separation efficiencies or excessive cost barriers (Cassano *et al.*, 2017). Additionally, these compounds present low stability, resulting to their degradation under high temperatures and extended time exposure to

extraction solvents (Castro-Muñoz and Fíla, 2018). Pressure-driven membrane processes, such as microfiltration (MF), ultrafiltration (UF) and nanofiltration (NF), have emerged as promising candidates to carry out both separation and purification of phenolic compounds (Castro-Muñoz *et al.*, 2016). These membrane processes provide several advantages over traditional separation technologies: low temperature requirements, high separation efficiency, simple operation, easy scale-up, high productivity in terms of permeate fluxes, the absence of phase transition, and non-use of additional solvents. For this reason, membrane processes have been applied to the recovery of food products, ranging from macroscopic pre-treatment (MF) to the use of isolation and purification techniques (UF, NF) (Galanakis, 2013).

Integrated membrane processes for separating high-added value compounds have been widely used for the fractionation of agro-food by-products (Castro-Muñoz and Yáñez-Fernández, 2015). Typically, this recovery strategy involves coupling MF, UF and NF membranes in sequence. The MF step is used to remove suspended solids that can produce operational issues (early fouling) in the subsequent steps. The application of UF technology supports the removal of the macromolecules in the retentate stream while conserving the low molecular weight compounds (such as phenolic acids) in the permeate stream. Finally, the NF step improves the recovery process by concentrating the solutes in the retentate (Castro-Muñoz and Fíla, 2018).

The application of membrane processes for the recovery of phenolic compounds from coffee pulp juice has not yet been reported. In this study we evaluate the performance of MF and UF membranes for the separation and purification of CGAs from fermented pulp juice. The aims of this present study are to i) determine the feasibility of using MF and UF to clarify and fractionate coffee pulp juice in order to obtain a product rich in CGAs, and ii) evaluate various ceramic membranes in terms of permeate flux and retention rates.

2. Material and Methods

2.1. Coffee pulp juice preparation

Pulp juice was produced from coffee pulp (*Coffea arabica* L.) prepared by alcoholic fermentation and separated by pressing as it was previously reported (Da Silveira *et al.*, 2019). Two different batches of pulp juice were used the filtration assays. First, for the microfiltration (MF) tests at laboratory scale, the pulp juice was prepared in France from coffee pulp supplied by the Beneficio Coopeunión, a coffee-producer cooperative located in Trés Rios (Costa Rica),

during the 2017 harvest, and shipped frozen to France by aircraft in a controlled temperature system. Then, for the MF at pilot scale and UF tests, pulp juice was prepared in Costa Rica from coffee pulp supplied by the cooperative Beneficio San Diego (San José, Costa Rica), during the 2018 harvest. The pulp juices produced at pilot scale in Costa Rica were concentrated by evaporation under vacuum at 50-60°C to 1/3 of its initial volume, split into 5 L-bags, and shipped frozen to France by aircraft in a controlled temperature system. Upon arrival, they were kept at -20 °C and under darkness until use.

2.2. Chemicals

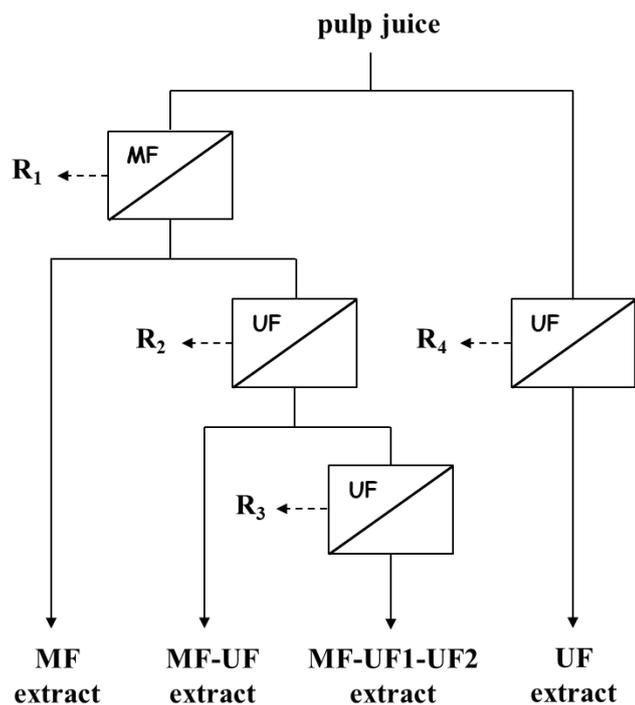
Methanol, sulfuric acid, and phosphoric acid were all of analytical grade from Honeywell (Seelze, Germany). Standards of chlorogenic acids (CGA) was purchased from International Development and Manufacturing (New Jersey, USA), which contained a mixture of: 3-caffeoylquinic acid, 5-caffeoylquinic acid, 4-caffeoylquinic acid, 4-feruloylquinic acid, 5-feruloylquinic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, and 4,5-dicaffeoylquinic acid. Standards of 5-caffeoylquinic acid alone (5-CQA), glucose, fructose and ethanol were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

2.3. Membranes characteristics and separation scheme

Table 1 lists the characteristics of the membranes used for the MF and UF assays. Different combinations of membranes were tested to determine the best process to treat the pulp juice. Figure 1 shows the separation strategy adopted for this study and the different pulp extracts obtained. MF was tested for the clarification of the pulp juice in order to eliminate insoluble particles and the colloidal fraction. The coupling UF membranes after the clarification step was tested for the removal of soluble macromolecules (polysaccharides, proteins, pectins, etc.) from the juice, which could contribute to the purification of the target molecules (CGA) in terms of the total dry matter. A step of fine UF was also used after MF and UF to attempt the further purification of CGA in the permeate. UF was tested alone, i.e. without previous MF step, to potentially achieve both clarification and purification of the pulp juice in one step only, avoiding extra costs related to the additional MF step. Finally, different retentates were generated as by-product for each process tested.

Table 1. Characteristics of the tested microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) membranes.

Supplier	Active layer material	Commercial name	Code	Geometry	Average pore size (μm)	Molecular weight cut off (kDa)	Tube/channel diameters (mm)	Membrane surface (cm^2)
TAMI Industries	TiO_2	Inside CéRam	T1.4	<i>Tubular Monochannel</i>	1.4	-	7	55
		Inside CéRam	T0.2	<i>Tubular Monochannel</i>	0.2	-	7	55
		Inside CéRam		<i>Tubular Multichannel (8 channels)</i>	0.2	-	6	2000
Pall Corporation	Al_2O_3	Membralox 1T1-70	M1.4	<i>Tubular Monochannel</i>	1.4	-	7	55
		Membralox 1T1-70	M0.2	<i>Tubular Monochannel</i>	0.2	-	7	55
		Membralox 1P19-40		<i>Tubular Multichannel (19 channels)</i>	0.2	-	4	2200
TAMI Industries	TiO_2		T50	<i>Disc</i>	-	50	-	52.7
		Inside DisRam	T15	<i>Disc</i>	-	15	-	52.7
			T5	<i>Disc</i>	-	5	-	52.7
			T1	<i>Disc</i>	-	1	-	52.7


Fig. 1. Overview of the separation strategy adopted for the coupling of microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) with the different permeates (extracts) and retentates (R_i , $i=1, 2, 3, 4$) obtained.

2.4. Microfiltration

The microfiltration unit used at laboratory scale (TIA, Bollène, France) features a feed tank (3 L), 4 tubular membrane cartridges, a feed circulation pump, a tubular heat exchanger, 3 pressure gauges (inlet, outlet and average), 2 valves (counterpressure and drain), and a mercury thermometer. The permeate flow is measured by means of a precision balance, and the time with a chronometer. Tests were carried out in total recycling mode, where the permeate was recombined with the retentate and again fed through the system, maintaining the total volume constant. The temperature was fixed at 30°C and the crossflow velocity (U) was about 6 m s⁻¹. Four combinations of membrane and transmembrane pressure (TMP) were tested using tubular ceramic monochannel membranes: T1.4 and M1.4 at 1.7 bar; and T0.2 and M0.2 at 2.8 bar. The best operating conditions (pair membrane-TMP) were selected on the basis of the highest permeate flux (J_p) and the lowest retention of CGAs, and used in the concentration tests in pilot scale.

The microfiltration unit used (CITA, San José, Costa Rica) at pilot scale was similar to the laboratory unit, but with a 100 L feed tank and a singular tubular multichannel membrane cartridge. Tests were carried out in concentration mode, where the permeate stream was not returned to the feed tank. The temperature was fixed at 30°C and U at 6 m s⁻¹. The juice was fed to the MF unit, and the filtration was carried out until the void volume of the system was achieved (about 4 L). The permeate was continuously recovered and measured using a balance. Two pairs of membrane-TMP, selected during the laboratory trials, were used for the clarification of the raw juice. The best operating conditions (pair membrane-TPM) were selected on the basis of the final volume reduction ratio (VRR), the highest permeate flux and the lowest retention of CGAs.

2.5. Ultrafiltration

The UF trials were carried out at laboratory scale in pseudo-tangential mode using a SPIRLAB filtration cell (TAMI Industries, France) with 90 mm diameter flat-disc ceramic membranes (T50, T15, T5, T1). The disc holder has a central inlet for feeding, a side outlet for retentate recycling and an outlet at the bottom of the cell for permeate recovery. The cell is integrated in a system comprising a feed tank, a gear pump for the circulation of the fluid, a valve and a pressure gauge for controlling the transmembrane pressure. The permeate flux is measured by means of a precision balance connected to a computer. The filtration was carried out during 4

h at constant pressure (2 bar) and crossflow velocity (4 m s^{-1}). All experiments were carried out with the microfiltered (clarified) juice except for one experiment which was carried out with non-clarified pulp juice in order to determine the interest of the MF step. The performance of each membrane coupling was compared on the basis of the permeate flux, the final VRR achieved, and the retention ratios.

2.6. Analytical Methods

The total dry matter was determined in triplicate by gravimetric method (drying at 100°C for 48 h). Soluble solids was measured using a refractometer Atago PAL-3 (Tokyo, Japan). The pH was measured at room temperature using a Schott Titroline apparatus (St. Gallen, Switzerland). Turbidity measurements were performed with a turbidimeter Hanna LP 2000 (Rhode Island, USA). The color was evaluated by the absorbance at 420 and 520 nm using a spectrophotometer SPECORD S600 (Analytic Jena, Germany). The samples were eventually diluted prior to the analysis, and the absorbance for a given wavelength was calculated by using the dilution factor applied in each case.

Glucose, fructose and ethanol were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a Dionex Ultimate 3000 chromatograph (Thermo Scientific) that was equipped with a refractive index detector (RID-10A Shimadzu), a UV detector (210 nm), and an Aminex HPX87H column that was operated at 35°C using 5 mM sulfuric acid as the eluent at a flow rate of 0.6 mL min^{-1} .

The content of 5-CQA, the main chlorogenic acid present in coffee pulp (Da Silveira *et al.*, 2020), was used as an indicator for the chlorogenic acids in the pulp juice, although the content of all the isomers (CGA) were also followed during this study but not presented, as they behave similarly as 5-CQA during all the filtrations performed. The concentration of 5-CQA was determined by HPLC on a system consisting of Shimadzu (Kyoto, Japan) Model LC 20AD pumping units, an automated sample injector (Shimadzu SIL 20 AXR), a variable-wavelength UV detector (Shimadzu SPD20A), column Uptisphere type ODB 5 ($5 \mu\text{m}$ particle size, $250 \times 4.6 \text{ mm}$), with identical pre-column, thermostatically controlled at 30°C . The elution program used 2 solvents, A and B. Solvent A was 4 mM phosphoric acid and solvent B was methanol. The following elution program was used: A–B mixture 95/5 v/v from min 0 to 35, to A–B mixture 25/75 v/v from min 35 to 40, then pure solvent B from min 40 to 50, to A–B mixture 95/5 v/v from min 50 to 55. Flow rate was 1 mL min^{-1} . UV detection was at 330 nm.

Prior to HPLC injection, samples were filtered through 0.45 μm pore size filter. Sugars, ethanol, and 5-CQA, were identified by comparison of their retention times with the retention times of certified standards. The quantification of compounds was performed using calibration curves with 5 different concentrations of standard solutions ($R^2 > 0.99$). The standard deviation was inferior to 10% for all the analyzed compounds.

2.7. Data analysis

The volumetric reduction ratio (VRR) was determined by measuring feed and permeate volumes (V_f , V_p) according to Eq. (1).

$$\text{VRR} = \frac{V_f}{V_f - V_p} \quad (1)$$

The retention rate of compound or characteristic i (R_i) was calculated according to Eq. (2), where C_{pi} and C_{fi} were the concentrations in the permeate and in the feed, respectively.

$$R_i = 1 - \frac{C_{pi}}{C_{fi}} \quad (2)$$

The purity of 5-CQA ($p_{5\text{-CQA}}$) in the sample was determined from its concentration ($C_{5\text{-CQA}}$) and the concentration of a compound i (total dry matter, soluble solids, suspended solids), according to Eq. (3).

$$p_{5\text{-CQA}} = \frac{C_{5\text{-CQA}}}{C_i} \quad (3)$$

The gain in purity of 5-CQA ($GP_{5\text{-CQA}}$) was calculated according to Eq. (4), where $p_{p(5\text{-CQA})}$ and $p_{f(5\text{-CQA})}$ were the purities in the permeate and in the feed, respectively.

$$GP_{5\text{-CQA}} = \frac{p_{p(5\text{-CQA})}}{p_{f(5\text{-CQA})}} \quad (4)$$

3. Results and discussion

3.1. Microfiltration

The selection of a microfiltration (MF) membrane for the clarification of the pulp juice was performed by comparing the performance of four pairs of membrane-transmembrane pressure (TPM) in terms of their permeate flux and retention rates. Two membranes of 1.4 μm pore size (T1.4 and M1.4) were tested at a lower TPM of 1.7 bar, while two membranes of 0.2 μm pore size (T0.2 and M0.2) were tested at a higher TPM of 2.8 bar. This choice was made based on the literature data for the clarification of food juices (Bevilacqua *et al.*, 2018; Dornier *et al.*, 2018b). Figure 2 presents the instantaneous permeate flux of each pair of membrane-TMP tested. Results show that for the membranes of superior pore size (T1.4 and M1.4) the permeate flux continuously decreased over time, which was especially noticeable with T1.4 that had an initial flux of 200 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$ that only stabilized around 125 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$. Conversely, steady permeate fluxes were obtained with the 0.2 μm membranes (T0.2 and M0.2), and T0.2 presented the highest permeate flux (216 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$) of all 4 membranes. These differences observed in terms of the permeate flux are related to the fouling mechanisms occurring on the surface of each membrane, with a faster fouling of T1.4 probably due to pore blockage by the retained particles and the interactions between the molecules in the juice and the membrane material, resulting in a long-term flux decline (Conidi *et al.*, 2018).

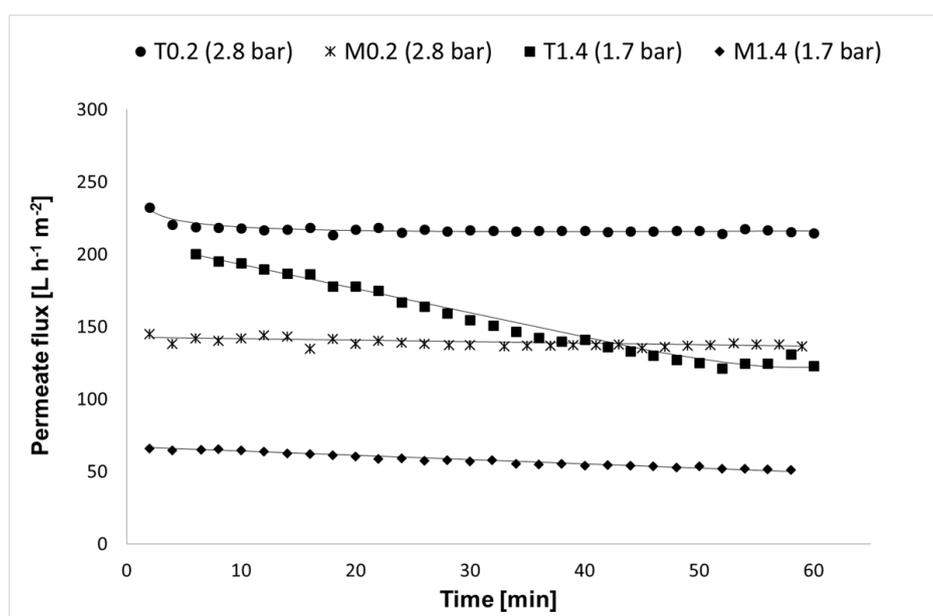


Fig. 2. Evolution of permeate flux during microfiltration of raw pulp juice at constant VRR ($1 < \text{VRR} < 1.1$) for 4 different pairs of membrane-transmembrane pressure.

Table 2 shows the results of the physico-chemical analyses performed on the feed stream (pulp juice) and on the final permeates obtained with each membrane. In all cases, the pH remained the same, around 4.3, which is the normal pH of the coffee pulp (Da Silveira *et al.*, 2019). Suspended solids were completely retained by all tested membranes ($R_{\text{Turbidity}} = 1$), although the permeates of T1.4 and M1.4 presented a slightly higher turbidity than those of the membranes with smaller pore size. The retentions of total soluble solids, sugars (glucose and fructose), ethanol, and 5-CQA were no higher than 11%, with T0.2 and M0.2 retaining more of the solutes in the juice than T1.4 and M1.4. As a result, no gain in purity was observed for the 5-CQA in terms of the total soluble solids, but the purification was rather in terms of the suspended solids that were completely eliminated from the juice.

The retention of color measured at 420 nm, corresponding mainly to soluble phenolic polymers responsible for the brown pigment, varied from 0 to 91%, with remarkable high retentions for M0.2 (91%) and T0.2 (74%). The pigments retention is probably related to the formation of a dynamic membrane generally observed with 0.2 μm membranes during the filtration of biological fluids. Indeed, high molecular weight solutes (i.e., polysaccharides and proteins), present in such food solutions, are rejected by the membrane and can form a gel layer at the membrane surface if their concentration becomes higher than the solubility value, resulting in a thin gel layer that acts as a secondary membrane responsible for the solutes rejection (Dornier *et al.*, 2018b).

These results indicate that T0.2 and M0.2 can not only clarify the pulp juice by eliminating the suspended solids, but can also retain brown pigments considered as impurities in the pulp juice. Moreover, these two membranes presented the highest average permeate flux of all tested membranes, 216 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$ for T0.2 and 138 $\text{L h}^{-1} \text{m}^{-2}$ for M0.2. Based on the filtration performance and retention rates, the best operating conditions for the clarification of the pulp juice are achieved with T0.2 at 2.8 bar, followed by M0.2 at 2.8 bar as the second-best option.

To determine if the selected operating conditions provide a cost-efficient process in an industrial context, the MF was tested at pilot scale in concentration mode. The two membranes of 0.2 μm pore size, previously selected as described above, were tested and compared in terms of the permeate flux, the final volume reduction ratio (VRR), and the retention rates. Figure 3 shows the variation of the permeate flux with the VRR for both membranes. Results show that the permeate flux gradually decreased with the increase in VRR, which was already expected with regards to the polarization phenomena and membrane fouling caused by the retained

particles, in addition to the increase in viscosity of the retentate. In both cases, the final VRR reached was about 15, which represents a recovery yield superior to 93%. This means that most of the pulp juice is recovered after the clarification process and only a small amount of retentate is generated as by-product.

Table 2. Main characteristics of the fermented pulp juice and the final permeates obtained by microfiltration at laboratory scale (at constant VRR = 1).

Characteristic	Pulp Juice (2017)	Permeate T0.2 (2.8 bar)	Permeate M0.2 (2.8 bar)	Permeate T1.4 (1.7 bar)	Permeate M1.4 (1.7 bar)
Jp [L h ⁻¹ m ⁻²]	-	216	138	125	52
pH (20 °C)	4.3	4.4	4.3	4.4	4.2
TSS [g kg ⁻¹]	46	41	41	46	44
R _{TSS}	-	0.11	0.11	0.00	0.04
5-CQA [mg L ⁻¹]	133	120	122	131	128
R _{5-CQA}	-	0.10	0.08	0.02	0.04
GP _(5-CQA/TSS)	-	1.01	1.03	0.98	1.01
GP _(5-CQA/Turbidity)	-	8887	3614	131	265
Turbidity [NTU]	5910	0.6	1.5	44.6	21.5
R _{Turbidity}	-	1.00	1.00	0.99	1.00
Color (420 nm)	16.3	4.2	1.5	17.1	9.2
R _{color(420 nm)}	-	0.74	0.91	0.00	0.44
Glucose [g L ⁻¹]	0.22	0.22	0.21	0.22	0.24
R _{glucose}	-	0.00	0.05	0.00	0.00
Fructose [g L ⁻¹]	2.12	2.07	2.10	2.07	2.10
R _{fructose}	-	0.02	0.01	0.02	0.01
Ethanol [g L ⁻¹]	12.81	11.50	12.24	11.47	12.10
R _{ethanol}	-	0.10	0.04	0.10	0.06

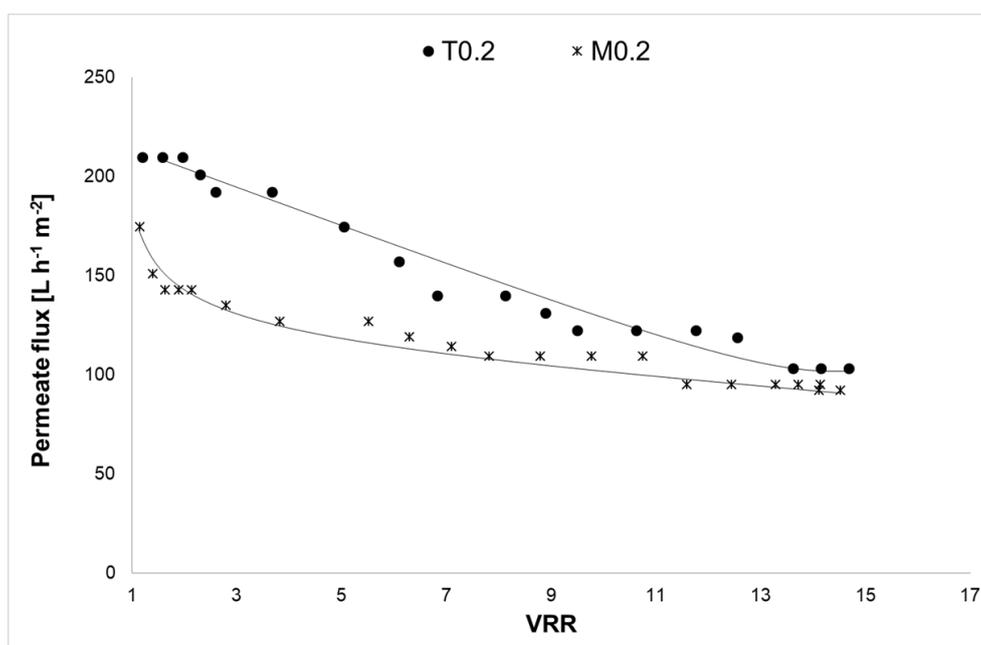


Fig. 3. Permeate flux and volumetric reduction ratio (VRR) during the clarification of coffee pulp juice at pilot scale (TMP = 2.2 bar), using two different MF membranes: T0.2 and M0.2.

The initial permeate fluxes were very closed to those observed at laboratory scale at VRR 1, logically becoming lower as the VRR increased, and stabilizing around $103 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ for T0.2 and around $92 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ for M0.2. The retention rates were also comparable to those observed at laboratory scale, i.e. with complete elimination of suspended solids ($R_{\text{Turbidity}} = 1$), and no significant retentions of solutes (all inferior to 5% for both membranes). Color retention at 420 nm was slightly higher with M0.2 (80%) than with T0.2 (75%), similar behavior observed at lab scale.

Considering an industrial application of the MF process, both membranes could be used to clarify of the pulp juice as they both presented satisfactory filtration performance in terms of the high permeate flux and final VRR. Indeed, in an industrial context, reaching a high VRR and keeping the permeate flow economically viable is essential to avoid high overall production costs. Moreover, the higher the VRR, the lower the volume of retentate generated, which is considered as waste or as a by-product of low commercial value (Vaillant *et al.*, 2001).

Overall, the microfiltration process presents a valid approach for the recovery of CGA from the coffee pulp juice. The clarified juice presents functional properties (i.e. CGA content) that are comparable to those of the pulp juice, except for the insoluble fraction and some of the colored pigments that remained concentrated in the retentate. For future studies, the MF process can be

further optimized by testing new combinations of membranes and TMP that could provide even better filtration performances and lower operating costs.

3.2. Ultrafiltration

The use of ultrafiltration (UF) technology was investigated at lab-scale to fractionate the pulp juice after MF in order to remove high molecular weight solutes from the clarified juice. UF was also performed on non-clarified pulp juice to assess the need for a MF step. Furthermore, the use of fine UF was investigated after MF and UF steps to further fractionate the solutes that were not retained by the previous membranes, thus contributing to the purification of CGA in the juice. Figure 4 presents the permeate flux of the different coupling of membranes tested during the UF trials in concentration mode on a pseudo-tangential pilot.

Results show that a very low flux ($<50 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$) is obtained when filtering the pulp juice directly through an UF membrane (T50) due to a rapid membrane fouling that significantly decreases the permeate flux, reaching a critical VRR of 1.5 (Figure 4A). This can be explained by the presence of the insoluble particules in the pulp juice that caused the fast fouling of T50, leading to a poor filterability of the juice. Instead, the filtration of the clarified juice through the same UF membrane (T50) presented a much higher permeate flux ($\geq 100 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$) and reached a VRR superior to 6. These results show the importance of the MF step prior to the UF to avoid fast membrane fouling and to provide higher permeate recovery yields necessary for an industrial application of the recovery process.

The performance of two UF membranes (T50 and T15) was compared using the clarified juice to determine the effect of the membrane pore size on filterability of the juice. Results show that T50 presented much higher permeate flux and VRR than T15, which, according to the classic transport theory in porous materials, is expected for membranes of bigger pore size that provide less resistance to mass transfer during the filtration, (Baker, 2000). The results obtained with T15 showed a sudden decrease of the permeate flux (from $60 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$ to $3 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$) when the VRR reached 2.6. This indicates that the retained compounds increased abruptly the fouling of the membrane over a critical point where the permeate flux became practically zero. Such surprising behavior has already been observed during the clarification of certain fruit juices (Vaillant *et al.*, 2001). This would be a serious constraint to applying this membrane at an industrial scale, therefore T50 would be the best option for the UF of the pulp juice.

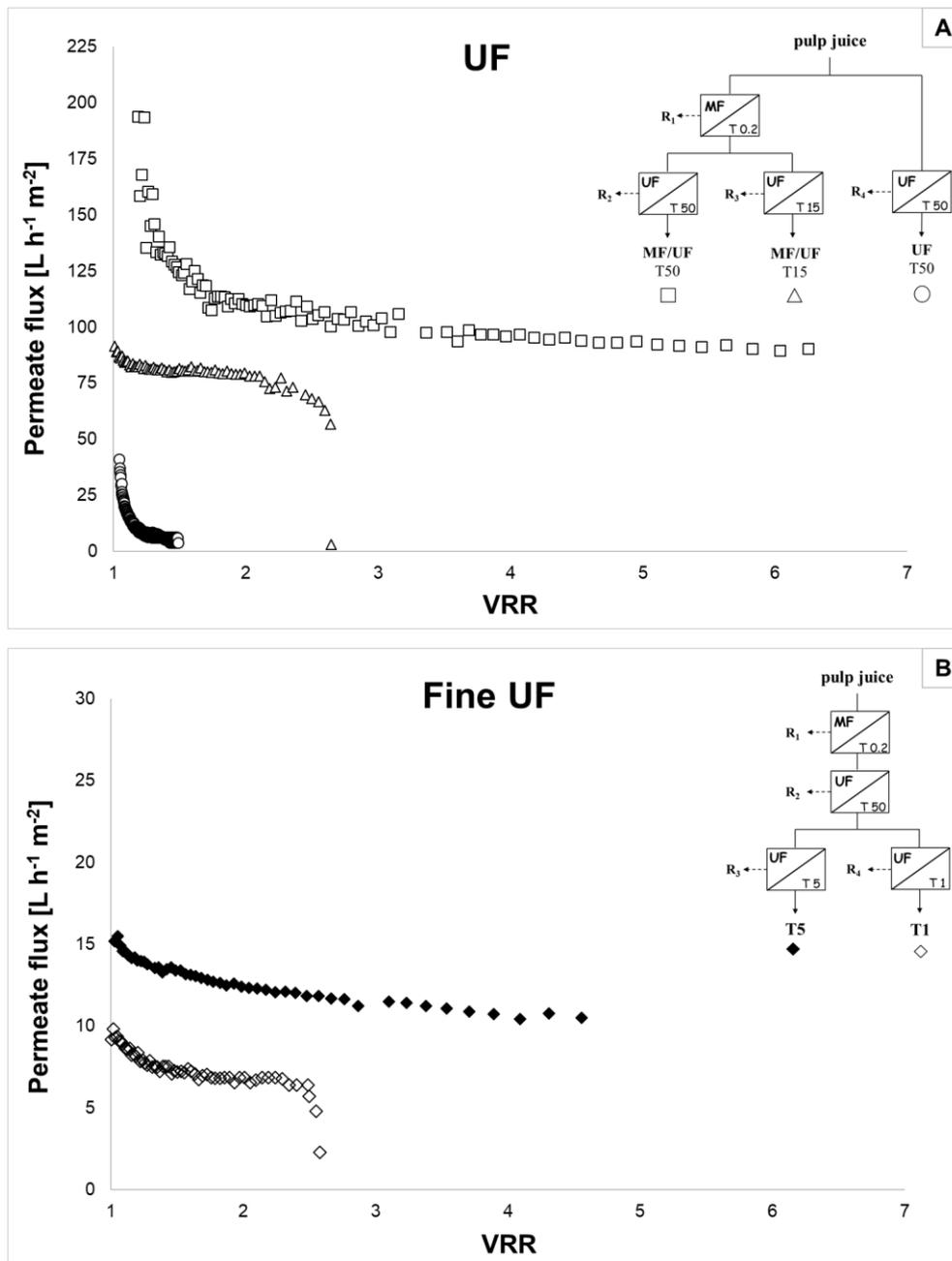


Fig. 4. Permeate flux and volumetric reduction ratio (VRR) during the ultrafiltration trials (TMP = 2.2 bar). A) ultrafiltration of the raw juice with T50, and ultrafiltration of the clarified juice with two different membranes: T50 and T15; B) fine ultrafiltration of the clarified juice, after ultrafiltration with T50, using two different membranes: T5 and T1.

Fine UF was then investigated after the UF of the clarified juice through T50, as previously described, in order to eliminate the lower molecular weight solutes that were not retained by T50. Two membranes of different molecular weight cut-off (MWCO), 5 kDa (T5) and 1 kDa (T1), were tested and compared in terms of their filterability (Fig. 4.B). According to the results, T5 presented a higher permeate flux than T1, which stabilized around 11 L h⁻¹ m⁻² after reaching

a VRR of 3. For T1, the permeate flux abruptly decreased after a VRR superior to 2.5, reaching a flux as low as $2.5 \text{ L h}^{-1} \text{ m}^{-2}$. This can indicate that the pores of T1 become blocked much faster by the retained molecules, leading to a critical VRR that would be unsuited for an industrial application.

Table 3 presents the main characteristics of the final permeates obtained with the different combinations of membranes tested and the composition of the corresponding feed streams. Because the juices were prepared and stored in different ways prior to the UF trials, the initial content of 5-CQA in the feed juices varied from one test to another. For example, when the permeate obtained with T50 was produced using the MF juice, the 5-CQA content was higher in the permeate than when this same product was used as feed stream for the fine UF tests (initially 319 mg L^{-1} , and then only 265 mg L^{-1} in the UF juice), which indicates the degradation of this compound during the storage process of the juice. The contents of total dry matter (TDM), sugars, and colored compounds (pigments) of the juices did not vary during the storage period.

Results show that the retention of TDM only occurred during the clarification of the pulp juice (in this case, with T50), and that the UF of the clarification process did not improve the retention of TDM ($R_{\text{TDM}} \leq 10\%$). Sugars (glucose and fructose) were also not retained during UF. The retention of color corresponding to the purple pigments (anthocyanins and flavonoids with molar weight of 400-600 Da) was also higher during the clarification of the pulp juice with T50 ($R_{\text{color}(520\text{nm})} = 77\%$) than during the UF of the microfiltered juice ($R_{\text{color}(520\text{nm})} \leq 36\%$). The suspended solids and colloids present in the pulp juice probably formed a much more important resistance barrier on the surface of T50, contributing to the higher retentions of TDM and color observed for during the clarification process.

Surprisingly, the brown pigments (phenolic polymers) were not as well retained by T50 as they were retained by the membranes with $0.2 \mu\text{m}$ pore size (Section 3.1). This observation is probably related to the pretreatment step of the pulp juice prior to the UF experiments, that led to differences in the composition of the pulp juice. For the MF study, the filtration was carried out in situ after the juice was prepared; while for the UF trials, the pulp juice was concentrated for transportation purposes, and then stored until use. During the concentration of the juice, the insoluble particules may have caused the insolubilization of the brown pigments, which would explain the differences observed in the color of the pulp juice used for the MF tests ($\text{Color}_{420\text{nm}} = 16$) and the one used in the UF tests ($\text{Color}_{420 \text{ nm}} = 2.86$).

Table 3. Main characteristics of processed coffee pulp juices after microfiltration and ultrafiltration steps in concentration mode (TMP = 2 bar).

Characteristic	Pulp Juice ^a (2018)	Permeate T50	MF Juice ^b	Permeate T50	Permeate T15	UF Juice ^c	Permeate T5	Permeate T1
Feed	-	Pulp Juice	-	MF Juice	MF Juice	-	UF Juice	UF Juice
Jp [L h ⁻¹ m ⁻²]	-	8.5	-	103.7	76.6	-	13	7.5
Final VRR	-	1.5	-	6.2	2.6	-	4.7	2.6
TDM [g kg ⁻¹]	58.1	47.3	53.2	53.3	49.7	53.0	51.3	47.7
R _{TDM}	-	0.19	-	0.00	0.07	-	0.03	0.10
5-CQA [mg L ⁻¹]	86	76	318	319	234	265	237	219
R _{5-CQA}	-	0.11	-	0.00	0.26	-	0.11	0.17
GP _(5-CQA/TDM)	-	1.09	-	1.00	0.79	-	0.92	0.92
Color (420 nm)	2.86	2.62	2.78	2.71	2.28	2.70	1.23	0.64
R _{color(420nm)}	-	0.08	-	0.03	0.18	-	0.54	0.76
Color (520 nm)	3.02	0.69	1.13	0.98	0.69	0.91	0.32	0.14
R _{color(520nm)}	-	0.77	-	0.13	0.39	-	0.65	0.85
Glucose [g L ⁻¹]	4.0	3.8	8.0	8.8	7.2	8.7	8.4	8.5
Fructose [g L ⁻¹]	16.4	15.6	22.0	24.3	20.4	23.5	22.8	22.9

a = pulp juice obtained after pulp fermentation and pressing at pilot scale in Costa Rica ; b= clarified juice obtained after microfiltration at pilot scale using T0.2 at 2.2 bar (mean values for 2 samples analyzed) ; c = permeate obtained after ultrafiltration of the clarified juice using T50 at 2 bar at lab-scale (mean values for 2 samples analyzed).

The retention of the target compound 5-CQA depended on the nature of the feed stream, as observed for the results of T50 for the pulp juice and the microfiltered juice, retentions of 12% and 0%, respectively. Interactions between the 5-CQA and the particles in the pulp juice may be responsible for the retention observed during the clarification process with T50. For the UF of the microfiltered juice, 5-CQA was partly retained by T15 (R_{5-CQA} = 26%) but not retained by T50, which was also the case for the purple pigments that were more retained by T15 (39%) than by T50 (13%). The decrease in the membrane pore size was probably the responsible factor for the higher retentions observed with T15.

No gain in purity of 5-CQA in terms of TDM was observed during the UF step. This can be related to the low contents of dry matter of the pulp juice and the microfiltered juice, and to the low retention rates of dry matter observed during the UF tests ($R_{TDM} \leq 10\%$). According to these observations, the content of TDM appears not to be a relevant purification performance indicator for the pulp juice treatment. For future studies, it would be of great interest to find new indicators for the purification of the chlorogenic acids, such as in terms of the polyphenols of higher molecular weight (e.g. tannins) or other solutes (proteins, pectin, etc.), to better evaluate the membrane performance during UF of the clarified juice.

The retention rates during the fine UF step were very similar between the two tested membranes, except for the retention of colored molecules (brown and purple pigments) that significantly increased as the membrane cut-off decreased, i.e. higher color retention with T1 ($R_{\text{color}(520\text{nm})} = 85\%$ and $R_{\text{color}(420\text{nm})} = 76\%$). Considering the filterability of the juice, T5 presented superior performance in terms of permeate flux and final VRR achieved. Due to a rapid membrane fouling, it was not possible to obtain a VRR superior to 2.6 with T1. These results suggest that the fine UF step could be used to purify the CGA in terms of the colored pigments while reducing the volume of juice (by 4.7 with T5) to be further treated in the downstream processing. However, in order to use the color intensity as a performance indicator for the purification of the juice, further studies should be carried out to characterize and quantify these colored molecules (pigments).

To summarize, membrane processes present a great potential for the cold recovery of CGA from coffee pulp juice. The MF step allowed the elimination of the insoluble solids and colloid fractions while maintaining the CGA in the juice. The selected operating conditions presented a satisfactory filtration performance, in terms of the high flux and permeate recovery yields, for an industrial application of the MF process. Moreover, only a small amount of by-product (retentate) was generated during this step, which contributes for the sustainable processing of the pulp juice. The coupling of UF (50 kDa) and fine UF (5 kDa) after the MF step presents a potential for the purification of CGA in terms of the colored compounds (considered as impurities), and also for the preconcentration of the clarified juice. Nevertheless, further studies are needed to enhance both performances of filterability and CGA purification for the UF study (test of other membrane combinations). Additionally, new performance indicators should be found to better evaluate the purification of CGA in the clarified juice, which will help to determine the real interest of the UF step in the downstream processing of the pulp juice.

4. Conclusion

Membrane technology can be used in the downstream processing of coffee pulp juice to recover chlorogenic acids for potential industrial applications. In this work, microfiltration (MF) and ultrafiltration (UF) membranes were tested for the separation of molecules in the pulp juice. By selecting the best operating conditions (pair membrane/pressure) for the MF step, it was possible to clarify the pulp juice by eliminating the insoluble solids and colloid fractions, while obtaining high permeate flux and recovery yields in the view of an industrial application. The filtration of the pulp juice directly through UF resulted in fast membrane fouling and very low juice filterability, highlighting the importance of the MF step prior to UF. Results also showed that the retention of total dry matter was very low during the UF step using the clarified juice (<10%), which resulted in no apparent gain in purity of the target compound 5-CQA. The coupling of UF and fine UF membranes to treat the clarified juice presents a potential for the purification of 5-CQA in terms of colored compounds that are considered as impurities in the product. Finally, the integrated membrane process can be applied in the downstream processing of the pulp juice to obtain a markable product with functional properties, contributing for the sustainable food waste management of the coffee sector.

4^{ème} partie : étude de la concentration de l'extrait de pulpe par nanofiltration

Comme nous l'avons souligné dans la partie bibliographique, la nanofiltration peut être utilisée pour concentrer des composés de faible masse molaire dans les produits alimentaires. L'application de ce procédé pour concentrer à froid les acides chlorogéniques contenus dans l'extrait de pulpe clarifié va être évaluée dans cette partie.

1. Introduction

Quatre membranes organiques de nanofiltration avec différents seuils de coupure ont été testées sur l'extrait de pulpe clarifié par microfiltration sur membrane TAMI 0,2 μm (T0,2) à 30 °C. Le Tableau 1 présente les principales caractéristiques de ces membranes qui sont toutes déjà couramment utilisées et disponibles au niveau industriel. La présélection des membranes pour cette étude est basée sur la différence de taille des solutés qui pourraient être potentiellement séparés selon le seuil de coupure choisi (Figure 1). En se référant uniquement aux masses molaires, la membrane DL 300 est susceptible de retenir la grande majorité des solutés organiques. Son seuil de coupure étant intermédiaire entre les masses molaires des acides chlorogéniques et des oses, elle pourrait permettre de séparer ces deux types de composés. Les membranes NP 600, NP 1000 et GE 1000 sont quant à elles adaptées pour séparer les acides phénoliques des composés de masses molaires plus élevées et devraient donc permettre de les purifier.

Tableau 1. Principales caractéristiques des membranes de nanofiltration testées.

Codage	Fabricant	Matériau	Référence commerciale	Seuil de coupure ^a [Da]	Surface [cm ²]	Perméabilité à l'eau ^b [kg/h.bar.m ²]
DL 300	GE Osmonics	Polyamide polysulfone	DL	200	150	7,3
NP 600	Microdyn-Nadir	Polyéthersulfone	NP030	600	150	2,5
NP 1000	Microdyn-Nadir	Polyéthersulfone	NP010	1000	150	10,7
GE 1000	GE Osmonics	Composite polyamide	GE	1000	150	3,3

a = seuil de coupure évalué par le fournisseur ; b = perméabilité à l'eau mesurée à 30 °C et à 25 bar.

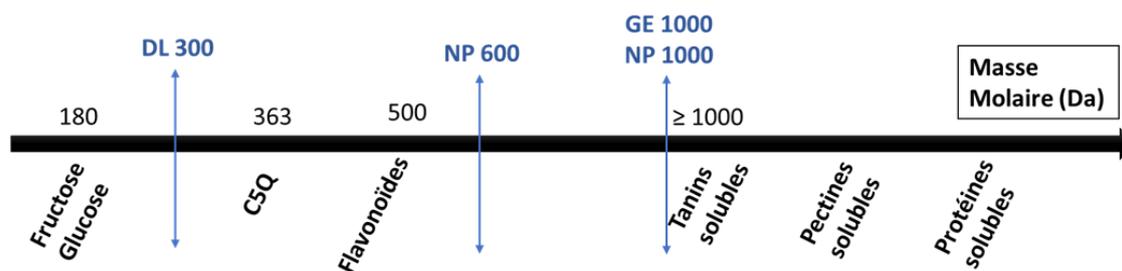


Figure 1. Domaines de séparation théoriques des membranes de nanofiltration envisagées.

Les performances de chaque membrane ont été évaluées en termes de densité de flux de perméat et de taux de rétention en fonction de la pression transmembranaire appliquée. De plus, des indicateurs de purification ont été utilisés pour exprimer le potentiel des membranes à purifier le composé d'intérêt, C5Q, par rapport à la matière sèche ou par rapport aux polyphénols totaux. Enfin, les résultats obtenus à FRV constant ont permis de simuler quelques cas d'applications de la nanofiltration pour des séparations sur l'extrait de pulpe clarifié.

2. Résultats et discussion

2.1. Etude des conditions opératoires à FRV constant

Le Tableau 2 présente la composition de l'extrait d'alimentation utilisé pendant les essais de nanofiltration (NF). Cet extrait brut a été clarifié au Costa Rica par microfiltration sur membrane T0,2 selon les résultats présentés dans la 3^{ème} partie. Pour son envoi en France, l'extrait clarifié a été concentré 3 fois par évaporation sous vide et congelé à une température de -20 °C. Avant les essais de NF, l'extrait a été décongelé et redilué 3 fois avec de l'eau déminéralisée pour obtenir à nouveau la concentration initiale de l'extrait clarifié. Quelques différences de composition ont été observées après le traitement de l'extrait pour son transport : la teneur en C5Q était inférieure à celle mesurée au Costa Rica avant concentration sous vide (initialement 319 mg kg⁻¹) et l'éthanol n'était plus présent dans l'extrait suite à son évaporation lors de la concentration sous vide.

Les essais de nanofiltration ont été réalisés à FRV = 1 (sans concentration) afin d'étudier l'effet du couple membrane-PTM sur les performances de la filtration de l'extrait clarifié. La Figure 2 présente la densité de flux de perméat (J_p) en fonction de PTM (6-25 bar) pour les 4 membranes testées. Les valeurs de J_p reportées correspondent à celles mesurées une fois le régime stationnaire établi (généralement atteint après 40 min de filtration à pression constante).

Tableau 2. Composition moyenne de l'extrait de pulpe clarifié par microfiltration tangentielle utilisé pour les essais de nanofiltration.

Caractéristique	MS [g kg ⁻¹]	ESS [g kg ⁻¹]	C5Q [mg kg ⁻¹]	PTT [g acide gallique L ⁻¹]	Glucose [g kg ⁻¹]	Fructose [g kg ⁻¹]	Acidité titrable [mécq L ⁻¹]	pH
Extrait clarifié*	56,7 (2,2)	63,5 (2,9)	176 (6)	3,0 (0,5)	8,9 (0,5)	16,6 (1,0)	45,2 (2,2)	5,5 (0,1)

* = Extrait de pulpe clarifié sur membrane T0,2 à échelle semi-industrielle au Costa Rica, concentré trois fois avant son transport, et redilué 3 fois avant les essais de nanofiltration (valeurs moyennes et écart-types obtenues sur les 4 lots utilisés).

Un seuil de pression minimale (10 bar) a été nécessaire pour mesurer un flux de perméat avec les membranes DL 300 et NP 600. Les résultats montrent que la densité de flux augmente proportionnellement avec la PTM pour toutes les membranes. La membrane DL 300 présente les J_p les plus élevées à partir d'une pression de 15 bar. Pour la membrane NP 600, la densité de flux de perméat varie très peu et reste très faible, inférieur à 5 kg h⁻¹ m⁻² quelle que soit la PTM appliquée. Les deux membranes avec un seuil de coupure égal à 1 kDa, GE 1000 et NP 1000, présentent une densité de flux intermédiaire à celles de DL 300 et NP 600, et les meilleures performances sont obtenues avec la membrane GE 1000.

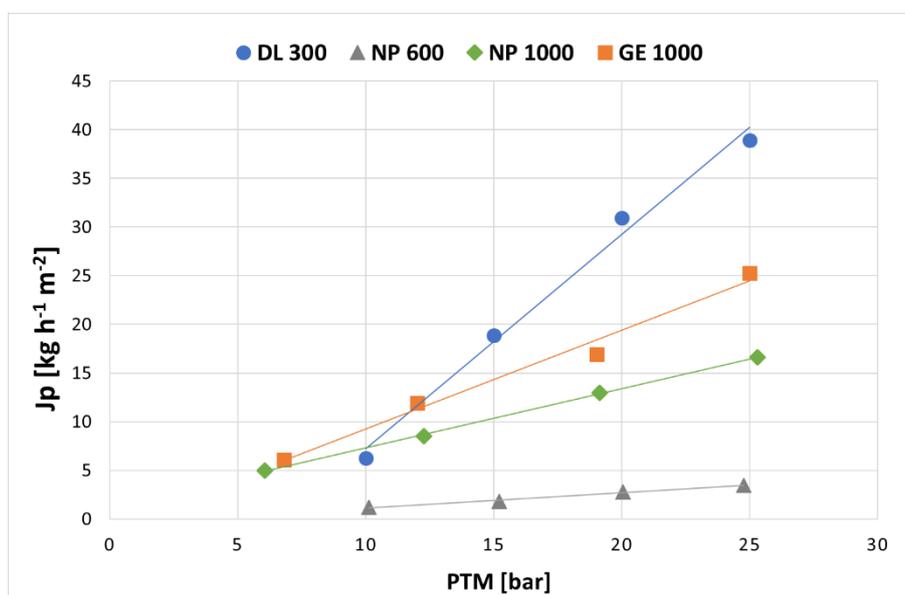


Figure 2 – Evolution de la densité de flux de perméat (J_p) lors de la nanofiltration de l'extrait de pulpe clarifié à FRV constant (FRV = 1) en fonction de la pression transmembranaire (PTM) pour les 4 membranes testées.

Les comportements observés de J_p en fonction de la pression sont comparables à ceux déjà mentionnés lors du traitement par nanofiltration de produits similaires (Tamba *et al.*, 2019; Acosta *et al.*, 2017; Conidi *et al.*, 2012, 2011; Cisse *et al.*, 2011). La linéarité de J_p en fonction de PTM et la présence d'un seuil de PTM en dessous duquel les transferts n'ont pas lieu, sont fréquentes en nanofiltration. En termes phénoménologiques, les transferts de matière transmembranaires ne sont pas simples à appréhender sur des produits de compositions complexes. En effet, les transferts de solvant et de solutés sont régis à la fois par des mécanismes convectifs (principalement pour les seuils de coupures les plus élevés), des mécanismes diffusifs et des interactions chimiques faibles avec le matériau membranaire (d'autant plus importantes que les seuils de coupure sont faibles).

En termes quantitatifs, les densités de flux mesurées sont très différentes d'une membrane à l'autre. Nous pouvons noter qu'elles ne sont corrélées ni au seuil de coupure (Figure 2) ni à la perméabilité à l'eau des membranes (Tableau 1). Ces résultats sont très probablement liés aux différences 1) de caractéristiques structurales des membranes (épaisseur, porosité, tortuosité, état de surface, distribution des diamètres de pores, etc.), 2) de matériaux constitutifs qui conditionnent les interactions possibles avec les solutés présents dans l'extrait. Ces différences sont plus ou moins favorables au colmatage membranaire (accumulation de matière en surface ou à l'intérieur de la porosité de la membrane) qui augmente la résistance au transfert de matière. Il est toutefois hasardeux d'analyser plus avant nos résultats car d'une part, les membranes utilisées ne sont pas suffisamment caractérisées et d'autre part, le produit traité présente une composition très complexe qui n'est pas complètement connue.

Les taux de rétention de différents composés ont été calculés pour les 4 membranes testées à différentes PTM (Figure 3). Comme il est habituellement observé en nanofiltration, les taux de rétention augmentent avec la PTM. En toute logique, ils sont inversement corrélés aux seuils de coupure des membranes. La membrane DL 300 présente les taux de rétention les plus élevés, suivi par la membrane NP 600 et, enfin, par les membranes de 1 kDa. Bien que leur seuil de coupure soit équivalent (1 kDa), la membrane NP 1000 présente des valeurs de rétention plus élevées que la membrane GE 1000. La membrane NP 1000 conduit à des densités de flux plus faibles malgré une perméabilité à l'eau plus élevée. Ce résultat pourrait être lié à un colmatage plus important de la membrane NP 1000.

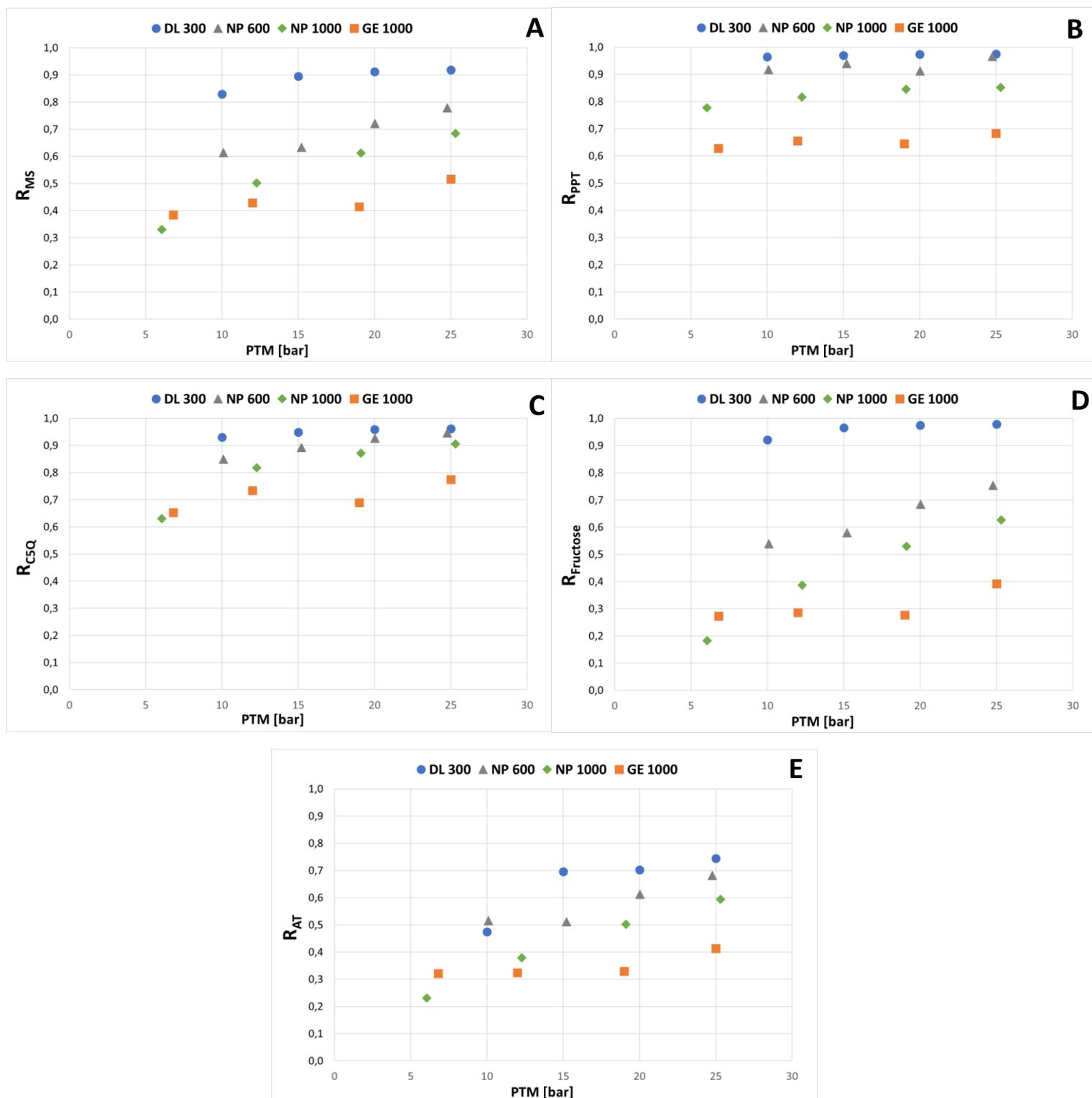


Figure 3. Taux de rétention obtenus R_i en fonction de la pression transmembranaire (PTM) pour les 4 membranes de nanofiltration testées. A : MS ; B : PPT ; C : C5Q ; D : Fructose ; E : Acidité titrable.

Les taux de rétention de la matière sèche totale (Fig. 3A) varient entre 33 % (NP 1000) et 92 % (DL 300). Les taux de rétention de l'extrait sec soluble (non présentés graphiquement) se sont avérés identiques aux taux de rétention de la matière sèche, ce qui est très intéressant d'un point de vue pratique. En effet, la mesure de l'extrait sec soluble par réfractométrie (mesure de l'indice de réfraction, en degré Brix) est beaucoup plus simple et rapide que la détermination de la matière sèche (gravimétrie). Elle peut donc être utilisée comme indicateur de la rétention de la matière sèche totale pendant les essais de nanofiltration.

Les rétentions du fructose (Fig. 3D) et des acides organiques (Fig. 3E), constituants majoritaires de la matière sèche de l'extrait, varient entre 60 % (GE 1000) et 97 % (DL 300) pour les acides organiques, et entre 18 % (NP 1000) et 98 % (DL 300) pour le fructose. Les taux de rétentions du glucose (non présentés graphiquement) sont identiques aux taux de rétention du fructose. D'après ces résultats, la rétention des sucres est plus sensible à la pression pour les membranes en polyéthersulfone (NP 600 et NP 1000). Les acides organiques sont moins bien retenus que les sucres pour la membrane DL 300. Cette différence de rétention pourrait être expliquée par leur ionisation partielle sous forme de carboxylates qui favoriserait les interactions électrostatiques avec le matériau membranaire, réputé chargé positivement à notre pH de travail (Conidi *et al.*, 2012). Enfin, toutes les membranes retiennent au moins 95 % des pigments bruns (non présentés graphiquement), indépendamment de la PTM appliquée. L'opération contribue donc à décolorer le produit.

Les rétentions en polyphénols totaux (Fig. 3B) et en C5Q (Fig. 3C) sont voisines et varient entre 60 % (GE 1000) et 97 % (DL 300). Excepté pour la membrane DL 300, les composés phénoliques sont mieux retenus que les sucres. Cette observation est probablement liée à leur différence de masse molaire (180 g.mol⁻¹ pour les oses et 354 g.mol⁻¹ pour le C5Q par exemple) et, peut-être aussi, à leur différence de polarité (oses beaucoup plus polaires que les ACG). Pour la membrane DL 300, contrairement à ce qui avait été prédit, sucres et polyphénols sont retenus de façon très similaire. Il ne sera donc pas envisageable d'utiliser cette membrane pour les séparer.

Comme la rétention de chaque composé varie différemment selon les conditions opératoires utilisées (membrane et PTM), plusieurs options de séparation peuvent être envisagées lors de la nanofiltration de l'extrait de pulpe. Afin d'évaluer le potentiel des membranes pour séparer le C5Q (principal composé d'intérêt) des autres solutés présents dans le produit, il est possible de raisonner en différence de rétention ΔR . Plus cette différence est importante, meilleure sera

la séparation. Dans le contexte de notre étude, nous avons choisi de nous intéresser à la séparation du C5Q par rapport à la matière sèche en définissant $\Delta R_{C5Q/MS}$ et, par rapport aux autres composés phénoliques en définissant $\Delta R_{C5Q/PPT}$.

Le Tableau 3 présente les densités de flux de perméat et les ΔR en fonction de PTM pour chaque membrane.

Tableau 3. Evaluation du potentiel des combinaisons membranes / pressions (PTM) testées pour la purification et la concentration de l'extrait de pulpe par nanofiltration en intégrant la densité de flux de perméat (J_p) et les différences de rétention entre le composé cible (C5Q) et la matière sèche ($\Delta R_{C5Q/MS}$) ou les polyphénols totaux ($\Delta R_{C5Q/PPT}$).

Membrane	DL 300			NP 600			NP 1000			GE 1000		
	15	20	25	15	20	25	12	19	25	12	19	25
PTM [bar]	15	20	25	15	20	25	12	19	25	12	19	25
J_p [$\text{kg h}^{-1} \text{m}^{-2}$]	19	31	39	2	3	3	9	13	17	12	17	25
$\Delta R_{C5Q/MS}^*$	0,05	0,05	0,04	0,26	0,21	0,17	0,32	0,26	0,22	0,30	0,27	0,26
$\Delta R_{C5Q/PPT}^*$	-0,02	-0,01	-0,01	-0,05	0,02	-0,02	0,00	0,03	0,05	0,08	0,04	0,09

* = valeur positive quand le C5Q se purifie du côté rétentat, et négative quand il se purifie du côté perméat.

La membrane DL 300 ne peut pas être utilisée pour purifier l'extrait car les différences de rétentions entre le composé d'intérêt (C5Q) et les autres solutés sont inférieures à 0.10. Cependant, cette membrane peut être potentiellement intéressante pour concentrer l'extrait sans en modifier drastiquement la composition. Les taux de rétentions obtenus sont en effet élevés pour la plupart des solutés (supérieures à 80 % pour tous les solutés analysés, sauf pour l'acidité titrable). De plus, cette membrane présente les meilleures performances de filtration, avec des densités de flux de perméat intéressantes à partir d'une PTM de 15 bar ($\geq 19 \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$).

La membrane NP 600 permet de séparer le C5Q de la matière sèche mais les différences de rétentions sont moyennes ($\Delta R \leq 0.26$) et les densité de flux de perméat sont rédhitoires ($J_p \leq 3 \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$). Les membranes avec des seuils de coupure égaux à 1 kDa (GE 1000 et NP 1000) présentent quant à elles des différences de rétention entre le C5Q et la matière sèche et des densités de flux plus élevées, ce qui pourrait être intéressant pour une pré-purification du C5Q dans l'extrait de pulpe. Par contre, dans les conditions testées, aucune des membranes choisies n'a permis de séparer significativement le C5Q des autres polyphénols ($\Delta R_{C5Q/PPT} < 0.10$).

Compte tenu de ces observations, deux applications différentes peuvent être envisagées pour l'étape de nanofiltration :

1- concentration de l'extrait de pulpe clarifié : dans ce cas, il est souhaitable que les taux de rétentions des solutés d'intérêt soient les plus élevés possibles et que les rapports $\Delta R_{C5Q/MS}$ et $\Delta R_{C5Q/PPT}$ soient les plus faibles possibles pour ne pas modifier de façon trop importante le profil de composition de l'extrait.

2- purification des acides chlorogéniques : dans ce cas, il est souhaitable que le taux de rétention du C5Q soit supérieur aux taux de rétention des autres solutés afin de diminuer la matière sèche de l'extrait tout en conservant les composés d'intérêt. Ainsi, il faut que le $\Delta R_{C5Q/MS}$ et $\Delta R_{C5Q/PPT}$ soient les plus grands possibles pour favoriser la séparation du C5Q au détriment des autres composés.

Selon les résultats obtenus, la membrane DL 300 pourrait être utilisée en appliquant une PTM de 25 bar pour concentrer l'extrait, compte tenu des densités de flux de perméat et des taux de rétention élevés. Pour la pré-purification, une membrane avec un seuil de coupure de 1 kDa, NP 1000 ou GE 1000, pourrait être utilisée pour séparer les acides chlorogéniques de la matière sèche totale de l'extrait en appliquant une PTM de 12 bar.

Il est important de souligner que ces résultats ont été obtenus à FRV 1 constant. Les taux de rétention et les flux de perméat vont être modifiés avec l'augmentation du FRV lors de la filtration de l'extrait en situation réelle de production (généralement diminution des flux et des rétentions). Ainsi, les conditions opératoires sélectionnées (couples membrane-PTM) devront être impérativement testées à FRV croissant pour valider les résultats présentés dans ce travail. Nous proposons toutefois, en première approche, d'utiliser les valeurs obtenues pour réaliser quelques simulations qui pourront être affinées par la suite par des essais expérimentaux complémentaires.

2.2. Simulation du procédé

Les différentes conditions opératoires sélectionnées dans l'étude à FRV constant ont été utilisées pour simuler la nanofiltration de l'extrait de pulpe en mode concentration (FRV croissant) afin d'étudier les potentialités des couples membrane-pression pour une application industrielle. La simulation se base sur l'utilisation d'un modèle classique décrit par exemple

par Wang *et al.* (2008) et déjà utilisé dans des cas assez similaires au nôtre (Acosta *et al.*, 2014; Tamba *et al.*, 2019). Ce modèle suppose que les bilans matières sont respectés, que les taux de rétention sont constants et que le système se comporte comme un réacteur infiniment mélangé. Le facteur de concentration FC_i d'un composé i dans le rétentat r après une filtration réalisée jusqu'à un FRV donné ($FRV = V_0/V_r$) suivie d'une diafiltration jusqu'à un DV réduit donné ($DV = V_{eau}/V_r$) peut alors être évalué selon l'équation 1, avec R_i le taux de rétention de i ($R_i = 1 - C_{pi}/C_{ri}$).

$$FC_i = \frac{C_{ri}}{C_{oi}} = FRV^{R_i} e^{DV(R_i-1)} \quad (1)$$

avec C_{oi} et C_{ri} , les concentrations de i dans le produit initial (alimentation) et dans le rétentat final, respectivement.

En appliquant l'équation 1 à deux composés i et j , il est possible de calculer le facteur de purification de i par rapport à j dans le rétentat $FP_{i/j}$ (équation 2). Cette expression met bien en évidence l'importance du ΔR dans l'efficacité de la séparation.

$$FP_{i/j} = \frac{FC_i}{FC_j} = FRV^{(R_i-R_j)} e^{DV(R_i-R_j)} \quad (2)$$

L'équation 1 permet d'avoir accès au rendement de récupération de i (γ_i) dans le rétentat (équation 3).

$$\gamma_i = \frac{C_{ri} V_r}{C_{oi} V_0} = FRV^{(R_i-1)} e^{DV(R_i-1)} \quad (3)$$

Pour terminer, 2 indicateurs a dimensionnels (car ramenés au volume de rétentat V_r) peuvent être définis : un indicateur de consommation d'eau Ea (équation 4) et un indicateur de génération d'effluents Ef (équation 5).

$$Ea = \frac{V_{eau}}{V_r} = DV \quad (4)$$

$$Ef = \frac{V_{effluent}}{V_r} = FRV + DV - 1 \quad (5)$$

En utilisant ces équations, les simulations ont été réalisées jusqu'à des FRV de 10 et pour des DV de 0 à 5.

1.1. Concentration

Pour la simulation de la concentration de l'extrait, les résultats obtenus avec la membrane DL 300 à 25 bar ont été utilisés. La figure 4 présente les résultats des simulations dans le cas de la concentration des acides hydroxycinnamiques. Ces résultats montrent que, grâce à la rétention élevée de C5Q ($R_{C5Q} > 90\%$), le facteur de concentration de ce composé est quasiment égal au FRV (cf. équation 1). Jusqu'à un FVR égal à 10, le rendement de récupération du C5Q dans le rétentat reste très satisfaisant, supérieur à 97 %. La simulation confirme donc bien l'intérêt de cette combinaison membrane-pression pour la concentration de l'extrait. Même si les densités de flux obtenues sont encourageantes à $FRV = 1$ (J_p de l'ordre de $40 \text{ kg h}^{-1} \text{ m}^{-2}$), il reste toutefois à mesurer l'impact du FRV sur J_p pour évaluer la faisabilité industrielle du procédé.

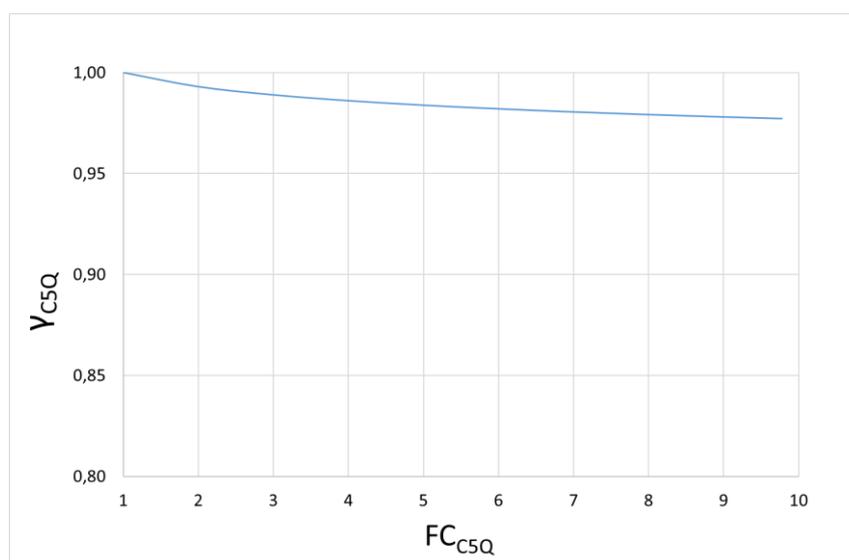


Figure 4. Simulation du cas de la concentration de l'extrait sur la membrane DL 300 à 25 bar : rendement de récupération des acides chlorogéniques (Y_{C5Q}) en fonction du facteur de concentration (FC_{C5Q}).

1.2. Purification

La Figure 5 présente les résultats des simulations dans le cas de la purification des acides hydroxycinnamiques en utilisant 2 couples membrane-pression différents, NP 1000-12 bar et

GE 1000-12 bar. Ces graphes montrent les intervalles de facteurs de concentration et de purification du C5Q qui peuvent être atteints selon le couple membrane-pression choisi. Ils permettent aussi d'évaluer le FRV et le DV nécessaires pour atteindre différents niveaux de concentration et de purification. Pour illustrer l'application de ces graphes, avec la membrane NP 1000 à 12 bar, pour obtenir un $FP_{C5Q/MS}$ de 10 et un FC_{C5Q} de 2,5, il faut travailler avec un DV d'environ 5 et un FRV fixé à 9. L'ordre de grandeur des facteurs de purification varie sensiblement d'une membrane à l'autre. Pour les 2 cas étudiés, nous constatons que les combinaisons membrane-PTM permettent d'atteindre des facteurs de concentration moyens, inférieurs à 7, mais avec des facteurs de purification pouvant atteindre 10. La combinaison NP 1000-12 bar permet d'envisager une bonne purification des acides chlorogéniques tout en concentrant légèrement ces composés. La combinaison GE 1000-12 bar présente des performances de purification et de concentration globalement inférieures à celles de la membrane NP 1000.

Le Tableau 4 présente quelques résultats de simulations pour les deux combinaisons membrane-PTM testées pour la purification de l'extrait en termes de performances du procédé et d'impact environnemental (consommation d'eau et génération d'effluents). Selon ces résultats, on voit que pour un même facteur de purification cible, par exemple pour $FP_{C5Q/MS} = 4$, la combinaison NP 1000-12 bar génère moins d'effluents que la combinaison GE 1000-12 bar, tout en récupérant davantage de C5Q à la fin de la filtration ($\gamma_{C5Q} = 45\%$ contre 29% pour la GE 1000). De plus, le couple NP 1000-12 bar permet une concentration du C5Q légèrement supérieure par rapport au couple GE 1000-12 bar. Ainsi, la combinaison GE 1000-12 bar est moins intéressante pour une application industrielle que la combinaison NP 1000-12 bar. Cette dernière pourrait être potentiellement utilisée pour la purification des acides chlorogéniques dans l'extrait de pulpe clarifié.

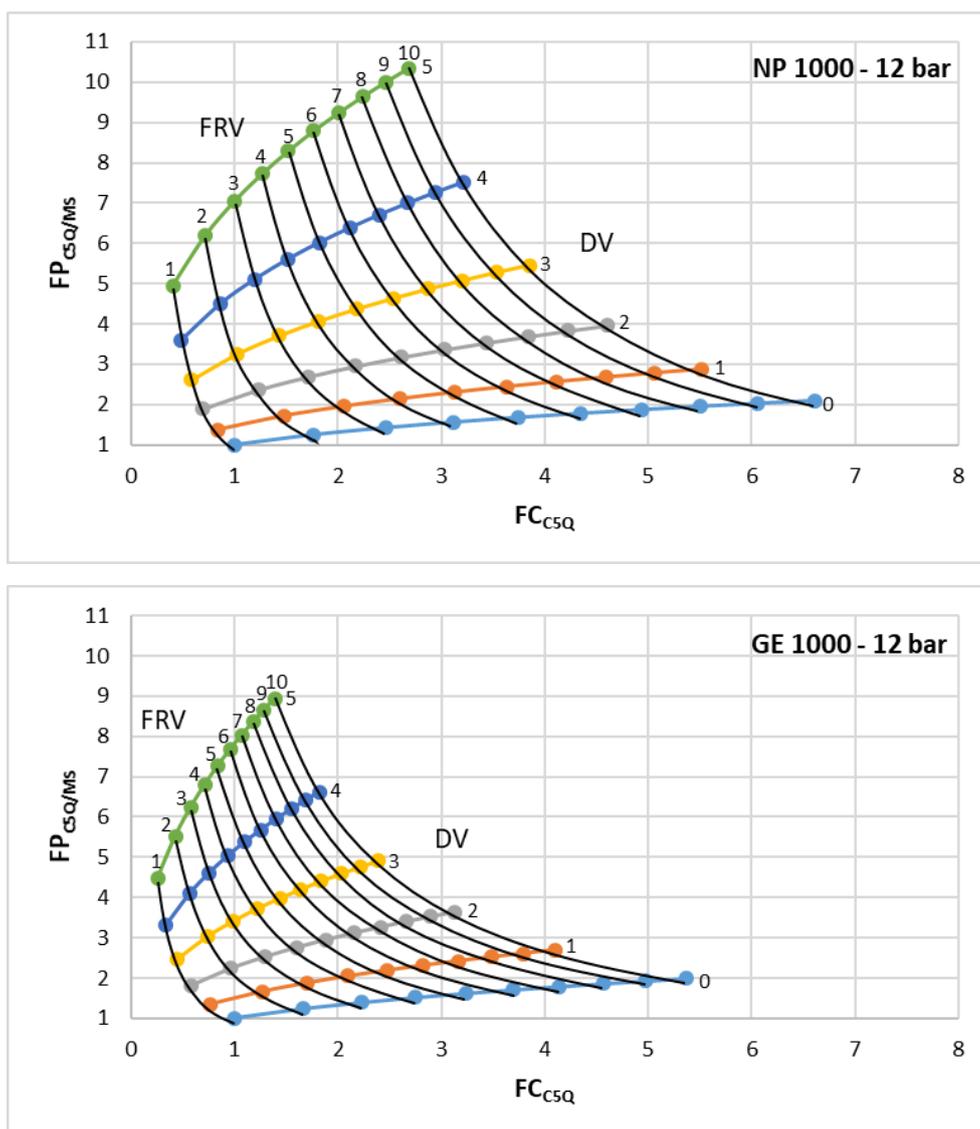


Figure 5. Plage de facteurs de concentration (FC_{C5Q}) et de facteurs de purification ($FP_{C5Q/MS}$) obtenus par simulation pour les 2 couples membrane-pression sélectionnés pour la purification des acides chlorogéniques par nanofiltration (FRV facteur de réduction volumique, DV diavolume).

Tableau 4. Comparaison par simulation des 2 couples membrane-pression choisis pour la purification de C5Q, à 3 facteurs de purification cibles ($FP_{C5Q/MS}$), en termes de consommation d'eau (Ea), de génération d'effluents (Ef), du rendement de récupération de C5Q (γ_{C5Q}) et du facteur de concentration obtenu (FC_{C5Q}). Simulations réalisées pour des FRV entiers ≤ 10 et des DV entiers ≤ 5 .

Membrane - PTM	$FP_{C5Q/MS}$	DV	FRV	Ea	Ef	γ_{C5Q}	FC_{C5Q}
NP 1000 - 12 bar	2	1	3	1	3	0,69	2,1
	4	3	4	3	6	0,45	1,8
	6	4	5	4	8	0,36	1,8
GE 1000 - 12 bar	2	1	4	1	4	0,52	2,1
	4	3	5	3	7	0,29	1,4
	6	4	7	4	10	0,20	1,4

En terme de perspectives, il reste encore à valider ces données au niveau expérimental pour confirmer les résultats obtenus par simulation. Les performances du procédé peuvent aussi, à priori, être améliorées d'un point de vue de la purification du C5Q par rapport aux autres solutés et en rendement de récupération du C5Q, qui reste encore faible pour des facteurs de purification supérieurs à 2, et en termes de consommations d'eau pendant la diafiltration, compte tenu des grands volumes d'extrait de pulpe à traiter à l'échelle industrielle. D'autres combinaisons membrane-PTM doivent être testées afin d'optimiser le procédé en vue d'une application industrielle. Enfin, la faisabilité du procédé doit être confirmée par une évaluation économique, ce qui ne sera possible qu'avec des résultats de nanofiltration en situation réelle de production (FRV croissant à l'échelle industrielle).

3. Conclusion

La combinaison de la microfiltration avec la nanofiltration présente un potentiel intéressant pour le traitement de l'extrait de pulpe afin d'obtenir un extrait plus concentré ou purifié en acides chlorogéniques. L'étape de microfiltration a permis d'éliminer les fractions insoluble et colloïdale tout en conservant la composition en solutés. L'extrait de pulpe clarifié a ensuite été traité par nanofiltration pour séparer les acides chlorogéniques des autres solutés et/ou les

concentrer. La sélection des conditions opératoires pour cette étape a été effectuée à FRV constant en utilisant différentes membranes et pressions transmembranaires. Selon les conditions opératoires utilisées, différentes performances de filtration ont été obtenues, privilégiant soit la concentration de l'extrait, soit la purification des composés d'intérêt par rapport à la matière sèche totale.

Les résultats expérimentaux ont été ensuite utilisés pour simuler la nanofiltration en conditions réelles de production (FVR croissant) afin d'évaluer le potentiel des couples membrane-pression sélectionnés pour une application industrielle. Cette analyse a permis la sélection des couples membrane-pression pour la concentration/purification de l'extrait en prenant en compte les performances de la séparation et l'impact environnemental du procédé. Pour pouvoir confirmer les résultats de simulation, les conditions opératoires sélectionnées doivent être validées expérimentalement pour intégrer les variations de flux et de taux de rétentions en fonction du FRV. Le procédé de nanofiltration peut aussi être optimisé en testant d'autres couples membrane-pression afin d'améliorer le facteur de purification du C5Q par rapport aux autres solutés et pour diminuer les pertes de C5Q pendant la diafiltration. Enfin, la combinaison des membranes de microfiltration et nanofiltration présente un potentiel pour la production, à basse température, d'un extrait de pulpe concentré et/ou prépurifié qui pourra ensuite être traité par d'autres technologies afin d'obtenir un extrait riche en molécules bioactives prêt à être commercialisé (concentration par évaporation sous-vide, cryoconcentration, osmose inverse, chromatographie d'adsorption, etc.). La validation finale du procédé global de séparation en conditions réelles de production et son évaluation économique restent encore toutefois nécessaires pour la détermination de sa faisabilité en vue d'une application industrielle.

5^{ème} partie : intégration des opérations unitaires pour le traitement complet de la pulpe

Au cours de ce travail, nous avons étudié différentes opérations unitaires à savoir la fermentation en milieu solide, le pressurage, la microfiltration tangentielle, l'ultrafiltration et la nanofiltration pour obtenir un extrait contenant des composés à haute valeur ajoutée à partir de la pulpe de café. L'objectif de cette dernière partie est de rechercher et de comparer les associations d'opérations unitaires possibles pour proposer une ligne de production d'extraits de pulpe de café.

1. Introduction

Le Tableau 1 présente la description et le codage des produits et procédés étudiés dans cette partie. La matière-première utilisée correspond à la pulpe de café qui a été récoltée en 2018 au Costa Rica. Compte tenu de la dégradation partielle des acides chlorogéniques pendant le transport et le stockage de la pulpe, nous avons choisi de raisonner sur le lot de pulpe qui a été analysé juste après sa récolte pour mieux représenter la composition d'une pulpe fraîche.

Tableau 1. Nomenclature utilisée pour les produits et opérations unitaires du procédé de traitement de la pulpe.

Nomenclature	Description
Pulpe brute	Pulpe de café obtenue en 2018 au Costa Rica
FS	Fermentation avec stabilisation par sulfite à 0,5% m/m
FA	Fermentation avec stabilisation par acide acétique à 1,0% m/m
Pressurage	Pressurage à 50 bar pendant 30 min (presse hydraulique)
MF	Microfiltration avec membrane T0.2 (à 2,2 bar et 30°C)
NF _{purif}	Nanofiltration avec membrane NP 1000 (à 12 bar et 30°C)
NF _{conc}	Nanofiltration avec membrane DL 300 (à 25 bar et 30°C)
Extrait	Produit obtenu à chaque étape du procédé de séparation

Selon les résultats de l'étude de la fermentation alcoolique (chapitre 3, 2^{ème} partie), deux méthodes de stabilisation des acides chlorogéniques (ACG) sont possibles pour l'étape de fermentation :

1) fermentation avec stabilisation par ajout de sulfite à 0,5 % m/m (FS), qui permet l'obtention d'un extrait 4 fois plus riche en 5-CQA que la pulpe initiale, mais qui contient encore des sucres à cause de l'inhibition des levures par les ions sulfites ;

2) fermentation avec stabilisation par ajout d'acide acétique à 1,0 % m/m (FA), qui permet l'obtention d'un extrait 2 fois plus riche en 5-CQA et qui ne contient presque plus de sucres car la fermentation n'est pas perturbée par l'agent stabilisant.

Le pressurage de la pulpe fermentée produit l'extrait de pulpe qui va ensuite être traité par techniques membranaires. Pour l'étape de séparation par membranes, nous avons étudié la combinaison de la microfiltration soit à l'ultrafiltration (chapitre 3, 3^{ème} partie) soit à la nanofiltration (chapitre 3, 4^{ème} partie). Comme nous l'avons discuté précédemment, l'UF ne permet pas de purifier l'extrait par rapport aux ACG mais contribue au fractionnement de l'extrait par la rétention de molécules colorantes tout en laissant passer les ACG. Puis, l'étude de la NF a montré qu'il était aussi possible de fractionner et/ou de concentrer l'extrait. Ainsi, pour l'étude du procédé global, nous nous sommes focalisés seulement sur la combinaison de la microfiltration à la nanofiltration pour fractionner ou concentrer l'extrait.

Après l'étape de pressurage, l'extrait de pulpe est clarifié par microfiltration avec la membrane TAMI 0,2 µm à 2,2 bar, ce qui correspond aux conditions opératoires optimisées pour l'étape de clarification. L'extrait clarifié est traité ensuite par nanofiltration. Selon les résultats du chapitre précédent, deux couples membrane-PTM sont potentiellement envisageables pour l'étape de nanofiltration : 1) NF avec la membrane NP 1000 à 12 bar, qui est favorable à la purification de l'extrait par rapport à la matière sèche, ou 2) NF avec la membrane DL 300 à 25 bar, qui permet la concentration de l'extrait.

Ainsi, pour envisager les différentes combinaisons possibles pour le traitement complet de la pulpe, les opérations de pressurage et de microfiltration ont été fixées, car les conditions étudiées pour ces procédés sont globalement satisfaisantes. Les opérations de fermentation et de nanofiltration ont par contre été modulées pour étudier les différentes applications possibles. Par conséquent, quatre combinaisons seront étudiées dans cette partie :

- **FS-NF_{purif}** : fermentation avec stabilisation par sulfite et NF pour la purification de l'extrait final,
- **FA-NF_{purif}** : fermentation avec stabilisation par acide acétique et NF pour la purification de l'extrait final,
- **FS-NF_{conc}** : fermentation avec stabilisation par sulfite et NF pour la concentration de l'extrait final,
- **FA-NF_{conc}** : fermentation avec stabilisation par acide acétique et NF pour la concentration de l'extrait final.

2. Résultats et discussion

Pour évaluer l'impact des différentes combinaisons sur la qualité final du produit et sur l'impact environnemental du procédé global, nous nous sommes basés sur les données expérimentales obtenues au cours des différents essais réalisés aux échelles laboratoire et semi-industrielle, et sur les résultats de performances de nanofiltration obtenus par simulation. Ces données peuvent être retrouvées dans les parties suivantes :

- composition de la pulpe brute : tableau 1 du chapitre 3, 2^{ème} partie,
- fermentation avec stabilisation par sulfite : figure 4 du chapitre 3, 2^{ème} partie,
- fermentation avec acide acétique : figure 4 du chapitre 3, 2^{ème} partie,
- pressurage : tableau 3 du chapitre 3, 1^{ère} partie,
- microfiltration : tableau 2 du chapitre 3, 3^{ème} partie,
- nanofiltration : figure 3 et résultats de la simulation du chapitre 3, 4^{ème} partie.

Il est important de noter que les performances des étapes de pressurage et de séparation par membranes n'ont été étudiées expérimentalement que pour la fermentation avec stabilisation par sulfite. Les performances pour ces étapes dans le cas de la fermentation avec stabilisation par acide acétique resteront à valider expérimentalement.

Afin de comparer les différentes combinaisons, les hypothèses suivantes ont été retenues :

- a – les pertes de masse pendant la fermentation sont négligeables (le dégagement de CO₂ est négligeable d'après les observations expérimentales),
- b – les bilans matières sont respectés pour toutes les étapes du procédé de traitement,

- c – les taux de rétention peuvent être considérés comme constants pendant la MF et la NF,
- d – dans les installations de filtration, le système est considéré comme un réacteur infiniment mélangé,
- e – Les performances du pressurage et de filtration sont les mêmes pour les 2 types de pulpe fermentée.

Les différents calculs se basent sur des bilans matières qui sont réalisés pour chaque combinaison sur la base de 100 kg de pulpe de café brute. Les figures 1 à 4 présentent les quatre variantes étudiées et les bilans matière correspondant à une microfiltration jusqu'à un FRV 10 et à une nanofiltration jusqu'à un FRV 5. Au niveau de la nanofiltration, la diafiltration est utilisée pour la purification de l'extrait clarifié ($DV = 3$), alors que pour la concentration de l'extrait clarifié, la diafiltration n'est pas nécessaire ($DV = 0$). La pureté de l'extrait et le gain en pureté sont calculés selon les équations 5 et 6 du chapitre Matériels et Méthodes, respectivement. Enfin, les teneurs en C5Q et en sucres sont utilisées pour caractériser la fraction soluble des différents produits et sous-produits du procédé. Comme la caféine n'a pas été suivie pendant les essais de séparation par membranes, sa rétention pendant les étapes de MF et NF n'a pas pu être déterminée.

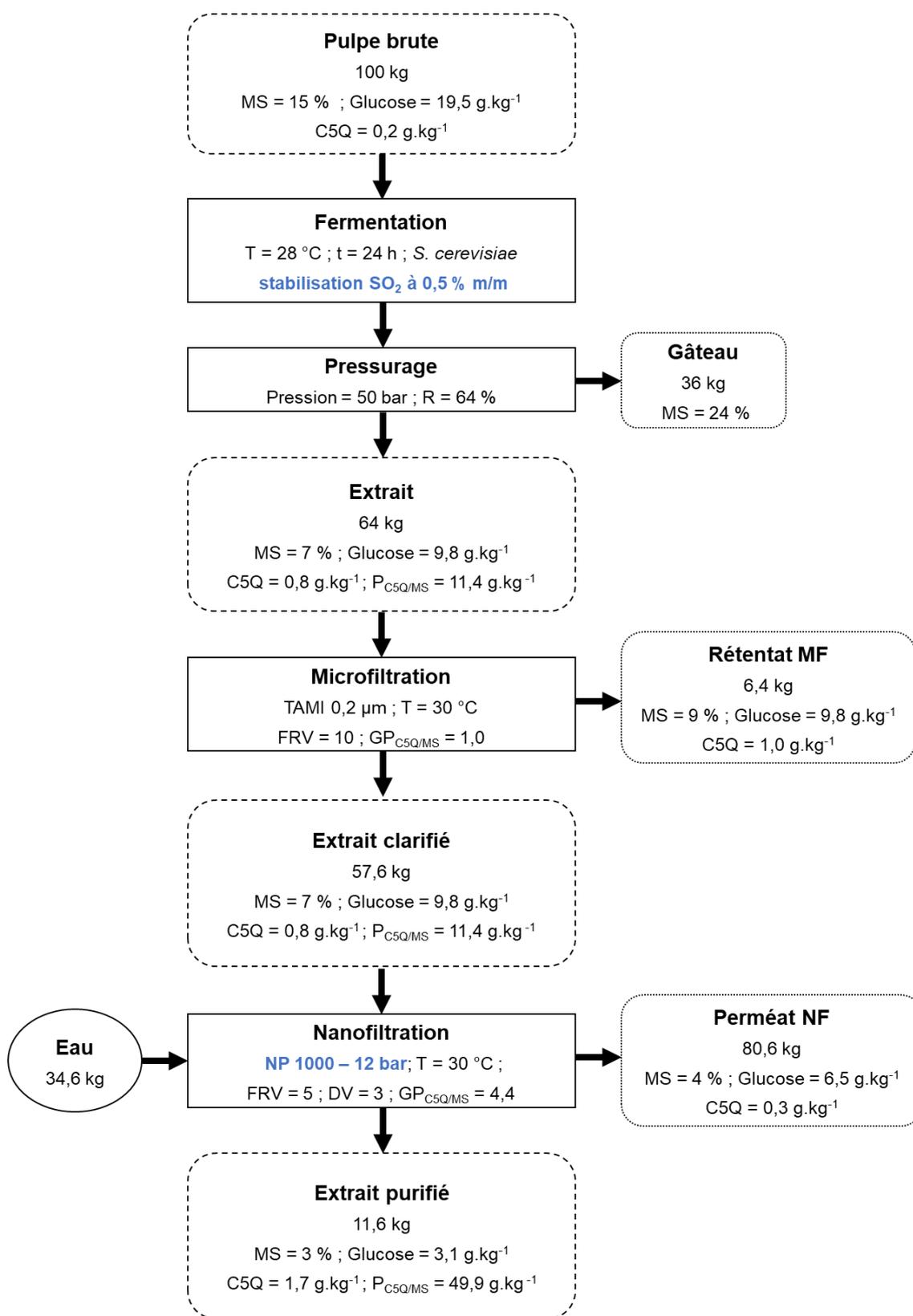


Figure 1. Combinaison des procédés de fermentation avec stabilisation par sulfite et de nanofiltration pour la purification de l'extrait (FS-NF_{purif}) sur la base de 100 kg de pulpe brute (MS matière-sèche ; C5Q acide 5-caféoyl quinique libre ; R rendement de pressurage ; P pureté ; GP gain en pureté).

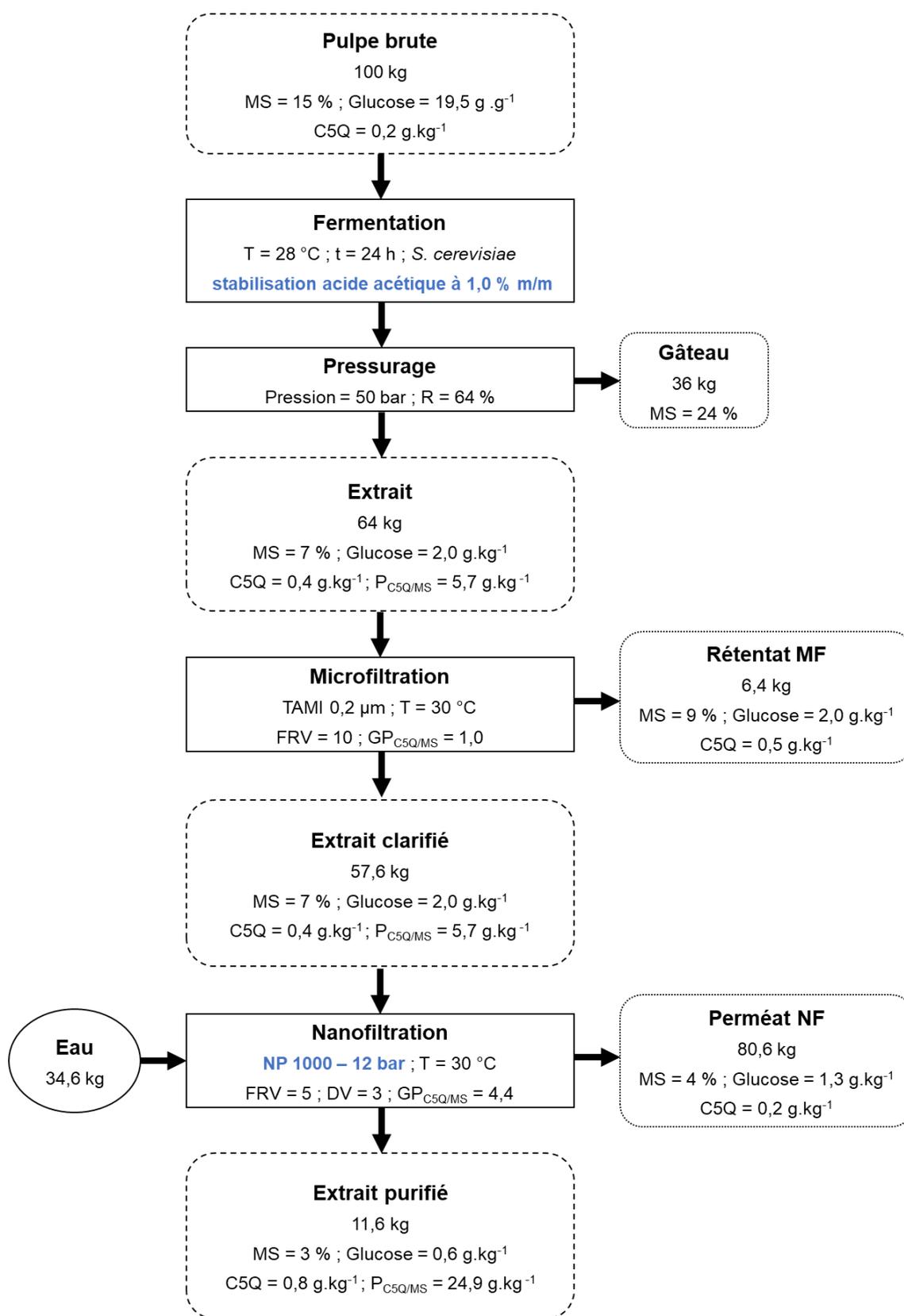


Figure 2. Combinaison des procédés de fermentation avec stabilisation par acide acétique et de nanofiltration pour la purification de l'extrait (FA-NF_{purif}) sur la base de 100 kg de pulpe brute (MS matière-sèche ; C5Q acide 5-caféoyl quinique libre ; R rendement de pressurage ; P pureté ; GP gain en pureté).

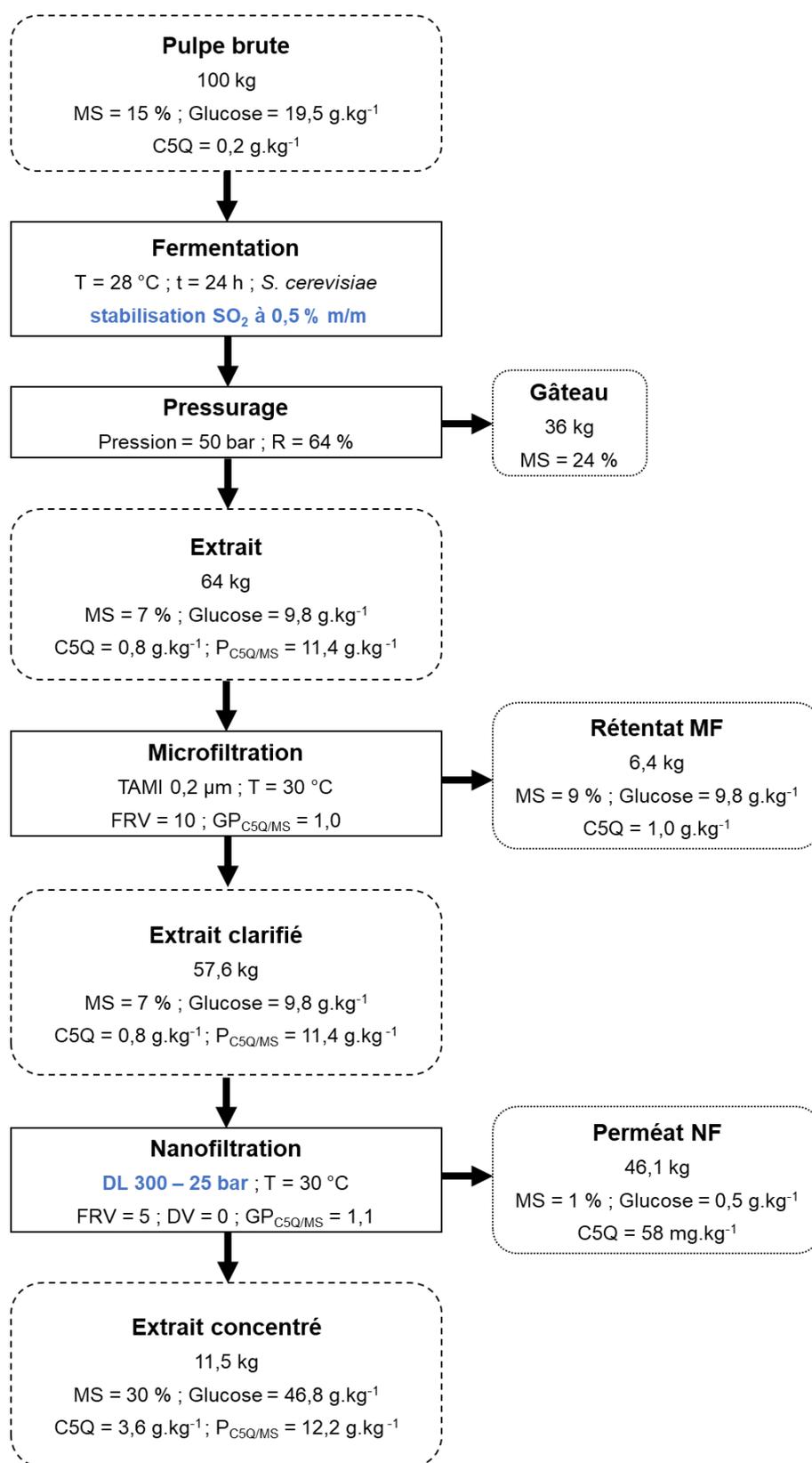


Figure 3. Combinaison des procédés de fermentation avec stabilisation par sulfite et de nanofiltration pour la concentration de l'extrait (FS-NF_{conc}) sur la base de 100 kg de pulpe brute (MS matière-sèche ; C5Q acide 5-cafféoyl quinique libre ; R rendement de pressurage ; P pureté ; GP gain en pureté).

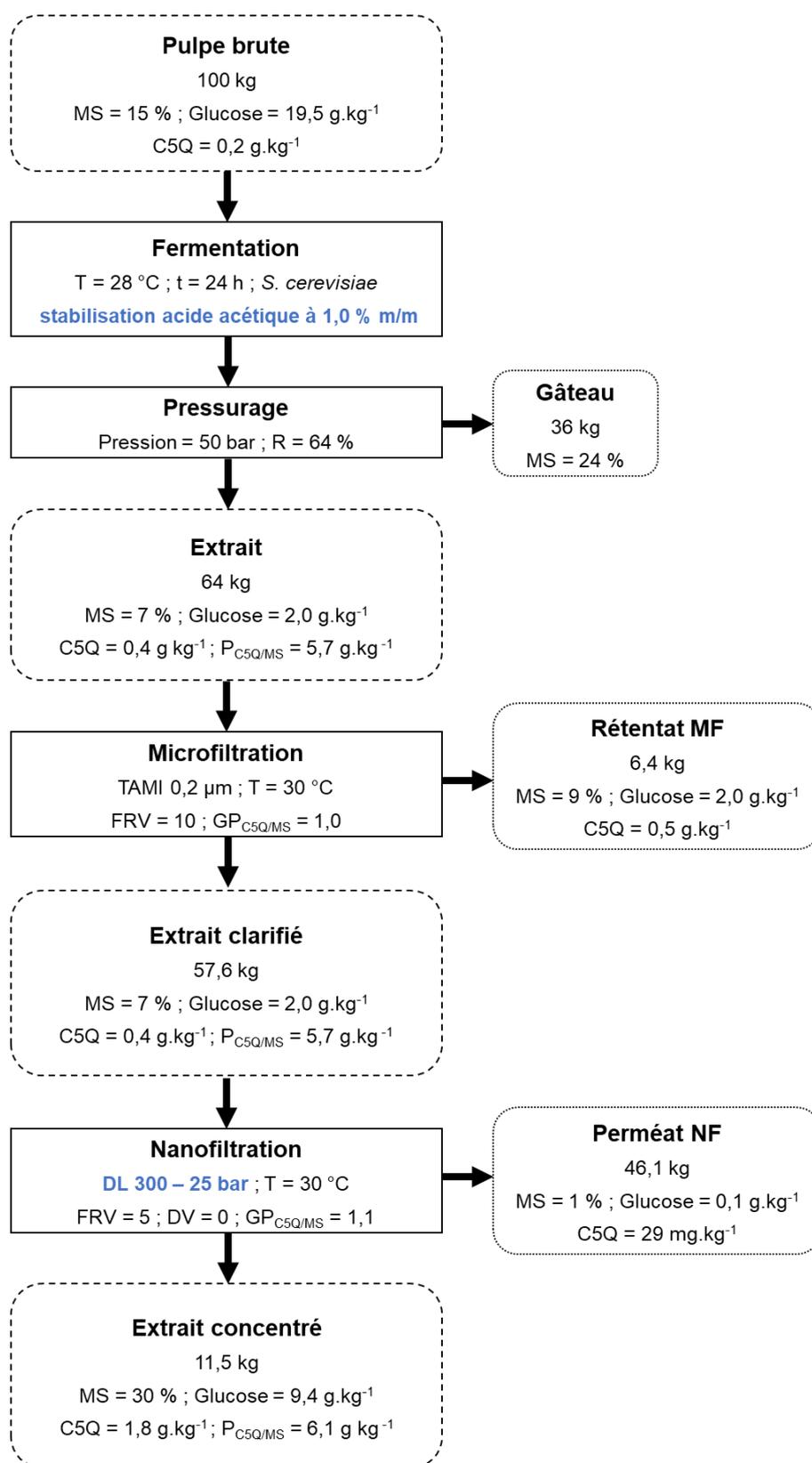


Figure 4. Combinaison des procédés de fermentation avec stabilisation par acide acétique et de nanofiltration pour la concentration de l'extrait (FA-NF_{conc}) sur la base de 100 kg de pulpe brute (MS matière-sèche ; C5Q acide 5-cafféoyl quinique libre ; R rendement de pressurage ; P pureté ; GP gain en pureté).

Le Tableau 2 présente les principales caractéristiques des extraits finaux et la consommation d'eau selon la combinaison d'opérations unitaires utilisée. A l'analyse de ces données, nous constatons, comme attendu, que l'extrait FS- NF_{purif} est 2 fois plus concentré en C5Q que l'extrait FA- NF_{purif} mais surtout que cet extrait est également deux fois plus pur par rapport à la MS. Le coût des étapes ultérieures de purification de l'extrait devrait être réduit. De plus comme les quantités finales en sucres restent très faibles quel que soit l'agent stabilisant utilisé lors de la fermentation (teneurs en sucres totaux inférieures à 10 % pour les fermentations FS et FA), le choix de la combinaison FS- NF_{purif} est le plus intéressant.

Tableau 2. Caractéristiques des extraits finaux sur la base de 100 kg de pulpe brute et consommation d'eau pendant l'étape de la nanofiltration.

	FS-NF _{purif}	FA-NF _{purif}	FS-NF _{conc}	FA-NF _{conc}
Extrait final [kg]	11,5	11,5	11,5	11,5
MS [g kg ⁻¹]	34	34	298	298
C5Q [g kg ⁻¹]	1,70	0,85	3,66	1,83
Pureté [g C5Q/kg MS]	50	25	12	6
Gain en pureté (C5Q/MS) ^a	4,4	4,4	1,1	1,1
Taux récupération C5Q ^a	0,38	0,38	0,83	0,83
Glucose [g kg ⁻¹]	3,1	0,6	46,8	9,4
Fructose [g kg ⁻¹]	6,0	2,6	96,1	41,2
Consommation d'eau [kg kg ⁻¹] ^b	0,35	0,35	0,00	0,00

a = valeurs pour l'étape de séparation par membranes (MF et NF)

b = valeur en kg d'eau par kg de pulpe brute

La teneur en sucres de la pulpe à l'issue de l'étape de fermentation a néanmoins un impact plus important sur la qualité finale du produit lors de la concentration des extraits. En effet, comme les sucres sont concentrés avec le C5Q pendant l'étape de nanofiltration, la fermentation stabilisée au sulfite (FS) conduit à un extrait 3 à 5 fois plus concentré en sucres que celle stabilisée à l'acide acétique (FA). Après une fermentation FS, la teneur en C5Q de l'extrait final est deux fois plus élevée mais il contient beaucoup plus de sucres résiduels. Dans ce cas, il est donc plus difficile de préconiser une des options de fermentation par rapport à l'autre. La fermentation FS privilégie la teneur en C5Q. La fermentation FA permet d'obtenir un extrait moins riche en C5Q mais contenant moins de sucres, qui peuvent être potentiellement gênants

pour des étapes de purification ultérieures. En outre, une stabilisation de la pulpe par l'acide acétique pose moins de contraintes d'application de par son caractère plus écologique et alimentaire que le sulfite. Notons que, dans tous les cas, si l'utilisation des sulfites est retenue, il sera vraiment important de chercher à diminuer la dose de sulfites mise en œuvre pour en limiter l'impact environnemental.

L'analyse de l'étape de nanofiltration montre que la concentration de l'extrait (NF_{conc}) permet une récupération de C5Q supérieure à 80 %, tandis que seulement 38 % sont récupérés pendant la purification de l'extrait (NF_{purif}). Cette perte importante en C5Q pendant la NF_{purif} est liée à la faible différence de rétention entre le C5Q et la MS ($\Delta R = 32\%$) pour le couple membrane-pression sélectionné. Par conséquent, pendant la diafiltration, ce n'est pas seulement la matière sèche qui est perdue mais aussi une bonne partie des acides chlorogéniques. Pour arriver à améliorer ce taux de récupération de C5Q, de nouveaux couples membrane-pression doivent être testés afin de trouver une meilleure séparation entre le C5Q et la MS.

La Figure 5 présente la distribution de la quantité de C5Q libre récupérée à partir de la pulpe fermentée dans les différents produits et les sous-produits du procédé (calculs via bilan matière). Nous pouvons observer que l'étape de nanofiltration est discriminante dans la récupération du C5Q, car la fraction de C5Q qui se perd pendant le pressurage (36 % dans le gâteau) et la microfiltration (8 % dans le rétentat) est la même quel que soit la combinaison utilisée. En effet, le perméat de NF_{purif} contient environ 32 % du C5Q total, alors que cette fraction est de seulement 3 % pour le perméat de la NF_{conc} . Cela nous montre que pour améliorer la récupération du C5Q dans l'extrait final, une grande partie des efforts doit être consacrée à l'optimisation de l'étape de purification.

Le choix de la combinaison des opérations unitaires pour le traitement de la pulpe de café n'est pas une tâche facile car plusieurs critères parfois contradictoires doivent être simultanément pris en compte : qualité finale du produit, performances de récupération et impact environnemental. Au niveau de la qualité du produit final, il est essentiel de considérer la teneur en C5Q, la pureté de l'extrait et également la teneur en sucres qui pourra être déterminante selon l'application envisagée pour le produit. Un extrait plus riche en sucres pourra, par exemple, être plus difficile à purifier, ou peut rendre les opérations de purification ultérieures plus coûteuses. L'impact environnemental du procédé doit aussi être considéré, compte tenu des grandes quantités de pulpe à traiter.

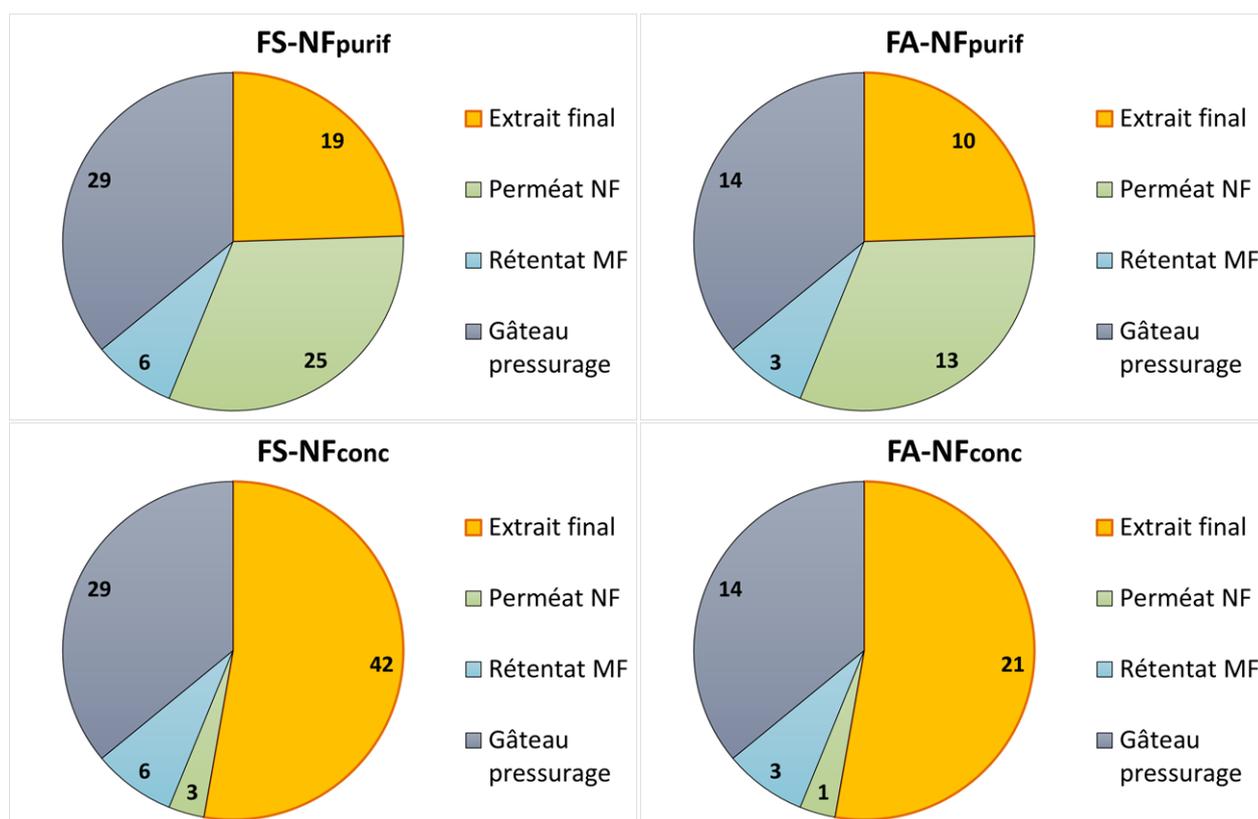


Figure 5. Profils de distribution du C5Q de la pulpe fermentée dans les différents extraits obtenus et sous-produits générés par le procédé (g C5Q/100 kg de pulpe brute).

La Figure 6 permet de synthétiser l'impact de chaque combinaison sur la qualité finale de l'extrait de pulpe. Cette représentation met bien en évidence le compromis à trouver entre la teneur en C5Q et la pureté de l'extrait. Les extraits qui sont obtenus par NF_{conc} sont évidemment plus riches en C5Q, mais sont aussi plus riches en MS et en sucres. Les extraits obtenus par NF_{purif} sont beaucoup plus purs en C5Q par rapport à la MS, mais contiennent beaucoup moins de C5Q. Dans tous les cas, nous observons que les extraits obtenus par FS présentent une qualité finale supérieure à ceux obtenus par FA, ce qui confirme notre choix initial de stabilisation de la pulpe par sulfitage pendant la fermentation pour obtenir un extrait plus riche en acides chlorogéniques.

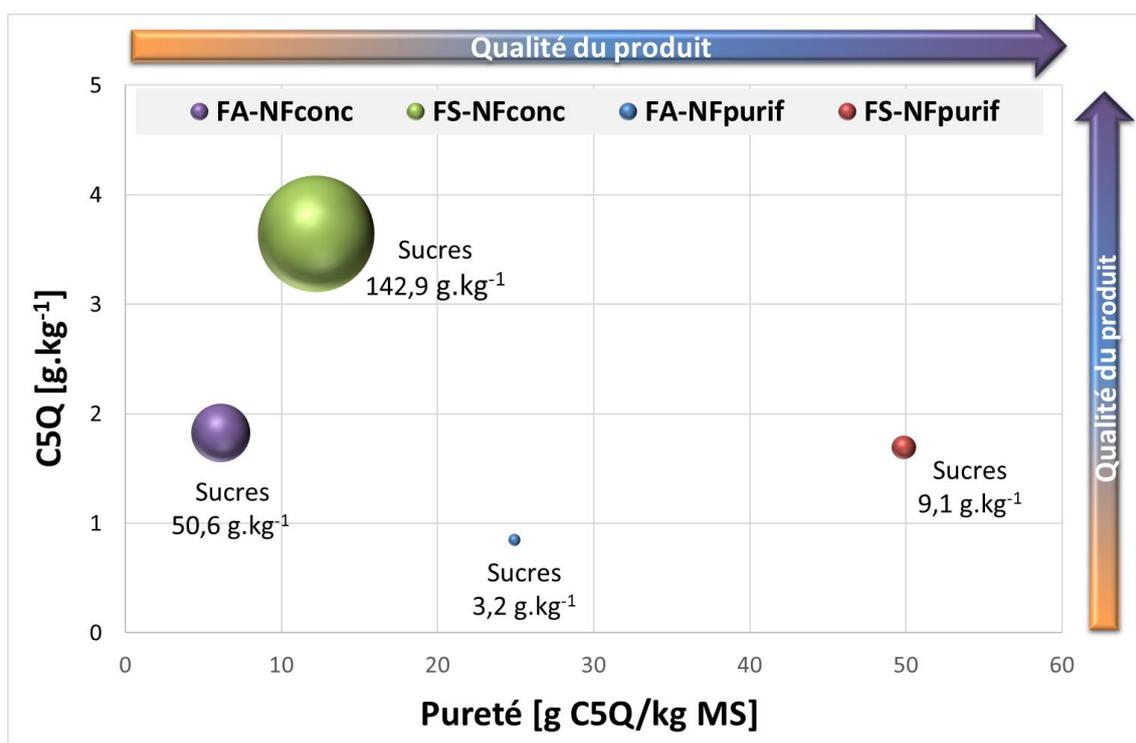


Figure 6. Qualité des extraits finaux obtenus en termes de teneur en C5Q, de pureté du C5Q par rapport à la matière sèche et de teneur en sucres (taille des bulles proportionnelle à la concentration en sucres indiquée en dessous).

La Figure 7 regroupe les indicateurs d'impact environnemental du procédé : la quantité totale de déchets générés et leur teneur globale en C5Q, composé représentatif des polyphénols qui sont considérés comme écotoxiques. Les procédés qui utilisent la diafiltration (NF_{purif}) génèrent 40 % de déchets en plus que les procédés de NF_{conc}. Cette différence correspond à la masse d'eau utilisée pendant la diafiltration pour purifier l'extrait. Comme la fermentation avec stabilisation par sulfite produit une pulpe deux fois plus concentrée en C5Q que la voie de stabilisation par acide acétique, les déchets issus des procédés associés à la FS ont une teneur deux fois plus grande en C5Q. Ils sont donc plus écotoxiques que ceux de la FA. En combinant ces deux indicateurs, la teneur en C5Q et la masse totale de déchets, on voit que la combinaison FS-NF_{purif} présente un plus grand impact environnemental que les autres procédés, et que la combinaison FA-NF_{conc} est la moins polluante.

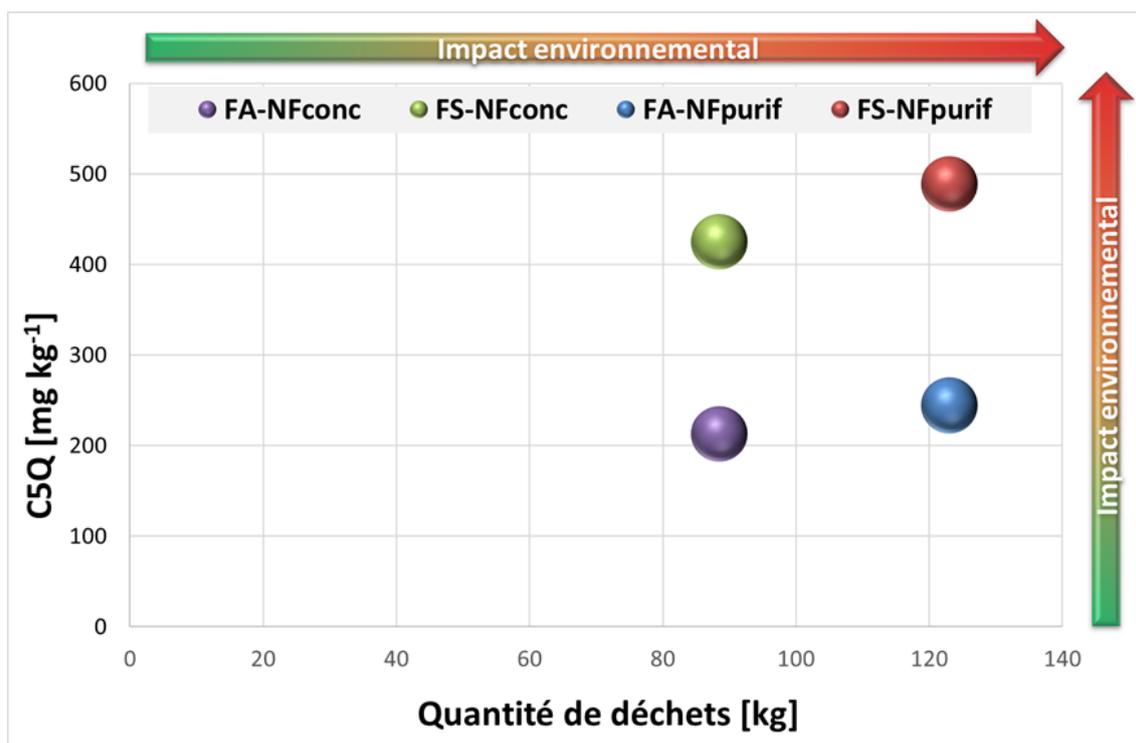


Figure 7. Impact environnemental des différentes combinaisons étudiées en termes de quantité totale de déchets générés et de teneur totale en C5Q des déchets.

Tous ces résultats montrent que les étapes de fermentation et de stabilisation de l'extrait fermenté sont déterminantes pour la qualité finale du produit en termes de teneur en acides chlorogéniques. L'étape de nanofiltration est déterminante pour la récupération en C5Q et pour l'impact environnemental de la ligne de production (consommation d'eau plus importante dans le cas d'une diafiltration). En considérant l'ensemble de ces observations, la combinaison FS-NF_{conc} nous paraît la plus intéressante actuellement pour le traitement de la pulpe de café car elle conduit à l'extrait le plus riche en C5Q (3,64 g.kg⁻¹) sans consommer d'eau.

La validation expérimentale intégrant toutes les étapes du procédé n'a pu être finalisée dans cette étude par manque de temps et de disponibilité de la quantité de pulpe brute de café. Toutefois, la recherche et la comparaison de différentes combinaisons possibles d'opérations unitaires a permis de mieux visualiser la filière de traitement globale et surtout a révélé une voie de traitement à prioriser pour la valorisation de la pulpe de café.

3. Conclusion

Dans cette dernière partie, nous avons abordé différentes associations d'opérations unitaires possibles pour le procédé de traitement de la pulpe de café afin d'obtenir un extrait enrichi en acides chlorogéniques (ACG). Quatre variantes intégrant les étapes de fermentation, pressurage, microfiltration et nanofiltration ont été comparées en termes de qualité finale de l'extrait de pulpe, de performances de récupération et d'impact environnemental. Pour l'étape de fermentation, deux méthodes de stabilisation des ACG ont été étudiées. La stabilisation par sulfite à 0,5 % m/m a permis la production d'extraits deux fois plus riches en C5Q que la méthode de stabilisation par acide acétique à 1,0 % m/m. Cette dernière présente toutefois l'avantage de produire des extraits contenant moins de sucres tout en utilisant un agent stabilisant plus écologique. L'étape de nanofiltration présente aussi deux possibilités d'application, soit une concentration de l'extrait (DL 300 à 25 bar), soit une purification (NP 1000 à 12 bar).

Cette évaluation nous a permis de choisir une combinaison de procédés à prioriser pour la continuation de l'étude du traitement complet de la pulpe de café. Ce procédé doit intégrer l'étape de fermentation avec une stabilisation par sulfite à 0,5% m/m et l'étape de nanofiltration avec la membrane DL 300 à 25 bar pour concentrer un extrait plus riche en C5Q sans ajout d'eau. La voie de la purification de l'extrait reste encore à optimiser. Le suivi de la caféine pendant le procédé complet de traitement reste à étudier pour compléter les informations sur l'écotoxicité des sous-produits et sur les taux de récupérations dans l'extrait de pulpe, étant donné que ce composé peut aussi être valorisé industriellement. Enfin, Il reste à valider expérimentalement la combinaison retenue à une échelle de production industrielle en intégrant toutes les étapes du procédé afin de confirmer les résultats présentés dans cette partie.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Ce travail de recherche mené entre deux pays, la France et le Costa Rica, avait pour objectif l'étude de la faisabilité des techniques d'extraction et de séparation membranaire pour le traitement durable de la pulpe de café afin de valoriser ce co-produit du café vert en tant que source de molécules à haute valeur ajoutée. Au cours de ces trois années de recherche, différents points du projet ont pu être abordés: 1) mise au point des outils analytiques de caractérisation de la pulpe et des extraits ; 2) évaluation de la variabilité de la composition de la pulpe de café sur 3 saisons de production ; 3) stabilisation de la fraction phénolique de la pulpe de café et des extraits de pulpe ; 4) mise au point à l'échelle laboratoire d'une première étape d'extraction permettant d'obtenir un extrait enrichi en acides chlorogéniques (ACG) et validation à l'échelle semi-industrielle ; 5) étude de l'étape de clarification par microfiltration et validation à l'échelle semi-industrielle ; 6) étude à l'échelle du laboratoire de l'ultrafiltration et de la nanofiltration pour la séparation ou la concentration des composés d'intérêt ; 7) évaluation et comparaison de différents schémas de fractionnement pour pré-concentrer ou purifier les ACG ; 8) caractérisation des différents extraits et co-produits obtenus.

La caractérisation de la matière première nous a permis de mieux identifier les composés d'intérêt présents dans la pulpe (acides hydroxycinnamiques et caféine) et de mettre en évidence la variabilité de la composition de la pulpe. Les résultats ont montré qu'une partie importante des acides hydroxycinnamiques (AH) se trouvent sous forme insoluble, d'où l'intérêt de l'étape d'extraction pour solubiliser ces composés dans l'extrait de la pulpe. Concernant la fraction libre, les AH sont principalement des acides chlorogéniques, l'acide 5-caféoylquinique (C5Q) étant le principal composé présent dans la pulpe.

Nous avons abordé l'étude de 5 opérations unitaires pour le traitement de la pulpe : la fermentation alcoolique pour l'extraction des composés d'intérêt de la matrice végétale, le pressurage de la pulpe fermentée pour l'obtention de l'extrait de la pulpe, la microfiltration tangentielle pour la clarification de l'extrait, l'ultrafiltration pour le fractionnement de l'extrait et la nanofiltration pour la concentration/purification de l'extrait final.

L'étude de l'étape d'extraction a permis de sélectionner la fermentation alcoolique pour extraire les AH liés aux parois cellulaires de la pulpe. Après optimisation du mode de conduite, ce prétraitement permet de multiplier par 2 à 4 la concentration des composés d'intérêt dans

l'extrait aqueux final. Cet effet s'explique à la fois par la production d'éthanol qui favorise la solubilisation des polyphénols mais aussi probablement par l'action d'enzymes fongiques qui vont favoriser la libération de ces composés dans la phase liquide. La voie fermentaire permet également de purifier partiellement l'extrait par consommation des sucres. L'ajout de plusieurs additifs a été testé en fin de fermentation afin de stabiliser les extraits (acide ascorbique, acide acétique, sulfites). Les sulfites ont conduit de façon répétable à de bons résultats. L'acide acétique semble également présenter un bon potentiel mais son efficacité est très sensible à la dose mise en œuvre.

Le pressurage de la pulpe fermentée a permis l'obtention de l'extrait de pulpe. La pression d'extraction optimale de pressurage est de 50 bar. Ce procédé combiné avec le prétraitement de la pulpe par voie fermentative, a permis de diminuer la masse de résidus solides produite par 3 et de diminuer de moitié la charge en caféine de ce déchet. Ainsi, le procédé proposé permet non seulement de diminuer la quantité de déchet à traiter mais également d'en diminuer l'écotoxicité. Son utilisation en alimentation animale ou en amendement après compostage reste toutefois à être validée.

Après production d'un extrait brut optimisé, des essais de microfiltration tangentielle sur membranes tubulaires céramiques ont été réalisés. Ces essais, conduits à l'échelle du laboratoire, ont permis de choisir les conditions optimales de traitement en considérant à la fois les densités de flux de filtration (performances), la rétention des composés d'intérêt (à minimiser) et celle des autres constituants qui sont considérés comme des impuretés (à maximiser). Les résultats confirment l'intérêt de la microfiltration pour éliminer totalement la fraction insoluble contenue dans l'extrait mais aussi pour diminuer la concentration en certains composés solubles indésirables, notamment les composés colorés.

Plusieurs schémas de fractionnement ont été envisagés en se focalisant sur des enchaînements de procédés baromembranaires. Après avoir éliminé la fraction insoluble par microfiltration, il s'agissait de séparer les acides hydroxycinnamiques des autres solutés présents dans le mélange en mettant à profit principalement leur différence de masse molaire. Plusieurs configurations associant des étapes d'ultrafiltration et de nanofiltration ont ainsi été testées en balayant une large gamme de seuils de coupure (0,3 à 50 kDa).

Dans le cas de l'ultrafiltration, les résultats obtenus montrent que, pour les seuils de coupure les plus élevés, les performances sont satisfaisantes. Toutefois, à partir des indicateurs

biochimiques et physicochimiques utilisés, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence la purification des acides hydroxycinnamiques. Pour les seuils de coupure les plus faibles, l'ultrafiltration permet de réduire considérablement la couleur de l'extrait mais les faibles flux de perméat obtenus remettent en cause l'intérêt économique de l'opération. Au final, l'intérêt d'introduire une étape d'ultrafiltration dans la cascade de séparation n'est donc pas démontré.

En ce qui concerne la nanofiltration, les diverses configurations testées montrent qu'il est possible, en jouant sur les conditions opératoires, soit de purifier les composés d'intérêt par rapport à l'extrait sec soluble, soit de les concentrer sans introduire de distorsion de composition. Par contre, aucune des configurations testées n'a permis de purifier les acides hydroxycinnamiques par rapport aux polyphénols totaux.

Au final, le travail réalisé montre qu'un procédé de séparation combinant, à l'étape de fermentation avec stabilisation par sulfite, une étape de microfiltration et une étape de nanofiltration, présente un bon potentiel pour pré-concentrer les composés cibles ou les purifier par rapport aux autres solutés présents. Faute de temps et de matériel adapté au Costa Rica, la validation du procédé intégrant toutes les étapes de traitement à plus grande échelle n'a pu être réalisée. Cette étape reste toutefois indispensable pour conclure quant à la faisabilité industrielle du procédé et à sa faisabilité économique.

Suite à ce travail exploratoire, diverses perspectives peuvent être proposées au niveau du procédé lui-même, mais aussi autour de la valorisation de l'extrait enrichi en ACG et de l'utilisation des coproduits résiduels générés.

Des essais de validation sont nécessaires afin de compléter ce travail. Tout d'abord, l'étape de nanofiltration doit être validée en mode concentration pour confirmer les prévisions obtenues par simulation à partir des résultats à FRV constant. Un travail important d'optimisation reste également à conduire sur les opérations de fermentation et de nanofiltration. Les résultats obtenus pour l'étape de microfiltration étant déjà satisfaisants, il n'apparaît pas pertinent d'y consacrer des efforts de recherche supplémentaires. Ensuite, le procédé complet de traitement proposé (de la fermentation alcoolique jusqu'à la nanofiltration) doit être validé sur un même lot de pulpe pour les deux voies d'applications possibles : la production d'un extrait concentré (FS-NF_{conc}) et la production d'un extrait purifié (FS-NF_{purif}).

Concernant l'optimisation de la fermentation alcoolique, le travail pourra se focaliser, 1) sur la recherche de nouvelles souches levuriennes plus performantes pour améliorer la consommation des sucres et augmenter la teneur en ACG libres et, 2) sur l'optimisation de la dose de sulfite ou d'acide acétique à apporter (valeur minimale à trouver pour assurer une stabilisation chimique efficace des ACG).

En nanofiltration, un travail important doit être entrepris sur la recherche des conditions opératoires (PTM, vitesse tangentielle, température, FRV, DV et membrane) visant à optimiser en particulier les taux de récupération des ACG et les densités de flux de perméat, afin d'assurer la rentabilité du procédé (qualité de l'extrait améliorée, coûts d'investissement réduits). Concernant la concentration de l'extrait, la membrane DL 300 présente déjà des rétentions élevées. Le travail doit donc se focaliser sur l'amélioration de la densité de flux. Pour la purification de l'extrait, en plus du travail d'amélioration des taux de rétention et du flux, il sera important de rechercher des conditions opératoires qui permettent une meilleure séparation des ACG via l'augmentation de la différence de rétention (ΔR) entre ces composés et la matière sèche totale.

Un travail complémentaire doit également être envisagé autour de l'extrait enrichi final. Une étude de marché est notamment indispensable afin de mieux appréhender les besoins des industriels en termes de qualité finale de l'extrait. Cette étape permettra de définir plus précisément les caractéristiques souhaitées pour l'extrait final (concentration, pureté, teneurs des composés bioactifs, couleur, etc.) selon l'application envisagée. Elle sera très utile pour définir le cahier des charge des produits en fonction des applications potentielles, comme par exemple, l'utilisation en tant qu'additif alimentaire (propriété antioxydante des ACG), en tant qu'additif pour les produits cosmétiques (propriétés antioxydantes des ACG et lipolytiques de la caféine), en synthèse chimique, hémisynthèse ou chimie verte comme molécule plateforme ou synthon (une alternative durable aux dérivés de pétrole) pour la production de composés organiques (hémisynthèse de la vanilline par exemple).

Notons à ce niveau qu'il est fort probable qu'il faille concentrer davantage les ACG dans l'extrait avant utilisation. Il faudra dans ce cas envisager de rajouter au procédé soit une étape d'évaporation sous-vide (concentration de l'ensemble des solutés) soit une étape de séparation par chromatographie d'adsorption (concentration et purification des polyphénols).

Une fois que tous ces points auront été traités et le procédé complet validé en conditions réelles de production, il sera indispensable d'évaluer la faisabilité économique du système en termes de coûts d'investissement et de fonctionnement, et d'impact environnemental.

Enfin, il paraît important de s'intéresser davantage aux co-produits issus du procédé. Une fois que le procédé de traitement de la pulpe sera complètement défini, un travail détaillé de caractérisation physico-chimique des sous-produits générés sera nécessaire afin de trouver des voies d'utilisation ou de recyclage. A l'heure actuelle, quelques voies de valorisation potentielles ont d'ores et déjà été identifiées pour les sous-produits issus des cascades d'opérations unitaires présentées dans le chapitre de résultats et discussion (5^{ème} partie).

Plusieurs pistes d'utilisation du gâteau de pressurage semblent pertinentes. Quatre thématiques mériteraient notamment d'être approfondies : 1) étude de sa compostabilité pour une application en amendement des cultures ; 2) étude de sa qualité nutritionnelle et de ses propriétés anti- nutritionnelles (polyphénols et caféine) pour une application en alimentation animale ; 3) étude de son utilisation comme combustible après séchage solaire (voie bioénergie) ; 4) étude de son utilisation pour la production de bio-huiles ou de charbon actif par pyrolyse flash (voie biomasse).

En ce qui concerne les effluents liquides générés à chaque étape, le rétentat de microfiltration pourrait être mélangé au gâteau de pressurage pour une valorisation commune. En effet, ce premier effluent est produit en quantités relativement faibles (64 g.kg⁻¹ pulpe brute), sa teneur en matière insoluble n'est pas négligeable et il présente de faibles teneurs en caféine et composés phénoliques. Compte tenu de sa faible charge organique, notamment dans le cas de la concentration de l'extrait avec la membrane DL 300, le perméat de nanofiltration pourrait quant à lui, être recyclé, au moins en partie, au niveau du procédé de dépulpage des cerises de café. Ce recyclage permettrait de faire des économies substantielles d'eau et ainsi de diminuer la consommation d'eau des unités de production de café vert par voie humide actuellement très élevée, jusqu'à 23 m³ d'eau par tonne de cerises de café traitées (Chanakya, 2004).

Finalement, cette étude ambitieuse a pu apporter les principaux éléments visant à évaluer la faisabilité technique d'un nouveau procédé relativement simple à mettre en œuvre qui combine une extraction par fermentation à différentes techniques membranaires pour obtenir un extrait enrichi en acides phénols. Ce travail a permis en outre de développer des contacts avec les producteurs de café et un équipementier en technologies membranaires, et a ainsi contribué à

la prise de conscience par les professionnels, 1) des problèmes environnementaux liés à la transformation du café, 2) de la possibilité de valoriser la pulpe, d'y apporter de la valeur ajoutée, tout en ouvrant de nouvelles perspectives d'application des procédés de séparation membranaire.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Acosta, O., Vaillant, F., Pérez, A.M., Dornier, M., 2017. Concentration of polyphenolic compounds in blackberry (*Rubus adenotrichos* Schltdl.) juice by nanofiltration. *J. Food Process Eng.* 40, 2211-2216.
2. Acosta, O., Vaillant, F., Pérez, A.M., Dornier, M., 2014. Potential of ultrafiltration for separation and purification of ellagitannins in blackberry (*Rubus adenotrichus* Schltdl.) juice. *Sep. Purif. Technol.* 125, 120–125.
3. Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldívar, S.O., 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chem.* 152, 46–55.
4. Adachi, O., Ano, Y., Akakabe, Y., Shinagawa, E., Matsushita, K., 2008. Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 143–151.
5. Akbas, M.Y., Stark, B.C., 2016. Recent trends in bioethanol production from food processing byproducts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1593-1609.
6. Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claisse, A., Duchiron, F., 2011. Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review. *Process Biochem.* 46, 1525–1537.
7. Amalia Cabrera Núñez, Iliana Del Carmen Daniel Rentería, Miguel Ángel Lammoglia Villagómez, Pablo Elorza Martínez, César Enrique Martínez Sánchez, Sara Aida Alarcón Pulido, Rebeca Rojas-Ronquillo, 2015. The Use of Coffee Pulp as a Potential Alternative Supplement in Ruminant Diets. *J. Agric. Sci. Technol. A* 5, 214-217.
8. Ameça, G.M., Cerrilla, M.E.O., Córdoba, P.Z., Cruz, A.D., Hernández, M.S., Haro, J.H., 2018. Chemical composition and antioxidant capacity of coffee pulp. *Ciênc. E Agrotecnologia* 42, 307–313.
9. Aranda, E., Duran, L., Escamilla, E., 2009. Vermicomposting in coffee cultivation. *Coffee: growing, processing, sustainable production. A guidebook for growers, processors, traders and researchers.* Wiley-VCH 28–342.
10. Arellano-González, M.A., Ramírez-Coronel, M.A., Torres-Mancera, M., Pérez-Morales, G.G., Saucedo-Castañeda, G., others, 2011. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 374–378.
11. Arya, M., Rao, L.J.M., 2007. An Impression of Coffee Carbohydrates. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 51–67.
12. Asther, Michèle, Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., Labat, M., Asther, Marcel, 2002. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* 38, 685–691.
13. Augur, C., Gutierrez-Sanchez, G., Ramirez-Coronel, A., Contreras-Dominguez, M., Perraud-Gaime, I., 2006. Analysis of Antiphenological Components of Coffee Pulp.
14. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* 117, 426–436.
15. Baker, R.W., 2000. *Membrane technology and applications*, McGraw-Hill professional engineering. McGraw-Hill, New York.

16. Benoit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.-C., Asther, Marcel, Asther, Michèle, 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.* 341, 1820-1827.
17. Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Perricone, M., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M., Corbo, M.R., 2018. Nonthermal Technologies for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: Overview and Advances: Nonthermal for juices and beverages. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 2–62.
18. Bhattacharjee, C., Saxena, V.K., Dutta, S., 2017. Fruit juice processing using membrane technology: A review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 43, 136–153.
19. Blouin, J., 2014. *Le SO₂ en oenologie*. Dunod : Ed. La Vigne, Paris.
20. Braham, J.E., Bressani, R., 1979. Coffee Pulp - Composition, Technology and Utilization. *Inst. Nutr. Cent. Am. Panama* 96.
21. Brand, D., Pandey, A., Roussos, S., Soccol, C.R., 2000. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 127–133.
22. Cassano, A., Cabri, W., Mombelli, G., Peterlongo, F., Giorno, L., 2016. Recovery of bioactive compounds from artichoke brines by nanofiltration. *Food Bioprod. Process.* 98, 257–265.
23. Cassano, A., Conidi, C., Drioli, E., 2011. Comparison of the performance of UF membranes in olive mill wastewaters treatment. *Water Res.* 45, 3197–3204.
24. Cassano, A., Conidi, C., Giorno, L., Drioli, E., 2013. Fractionation of olive mill wastewaters by membrane separation techniques. *J. Hazard. Mater.* 248–249, 185–193.
25. Cassano, A., Conidi, C., Ruby-Figueroa, R., Castro-Muñoz, R., 2018. Nanofiltration and Tight Ultrafiltration Membranes for the Recovery of Polyphenols from Agro-Food By-Products. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 351.
26. Cassano, A., De Luca, G., Conidi, C., Drioli, E., 2017. Effect of polyphenols-membrane interactions on the performance of membrane-based processes. A review. *Coord. Chem. Rev.* 351, 45-75.
27. Castro-Muñoz, R., Fíla, V., 2018. Membrane-based technologies as an emerging tool for separating high-added-value compounds from natural products. *Trends Food Sci. Technol.* 82, 8–20.
28. Castro-Muñoz, R., Yáñez-Fernández, J., 2015. Valorization of Nixtamalization wastewaters (Nejayote) by integrated membrane process. *Food Bioprod. Process.* 95, 7–18.
29. Castro-Muñoz, R., Yáñez-Fernández, J., Fíla, V., 2016. Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: An overview. *Food Chem.* 213, 753–762.
30. Chanakya, H.N., 2004. Environmental issues and management in primary coffee processing. *Process Safety and Environmental Protection* 82, 291-300.
31. Charcosset, C., 2012. Principles on membrane and membrane processes. *Membrane Processes in Biotechnology and Pharmaceuticals*. 1-30.
32. Chemat, F., 2011. *Eco-extraction du végétal. Procédés innovants et solvants alternatifs*. Dunod, Paris.
33. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., Abert-Vian, M., 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms,

- techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. Sonochem.* 34, 540–560.
34. Chen, Y., Jimmy Yu, Q., Li, X., Luo, Y., Liu, H., 2007. Extraction and HPLC Characterization of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals. *Sep. Sci. Technol.* 42, 3481–3492.
 35. Cisse, M., 2010. Couplage de procédés membranaires pour la production d'extraits anthocyaniques : application à l'hibiscus sabdariffa.
 36. Cisse, M., Vaillant, F., Pallet, D., Dornier, M., 2011. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Res. Int.* 44, 2607–2614.
 37. Clifford, M.N., Ramirez-Martinez, J.R., 1991a. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chem.* 40, 35–42.
 38. Clifford, M.N., Ramirez-Martinez, J.R., 1991b. Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chem.* 40, 191–200.
 39. Conidi, C., Cassano, A., Drioli, E., 2012. Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. *Food Bioprod. Process.* 90, 867–874.
 40. Conidi, C., Cassano, A., Drioli, E., 2011. A membrane-based study for the recovery of polyphenols from bergamot juice. *J. Membr. Sci.* 375, 182–190.
 41. Conidi, C., Drioli, E., Cassano, A., 2018. Membrane-based agro-food production processes for polyphenol separation, purification and concentration. *Curr. Opin. Food Sci.* 23,
 42. Conidi, C., Rodriguez-Lopez, A.D., Garcia-Castello, E.M., Cassano, A., 2015. Purification of artichoke polyphenols by using membrane filtration and polymeric resins. *Sep. Purif. Technol.* 144, 153–161.
 43. Da Silveira, J.S., Durand, N., Lacour, S., Belleville, M.-P., Perez, A., Loiseau, G., Dornier, M., 2019. Solid-state fermentation as a sustainable method for coffee pulp treatment and production of an extract rich in chlorogenic acids. *Food Bioprod. Process.* 115, 175–184.
 44. De Colmenares, N.G., Ramírez-Martínez, J.R., Aldana, J.O., Clifford, M.N., 1994. Analysis of proanthocyanidins in coffee pulp. *J. Sci. Food Agric.* 65, 157–162.
 45. Dey, T.B., Chakraborty, S., Jain, K.Kr., Sharma, A., Kuhad, R.C., 2016. Antioxidant phenolics and their microbial production by submerged and solid state fermentation process: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 53, 60-74.
 46. Di Gioia, D., Luziatelli, F., Negroni, A., Ficca, A.G., Fava, F., Ruzzi, M., 2011. Metabolic engineering of *Pseudomonas fluorescens* for the production of vanillin from ferulic acid. *J. Biotechnol.* 156, 309-316.
 47. Díaz-Reinoso, B., González-López, N., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2010. Recovery of antioxidants from industrial waste liquors using membranes and polymeric resins. *J. Food Eng.* 96, 127–133.
 48. Díaz-Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2009. Ultra- and nanofiltration of aqueous extracts from distilled fermented grape pomace. *J. Food Eng.* 91, 587–593.
 49. Dornier, M., Belleville, M.-P., Vaillant, F., 2018a. Membrane Technologies for Fruit Juice Processing, in: Rosenthal, A., Deliza, R., Welti-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V. (Eds.), *Fruit Preservation*. Springer New York, New York, NY, pp. 211–248.

50. Dornier, M., Belleville, M.-P., Vaillant, F., 2018b. Membrane Technologies for Fruit Juice Processing, in: Rosenthal, A., Deliza, R., Welte-Chanes, J., Barbosa-Cánovas, G.V. (Eds.), *Fruit Preservation*. Springer New York, New York, NY, pp. 211–248.
51. Duangjai, A., Suphrom, N., Wungrath, J., Ontawong, A., Nuengchamnong, N., Yosboonruang, A., 2016. Comparison of antioxidant, antimicrobial activities and chemical profiles of three coffee (*Coffea arabica* L.) pulp aqueous extracts. *Integr. Med. Res.* 5, 324–331.
52. Esquivel, P., Jiménez, V.M., 2012. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* 46, 488–495.
53. Fan, L., Soccol, A.T., Pandey, A., Soccol, C.R., 2003. Cultivation of *Pleurotus* mushrooms on Brazilian coffee husk and effects of caffeine and tannic acid. *Micología Aplicada Internacional*. 15.
54. Farah, A., Donangelo, C.M., 2006. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 23–36.
55. Farinas, C.S., 2015. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 179–188.
56. Fazary, A.E., Ju, Y.-H., 2007. Feruloyl Esterases as Biotechnological Tools: Current and Future Perspectives. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39, 811–828.
57. Friedman, M., Jürgens, H.S., 2000. Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, 2101–2110.
58. Galanakis, C.M., 2013. Emerging technologies for the production of nutraceuticals from agricultural by-products: A viewpoint of opportunities and challenges. *Food Bioprod. Process.* 91, 575–579.
59. Galanakis, C.M., Markouli, E., Gekas, V., 2013. Recovery and fractionation of different phenolic classes from winery sludge using ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol.* 107, 245–251.
60. Galanakis, C.M., Tornberg, E., Gekas, V., 2010. Clarification of high-added value products from olive mill wastewater. *J. Food Eng.* 99, 190–197.
61. Gwenzi, W., Chaukura, N., 2018. Organic contaminants in African aquatic systems: Current knowledge, health risks, and future research directions. *Sci. Total Environ.* 619–620, 1493–1514.
62. Habert, A.C., 2006. *Processos de separação por membranas*. E-papers, Rio de Janeiro.
63. Heeger, A., Kosińska-Cagnazzo, A., Cantergiani, E., Andlauer, W., 2016. Bioactives of coffee cherry pulp and its utilisation for production of Cascara beverage. *Food Chem.* 221, 969–975.
64. ICO, 2019. . Int. Coffee Organ. URL <http://www.ico.org> (consulté le 29/04/2019).
65. ICO, 2017. . Int. Coffee Organ. URL <http://www.ico.org> (consulté le 14/08/2017).
66. Janissen, B., Huynh, T., 2018. Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 128, 110–117.
67. Juliastuti, S.R., Widjaja, T., Altway, A., Sari, V.A., Arista, D., Iswanto, T., 2018. The effects of microorganism on coffee pulp pretreatment as a source of biogas production. *MATEC Web Conf.* 156, 03010.

68. Kennedy, J.A., Jones, G.P., 2001. Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1740–1746.
69. Kivaisi, A.K., Assefa, B., Hashim, S.O., Mshandete, A.M., 2010. Sustainable utilization of agro-industrial wastes through integration of bio-energy and mushroom production. International Livestock Research Institute (ILRI).
70. Kumar, S., Pandey, A.K., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013, 1–16.
71. Landbo, A.K., Meyer, A.S., 2001. Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *J. Agric. Food Chem.* 49, 3169–3177.
72. Leão, C., Sousa, M.J., Ludovico, P., Côrte-Real, M., Silva, M.T., 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology* 147, 2409–2415.
73. Liang, N., Kitts, D., 2015. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. *Nutrients* 8, 16.
74. Ma, Y.-C., Wang, X.-Q., Hou, F., Ma, J., Luo, M., Chen, A., Jin, P., Lu, S., Xu, I., 2011. Rapid resolution liquid chromatography (RRLC) analysis and studies on the stability of Shuang-Huang-Lian preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54, 265–272.
75. Machado, C.M.M., Soccol, C.R., de Oliveira, B.H., Pandey, A., 2002. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102–103, 179–191.
76. Machado, E.M.S., Rodriguez-Jasso, R.M., Teixeira, J.A., Mussatto, S.I., 2012. Growth of fungal strains on coffee industry residues with removal of polyphenolic compounds. *Biochem. Eng. J.* 60, 87–90.
77. Magoni, C., Bruni, I., Guzzetti, L., Dell’Agli, M., Sangiovanni, E., Piazza, S., Regonesi, M.E., Maldini, M., Spezzano, R., Caruso, D., Labra, M., 2018. Valorizing coffee pulp by-products as anti-inflammatory ingredient of food supplements acting on IL-8 release. *Food Res. Int.* 112, 129–135.
78. Mäkilä, L., Laaksonen, O., Alanne, A.-L., Kortensniemi, M., Kallio, H., Yang, B., 2016. Stability of Hydroxycinnamic Acid Derivatives, Flavonol Glycosides, and Anthocyanins in Black Currant Juice. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4584–4598.
79. Marques, V., Farah, A., 2009. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chem.* 113, 1370–1376.
80. Martínez, J.R., Clifford, M.N., 2000. Coffee Pulp Polyphenols: An Overview, in: *Coffee Biotechnology and Quality*. Springer, pp. 507–515.
81. Martins, S., Mussatto, S.I., Martínez-Avila, G., Montañez-Saenz, J., Aguilar, C.N., Teixeira, J.A., 2011. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnol. Adv.* 29, 365–373.
82. Mata, G., Hernandez, D.M.M., Andreu, L.G.I., 2005. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 143–150.
83. MaxiCoffee, 2019. URL <https://www.maxicoffee.com/blog/l-abece-daire-du-cafe-f-comme-fruit-du-cafeier/> (consulté le 15/08/2019)

84. Mazaauric, J.-P., Salmon, J.-M., 2005. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5647–5653.
85. Mazzafera, P., 2002. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Sci. Agric.* 59, 815–821.
86. Medeiros, A.B.P., Christen, P., Roussos, S., Gern, J.C., Soccol, C.R., 2003. Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Braz. J. Microbiol.* 34, 245–248.
87. Mohammad, A.W., Teow, Y.H., Ang, W.L., Chung, Y.T., Oatley-Radcliffe, D.L., Hilal, N., 2015. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. *Desalination* 356, 226–254.
88. Moon, J.-K., Yoo, H.S., Shibamoto, T., 2009. Role of Roasting Conditions in the Level of Chlorogenic Acid Content in Coffee Beans: Correlation with Coffee Acidity. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5365–5369.
89. Moreno, J., Sonia Cozzano, S., Mercedes Pérez, A., Arcia, P., Curutchet, A. 2019. Coffee Pulp Waste as a Functional Ingredient: Effect on Salty Cookies Quality, *J. Food and Nutrition Research* 7(9), 632-638.
90. Mortada, M., Ezzedine, M., Berri, F., Zein Eddine, I., Naoufal, D., 2005. Evaluation de la toxicité de la caféine par les cultures organotypique et cellulaire in-vitro. *Damascus University Journal for Basic Sciences.* 21. 51-65.
91. Mudimu, O.A., Peters, M., Brauner, F., Braun, G., 2012. Overview of Membrane Processes for the Recovery of Polyphenols from Olive Mill Wastewater. *Am. J. Environ. Sci.* 8, 195–201.
92. Murthy, P.S., Madhava Naidu, M., 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition—A review. *Resour. Conserv. Recycl.* 66, 45–58.
93. Murthy, P.S., Madhava Naidu, M.M., 2010. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food Bioprocess Technol.* 5, 897–903.
94. Murthy, P.S., Naidu, M.M., 2012. Production and Application of Xylanase from *Penicillium* sp. Utilizing Coffee By-products. *Food Bioprocess Technol.* 5, 657–664.
95. Musisi, A., 2009. Fuel from waste fires up Uganda. *Approp. Technol.* 36, 33–35.
96. Naczka, M., Shahidi, F., 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chromatogr. A* 1054, 95–111.
97. Narita, Y., Inouye, K., 2013. Degradation Kinetics of Chlorogenic Acid at Various pH Values and Effects of Ascorbic Acid and Epigallocatechin Gallate on Its Stability under Alkaline Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 61, 966–972.
98. Nava, I., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G., 2011. Effect of Mixing on the Solid-State Fermentation of Coffee Pulp with *Aspergillus tamaris*. *Food Technology and Biotechnology.* 49.
99. Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G.S., Kakuda, Y., 2006. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Sep. Purif. Technol.* 48, 176–181.
100. Nikolić, S., Mojović, L., Rakin, M., Pejin, D., Pejin, J., 2010. Ultrasound-assisted production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation of corn meal. *Food Chem.* 122, 216–222.

101. Palmieri, M.G.S., Cruz, L.T., Bertges, F.S., Húngaro, H.M., Batista, L.R., da Silva, S.S., Fonseca, M.J.V., Rodarte, M.P., Vilela, F.M.P., Amaral, M. da P.H. do, 2018. Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 16, 43–48.
102. Palomino García, L.R., Biasetto, C.R., Araujo, A.R., Bianchi, V.L.D., 2015. Enhanced extraction of phenolic compounds from coffee industry's residues through solid state fermentation by *Penicillium purpurogenum*. *Food Sci. Technol.* 35, 704–711.
103. Pandey, A., Soccol, C.R., Mitchell, D., 2000a. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35, 1153–1169.
104. Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S., 2000b. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng. J.* 6, 153–162.
105. Paraskeva, C.A., Papadakis, V.G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D.G., Koutsoukos, P.G., 2007. Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. *Desalination, New Water Culture of South East European Countries-AQUA 2005* 213, 218–229.
106. Pérez-Morales, G.G., 2008. Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café. Universidad Autonoma Metropolitana, México, D.F.
107. Pérez-Morales, G.G., Ramírez-Coronel, A., Guzmán-López, O., Cruz-Sosa, F., Perraud-Gaime, I., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G., 2011. Feruloyl esterase activity from coffee pulp in solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 352.
108. Perraud-Gaime, I., 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bacteries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decafeination de la pulpe de cafe.
109. Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S., 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 579–590.
110. Pinto de Abreu, F.A., 2012. Etude d'un procédé intégrant la microfiltration tangentielle pour la production d'extraits concentrés en caroténoïdes à partir de pomme de cajou.
111. Pleissner, D., Neu, A.-K., Mehlmann, K., Schneider, R., Puerta-Quintero, G.I., Venus, J., 2016. Fermentative lactic acid production from coffee pulp hydrolysate using *Bacillus coagulans* at laboratory and pilot scales. *Bioresour. Technol.* 218, 167–173.
112. Prudêncio, A.P.A., Prudêncio, E.S., Amboni, R.D.M.C., Murakami, A.N.N., Maraschin, M., Petrus, J.C.C., Ogliari, P.J., Leite, R.S., 2012. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. *Food Bioprod. Process.* 90, 399–405.
113. Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu, L., 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* 50, 586–621.
114. Rahmanian, N., Jafari, S.M., Galanakis, C.M., 2014. Recovery and Removal of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91, 1–18.
115. Ramirez-Coronel, M.A., Marnet, N., Kolli, V.S.K., Roussos, S., Guyot, S., Augur, C., 2004. Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolysis–High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1344–1349.

116. Ramirez-Martinez, J.R., 1988. Phenolic Compounds in Coffee Pulp: Quantitative Determination by HPLC. *J Sci Food Agric* 43, 135–144.
117. Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., 2006. *Handbook of Enology, Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications*. Wiley, Chichester (UK).
118. Rios, T.S., Torres, T.S., Cerrilla, M.E.O., Hernández, M.S., Cruz, A.D., Bautista, J.H., Cuéllar, C.N., Huerta, H.V., Rios, T.S., Torres, T.S., Cerrilla, M.E.O., Hernández, M.S., Cruz, A.D., Bautista, J.H., Cuéllar, C.N., Huerta, H.V., 2014. Changes in composition, antioxidant content, and antioxidant capacity of coffee pulp during the ensiling process. *Rev. Bras. Zootec.* 43, 492–498.
119. Robbins, R.J., 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866–2887.
120. Rodríguez-Durán, L.V., 2016. Extracción, purificación y transformación enzimática del ácido clorogénico de la pulpa de café.
121. Rodríguez-Durán, L.V., Ramírez-Coronel, Ma.A., Aranda-Delgado, E., Nampoothiri, K.M., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Saucedo-Castañeda, G., 2014. Soluble and Bound Hydroxycinnamates in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) from Seven Cultivars at Three Ripening Stages. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7869–7876.
122. Roger, P.A., Alazard, D., Garcia, J.-L., Labat, M., Roussos, S., 1999. L'Environnement : une Priorité pour l'Agriculture : Traiter et Recycler les Déchets : Salon International de l'Agriculture, Paris. Les recherches à l'IRD sur la dépollution et la valorisation de déchets agricoles et agro-industriels, in: L'environnement : une priorité pour l'agriculture : traiter et recycler les déchets. IRD, Marseille.
123. Roussos, S., Aquíhuatl, M. de los A., Trejo-Hernández, M. del R., Perraud, I.G., Favela, E., Ramakrishna, M., Raimbault, M., Viniegra-González, G., 1995. Biotechnological management of coffee pulp — isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 756–762.
124. Ruiz Bailon, M., 2018. Traitement physique et catalytique des vapeurs de Pyrolyse Flash : vers une double valorisation matière-énergie. Université de Montpellier.
125. Russo, C., 2007. A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). *J. Membr. Sci.* 288, 239–246.
126. Sadh, P., Kumar, S., Chawla, P., Duhan, J., 2018. Fermentation: A Boon for Production of Bioactive Compounds by Processing of Food Industries Wastes (By-Products). *Molecules* 23, 2560.
127. Sancho, A.I., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C., Williamson, G., Faulds, C.B., 2001. Release of Ferulic Acid from Cereal Residues by Barley Enzymatic Extracts. *J. Cereal Sci.* 34, 173–179.
128. Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2005. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Tec & Doc Lavoisier.
129. Shahidi, F., Chandrasekara, A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* 9, 147–170.
130. Shenoy, D., Pai, A., Vikas, R.K., Neeraja, H.S., Deeksha, J.S., Nayak, C., Rao, C.V., 2011. A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. *Biomass Bioenergy* 35, 4107–4111.

131. Siegfried, R., Justus, A., 2002. Crossflow microfiltration: state of the art. *Sep. Purif. Technol.* 13–19.
132. Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 44, 13–18.
133. Sobal, M., Martinez-Carrera, D., Rio, B., Roussos, S., 2003. Screening of Edible Mushrooms for Polyphenol Degradation and Tannase Production from Coffee Pulp and Coffee Husk, in: Roussos, S., Soccol, C.R., Pandey, A., Augur, C. (Eds.), *New Horizons in Biotechnology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 89–95.
134. Soccol, C.R., Costa, E.S.F. da, Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., Vandenberghe, L.P. de S., 2017. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnol. Res. Innov.* 1, 52–71.
135. Soccol, C.R., Vandenberghe, L.P., 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochem. Eng. J.* 13, 205–218.
136. Soro, D., 2012. Couplage de procédés membranaires pour la clarification et la concentration du jus de pomme de cajou : performances et impacts sur la qualité des produits.
137. Stalikas, C.D., 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268–3295.
138. Tamba, A., Servent, A., Mertz, C., Cissé, M., Dornier, M., 2019. Coupling of pressure-driven membrane technologies for concentrating, purifying and fractionizing betacyanins in cactus pear (*Opuntia dillenii* Haw.) juice. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 52, 244–255.
139. Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A., 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81, 146–161.
140. Tomac, I., Šeruga, M., 2016. Electrochemical Properties of Chlorogenic Acids and Determination of Their Content in Coffee Using Differential Pulse Voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2854–2876.
141. Torres-Mancera, M.T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G., 2013. Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnol. Prog.* 29, 337–345.
142. Torres-Mancera, M.T., Cordova-López, J., Rodríguez-Serrano, G., Roussos, S., Ramírez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G., 2011. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 369.
143. Ulbricht, M., Ansorge, W., Danielzik, I., König, M., Schuster, O., 2009. Fouling in microfiltration of wine: The influence of the membrane polymer on adsorption of polyphenols and polysaccharides. *Sep. Purif. Technol.* 68, 335–342.
144. Ulloa Rojas, J.B., Verreth, J.A.J., Amato, S., Huisman, E.A., 2003. Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresour. Technol.* 89, 267–274.
145. Upadhyay, R., Mohan Rao, L.J., 2013. An Outlook on Chlorogenic Acids—Occurrence, Chemistry, Technology, and Biological Activities. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 968–984.
146. Vaillant, F., Millan, A., Dornier, M., Decloux, M., Reynes, M., 2001. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *J. Food Eng.* 48, 83–90.

147. Vaithanomsat, P., Apiwatanapiwat, W., 2009. Feasibility study on vanillin production from *Jatropha curcas* stem using steam explosion as a pretreatment. *Inter J Chem Biolo Engr* 2, 211–4.
148. van Maris, A.J.A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A.H., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek* 90, 391–418.
149. Varvara, M., Bozzo, G., Disanto, C., Pagliarone, C.N., Celano, G.V., 2016. The use of the ascorbic acid as food additive and technical-legal issues. *Ital. J. Food Saf.* 5.
150. Velissariou, M., Laudano, R., Edwards, P., Stimpson, S., Jeffries, R., 2006. A Beverage Formulation and Method of Making Such Beverage That Is Derived from Extract from Coffee Cherry Husks and Coffee Cherry Pulp. WO2006101807 (A1).
151. Waldron, K. (Ed.), 2007. Handbook of waste management and co-product recovery in food processing. Woodhead, Cambridge.
152. Wang, L., Yang, G., Xing, W., Xu, N., 2008. Mathematic model of the yield for diafiltration processes. *Sep. Purif. Technol.* 59, 206–213.
153. Wianowska, D., Gil, M., 2018. Recent advances in extraction and analysis procedures of natural chlorogenic acids. *Phytochem. Rev.* 18: 273.
154. Woldesenbet, A.G., Woldeyes, B., Chandravanshi, B.S., 2016. Bio-ethanol production from wet coffee processing waste in Ethiopia. *SpringerPlus* 5(1), 1903.
155. Xie, C., Yu, K., Zhong, D., Yuan, T., Ye, F., Jarrell, J.A., Millar, A., Chen, X., 2011. Investigation of Isomeric Transformations of Chlorogenic Acid in Buffers and Biological Matrixes by Ultraperformance Liquid Chromatography Coupled with Hybrid Quadrupole/Ion Mobility/Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11078–11087.
156. Xu, L., Lamb, K., Layton, L., Kumar, A., 2004. A membrane-based process for recovering isoflavones from a waste stream of soy processing. *Food Res. Int.* 37, 867–874.
157. Zheng, H., Hwang, I.-W., Chung, S.-K., 2009. Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10, 912–919.

RESUME

La pulpe de café, déchet problématique en termes de toxicité et de volumes à gérer, contient des molécules d'intérêt industriel reconnu (polyphénols, méthylxanthines). Dans ce contexte, l'objectif du travail était de proposer et d'évaluer la faisabilité d'un nouveau procédé combinant plusieurs opérations unitaires pour 1) extraire/séparer/concentrer les molécules d'intérêt (acides hydroxycinnamiques et caféine) en vue de leur valorisation industrielle ultérieure et 2) éliminer les composés toxiques de la pulpe pour faciliter son recyclage immédiat (alimentation animale, substrats, engrais). Dans un premier temps, la pulpe a été caractérisée puis traitée par fermentation alcoolique afin d'extraire les composés d'intérêt dans la phase soluble. En combinant la fermentation à une stabilisation par sulfite à 0,5 % m/m, il a été possible de multiplier par 4 la teneur en acides chlorogéniques solubles en 24 h à 28 °C. Après pressurage de la pulpe fermentée, le volume de déchets produits est divisé par 3 et le résidu solide obtenu est 2 fois moins chargé en caféine. Le travail s'est ensuite focalisé sur le procédé de fractionnement de l'extrait par techniques membranaires. Son traitement par microfiltration tangentielle sur membranes tubulaires minérales (0,2 µm, 30 °C) a permis de clarifier l'extrait de la pulpe sans altérer sa composition en solutés. Lors de la validation du procédé à l'échelle semi-industrielle, des densités de flux supérieures à 100 L.h⁻¹.m⁻² ont été obtenues à un facteur de réduction volumique de 14. Les tests d'ultrafiltration ont montré qu'il était possible d'éliminer les composés colorés de l'extrait en le traitant sur des membranes de 50 puis 5 kDa. La nanofiltration a rendu possible la séparation des composés d'intérêt par rapport à la matière sèche totale. Selon les conditions opératoires utilisées (seuil de coupure de la membrane 0,2-1 kDa, pression transmembranaire 5-30 bar), la nanofiltration a permis d'obtenir un extrait soit concentré soit purifié. Enfin, différentes combinaisons d'opérations unitaires ont été comparées pour constituer une ligne de production d'extrait de pulpe de café. Le procédé qui associe l'extraction par fermentation alcoolique avec stabilisation par sulfite, une clarification par microfiltration tangentielle et une concentration par nanofiltration est la meilleure voie en terme de qualité de l'extrait final. En vue d'une application industrielle, la validation du procédé complet sur site et son évaluation économique reste encore toutefois indispensable.

Mots clés : Pulpe de café, acides hydroxycinnamiques, caféine, fermentation alcoolique, microfiltration tangentielle, ultrafiltration, nanofiltration.

ABSTRACT

Coffee pulp, a problematic food waste in terms of toxicity and volumes to be stored, contains molecules of high industrial value (polyphenols, methylxanthines). In this context, the purpose of this work was to propose and evaluate the feasibility of a new process combining several unit operations to 1) extract/separate/concentrate molecules of interest (hydroxycinnamic acids and caffeine) for subsequent industrial recovery and 2) remove toxic compounds from the pulp to facilitate its immediate recycling (animal feed, substrates, fertilizers). First, the pulp was characterized and then treated by alcoholic fermentation in order to extract the target compounds into the pulp extract. By combining the fermentation process with the addition of sulfite at 0.5 wt% to stabilize the extract, it was possible to increase the content of soluble chlorogenic acids by 4 in 24 hours at 28°C. After pressing of the fermented pulp, the volume of waste to dispose was reduced by 3 times and the amounts of caffeine in the solid residue were reduced by half. Then, our work was focused on the recovery process using membrane techniques. The treatment by cross-flow microfiltration using mineral tubular membranes (0.2 µm, 30 °C) allowed the clarification of the pulp extract without altering its solute composition. During the validation of the process on a semi-industrial scale, the permeate flux was greater than 100 L.h⁻¹.m⁻² and the volume reduction factor achieved was superior to 14. Ultrafiltration tests showed that it is possible to remove the pigments from the extract by filtering it through 50 kDa and then 5 kDa membranes in sequence. The nanofiltration step made it possible to separate the target compounds from the total dry matter. Depending on the operating conditions for the nanofiltration (membrane cut-off 0.2-1 kDa, transmembrane pressure 5-30 bar), it was possible to either obtain a concentrated extract or a purified extract. Finally, different unit operations combinations were compared with the view to develop a production line of coffee pulp extract. The process that combines extraction by alcoholic fermentation with stabilisation by sulphite, clarification by tangential microfiltration and concentration by nanofiltration is the best option in terms of the quality of the final extract. However, for an industrial application, it is still important to validate the global process and to evaluate its economic feasibility.

Keywords: Coffee pulp, hydroxycinnamic acids, caffeine, alcoholic fermentation, cross-flow microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration.

RESUMO

A polpa de café, resíduo problemático em termos de sua toxicidade e dos volumes a serem armazenados, contém moléculas de alto interesse industrial (polifenóis e metilxantinas). Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi de propor e de avaliar a viabilidade técnica de um novo processo de tratamento da polpa de café que combina diferentes operações unitárias para 1) extrair/separar/concentrar as moléculas de interesse (ácidos hidroxicinâmicos e cafeína) para fins de valorização industrial e 2) remover os compostos tóxicos da polpa a fim de facilitar sua reciclagem imediata (ração animal, substratos, fertilizantes). Numa primeira fase, a polpa foi caracterizada e tratada por um processo de fermentação alcoólica, que tinha por objetivo de solubilizar os compostos de interesse na fase solúvel da polpa. Combinando o processo de fermentação com uma estabilização do extrato da polpa com sulfito à 0,5% em massa, foi possível aumentar o conteúdo de ácidos clorogênicos solúveis em 4 vezes em 24 horas à 28°C. Após a prensagem da polpa fermentada, o volume de resíduos sólidos foi diminuído por 3 e a quantidade de cafeína do resíduo reduzida pela metade. Após esta etapa, o trabalho se focalizou no processo de separação do extrato da polpa por filtração por membranas. A microfiltração tangencial usando membranas tubulares minerais (0,2 µm, 30 °C) permitiu a clarificação completa do extrato sem alterar seus compostos solúveis. Durante a validação do processo em escala semi-industrial, foram obtidas fluxos de permeação superiores à 100 L.h⁻¹.m⁻² e um fator de redução de volume superior à 14. Os testes de ultrafiltração mostraram que é possível remover os pigmentos do extrato usando membranas de 50 e 5 kDa em sequência. A etapa de nanofiltração permitiu a separação dos compostos de interesse da matéria seca total do extrato. Em função das condições operacionais utilizadas (0,2 à 1 kDa, e pressão transmembrana entre 5-30 bar), a etapa de nanofiltração permite ou a concentração do extrato ou sua purificação. Por fim, várias combinações de operações unitárias foram comparadas a fim de formar uma linha de produção de extrato da polpa de café. O processo que combinou a fermentação alcoólica, a estabilização por sulfito, a clarificação por microfiltração tangencial e a concentração por nanofiltração foi a melhor opção de tratamento em termos da qualidade do extrato final. Entretanto, para confirmar o interesse desse processo para uma aplicação industrial, resta validar o processo completo de tratamento da polpa em condições reais de produção e avaliar sua viabilidade econômica.

Palavras-chave: Polpa de café, ácidos hidroxicinâmicos, cafeína, fermentação alcoólica, microfiltração tangencial, ultrafiltração, nanofiltração.