École doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Unité Mixte de Recherche Transfrontalière 1158 BioEcoAgro

THESE DE DOCTORAT

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE – FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Spécialité : Biotechnologies, Agroalimentaires, Sciences De L'aliment, Physiologie

---

Soutenance prévue le 10 novembre 2023 par :

Maxime BEAUDOR

Valorisation en cascade du marc de café via les procédés d'extraction assistée par ultrasons et de fermentation en milieu solide

---

JURY

Pr. Wache Yves	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur – Président
Pr. Ioannou Irina	Professeure, ESA Angers	Rapportrice
Dr. Chatel Gregory	Maître de conférences, Université de Savoie	Examinateur
Pr. Phalip Vincent	Professeur, Université de Lille	Directeur de thèse
Dr. Vauchel Peggy	Maitresse de conférences, Université de Lille	Co-encadrante de thèse
Dr. Pradal Delphine	Enseignante -chercheuse, Icam de Lille	Co-encadrante de thèse
Dr. Aljawish Abdulhadi	Ingénieur R&D de la société Gecco	Invité
Dr. Millares Michel	Président de la société Gecco	Invité

« Sciences sans conscience n’est que ruine de l’âme »

Rabelais

Avant-propos

Ce travail de thèse a pu voir le jour grâce au soutien financier de trois parties prenantes : la Région Hauts-de-France, qui a octroyé une allocation de recherche couvrant 50% des besoins, le programme I-SITE (Initiatives-Science – Innovation – Territoires – Économie), qui a contribué à hauteur de 30%, ainsi qu'un partenaire industriel, Gecco, qui a apporté un financement de 20%. Les travaux de recherche ont été menés au sein de l'Unité Mixte de Recherche Transfrontalière 1158 BioEcoAgro. Cette thèse revêt un caractère pluridisciplinaire, englobant les domaines du génie des procédés, de la biochimie, de la microbiologie et de la biologie moléculaire.

Gecco, dont le siège est à Avelin (59) est une entreprise à vocation sociale et solidaire, qui œuvre depuis 2007 dans la collecte et la valorisation des déchets issus du secteur de la restauration, principalement dans la région des Hauts-de-France. À l'origine spécialisée dans la collecte et la valorisation des huiles de friture en biocarburant, Gecco a élargi ses activités pour englober la collecte et la valorisation des biodéchets provenant des professionnels de la restauration – en lien avec les lois dites de Grenelle II -, les services de nettoyage, les formations, ainsi que la collecte des huiles et graisses usagées des particuliers. L'entreprise, qui compte 30 salariés, a réalisé un chiffre d'affaires de 3,5 millions d'euros en 2021. L'objectif premier de Gecco est d'optimiser la valorisation des coproduits issus de l'industrie de la restauration, notamment le marc de café. À ce jour, l'entreprise a développé une solution innovante consistant à transformer cette ressource en bûches de chauffage Valoflam. Ces bûches sont élaborées à partir d'un mélange de sous-produits de l'industrie du bois, tels que le bois déchiqueté et la sciure, ainsi que du marc de café. La transformation elle-même est effectuée par une entreprise située dans le sud de la ville de Lyon, nommée Ecovalim.

L'Unité Mixte de Recherche transfrontalière BioEcoAgro est une nouvelle structure (2020) qui rassemble environ 450 chercheurs et techniciens de part et d'autre de la frontière franco-belge. Son ambition est de développer un centre d'excellence international dans le domaine de l'ingénierie biologique appliquée à l'agriculture, la biotechnologie, l'agro-alimentaire et

l’environnement. Elle rassemble des chercheurs de INRAE, l’Université de Liège, l’Université de Lille, Junia et l’Université de Picardie Jules Verne. Elle se focalise sur la combinaison d’approches (éco)systémique et moléculaire pour (i) la compréhension du fonctionnement des plantes et des écosystèmes dans des environnements naturels ou contrôlés et dans un contexte de changement climatique, (ii) le décryptage et la maîtrise de la synthèse ou de la bioproduction de biomolécules actives ; (métabolites spécialisés et polymères d’origine végétale, enzymes et métabolites secondaires d’origine microbienne, peptides actifs issus de l’hydrolyse de protéines alimentaires), (iii) la biopréservation et la formulation des aliments.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans un projet de recherche collaboratif qui réunit plusieurs acteurs, notamment des institutions universitaires telles que l'Université de Lille, dont le laboratoire d'accueil fait partie, l'ICAM de Lille et l'ICAM de Nantes, ainsi que des partenaires privés, à l'instar de la société Gecco. L'objectif central de ce projet de recherche est de mettre au point un processus de valorisation en cascade du marc de café, visant à exploiter de manière optimale sa composition et ses propriétés.

Les travaux se sont déroulés sur différents sites. Les procédés de valorisation ont été réalisés au sein du bâtiment Polytech Lille qui héberge une partie des personnels du laboratoire. Les analyses de spectrométrie de masse ont été effectuées sur la plateforme EQUIPEX REALCAT (ANR-11-EQPX-0037) qui est une plateforme de criblage à haut débit dédiée à la catalyse sous toutes ses formes, à savoir la biocatalyse et la catalyse chimique (homogène et hétérogène) ainsi qu'à leurs nouvelles combinaisons (catalyse hybride). D’autres analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées sur CLIC-Imaging, la plateforme de spectrométrie de masse du laboratoire PRISM (INSERM U1192) de l'Université de Lille dont le financement a été assuré par le SIRIC ONCOLille (subvention INCa-DGOS-Inserm 6041), la Région Nord-Pas de Calais (France) et l'Université de Lille.

Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier :

Les **Professeurs Ioannou Irina et Wache Yves**, pour avoir accepté le rôle de rapporteur de mon jury de thèse.

Le Professeur Michel Lopez ainsi que le docteur Gregory Chatel d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examinateurs ainsi que pour avoir suivi mon travail en étant membres de mon comité de suivi de thèse. Les discussions passionnantes que nous avons eues ont ouvert de nouvelles perspectives et ont renforcé ma motivation à poursuivre mes recherches.

Le Professeur Jean Louis Hilbert pour m'avoir accueilli au sein de l'UMRT BioEcoAgro et pour les ressources, les installations et les opportunités que cette institution m'a offertes.

Le Professeur Vincent Phalip, qui m'a permis de me lancer dans ce travail de thèse. Ces trois dernières années, il a dirigé mes travaux de thèse en faisant preuve d'immenses qualités humaines et scientifiques tout en se rendant très disponible. Ses compétences, ses précieuses remarques et sa grande expérience m'ont permis de progresser. Il a toujours pris le temps nécessaire pour partager ses idées tout en me laissant la liberté d'entreprendre mes propres démarches scientifiques.

Les Docteures Peggy Vauchel et Delphine Pradal, co-encadrantes, pour votre entière disponibilité, vos qualités humaines, votre grand soutien et vos conseils qui m'ont porté tout au long de ma thèse et dont je serai toujours reconnaissant.

Michel Milares pour les facilités matérielles et financières qu'il a mises à ma disposition. Mais également **Abdulhadi Aljawish** pour son encadrement, ses conseils et le soutien qu'il m'a montré.

Rénato Froidevaux, Barbara Deracinois, Christophe Flahaut et Tahirimanjaka Andriamanarivo pour votre expérience, votre participation et vos conseils précieux qui ont

permis le bon déroulement de mes travaux de recherche. Merci pour votre bonne humeur et votre sympathie.

Je remercie également tous les membres du personnel de l'UMRT BioEcoAgro qui m'ont aidé de près ou de loin à la bonne réalisation de mes travaux. Merci pour votre sympathie.

Un grand merci à mes collègues de laboratoire Carlos, Angeline, Fatima, Rémi, Aude, Alexandre, Océane, Montassar, Jihenne, Hélorie, Florian, Théo. Votre soutien, votre collaboration et nos échanges fructueux ont créé un environnement stimulant et propice à l'apprentissage. De plus, nous avons partagé de merveilleux moments ensemble, ponctués de rires et de victoires célébrées collectivement. Chaque jour, notre ambiance chaleureuse et notre esprit d'entraide ont transformé notre espace de travail en un lieu où il faisait bon vivre. De nos discussions animées autour de cémantix ou de moments de détente après une journée bien remplie, nous avons cultivé un environnement positif et dynamisant.

Et de manière plus personnelle, je voudrais exprimer ma gratitude envers **mes amis** et **ma famille** pour leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure. Vos encouragements constants, votre compréhension et votre patience ont été d'une importance capitale. Je vous suis extrêmement reconnaissant de m'avoir soutenu dans les moments de doute et d'incertitude, et d'avoir célébré avec moi chaque petit succès. **Christophe**, **Véronique** et **Maureen**, cette thèse m'a permis de prendre conscience de la chance que j'ai de vous avoir auprès de moi.

J'ai une attention particulière pour celle qui a partagé ma vie pendant ces années de thèse, **Dahlia**. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien moral et ton assistance lorsque, parfois, il m'arrivait d'être débordé par les tâches à accomplir. Bien plus qu'une présence, tu as été une épaule sur laquelle j'ai pu m'appuyer au quotidien pour me construire et avancer. **Ta famille**, qui est aussi la mienne aujourd'hui, a su me fournir un environnement propice à la réalisation de cette thèse, et je ne saurai jamais comment exprimer ma gratitude envers eux.

Je n'oublie pas mon grand-père, **Marcel**, qui nous a malheureusement quitté pendant le déroulé de ces travaux de recherche. Un homme que la science n'oubliera pas et qui m'a donné l'envie de me plonger sur cette voie depuis le plus jeune âge. Je porte en moi tes convictions et ton alliance autour du cou.

Résumé

Le café est l'une des boissons les plus populaires à l'échelle mondiale. Entre 2017 et 2022, sa production a augmenté de 2,2% tandis que sa consommation a progressé de 7,7% d'après l'Organisation Internationale du Café. L'unique coproduit solide résultant de l'extraction aqueuse permettant d'obtenir la boisson chaude caféinée est le marc de café. Ce biodéchet représente environ 6 millions de tonnes chaque année.

L'objectif principal de cette thèse est de définir et d'évaluer une approche de valorisation en cascade du marc de café, visant à l'épuiser de manière progressive et efficace pour générer différents produits d'intérêt industriel. Pour atteindre cet objectif, deux procédés ont été sélectionnés. Tout d'abord, l'éco-extraction solide-liquide, notamment assistée par ultrasons, a été utilisée pour la récupération des composés phénoliques antioxydants du marc. Puis, de manière séquentielle, la fermentation en milieu solide a été mise en œuvre sur le marc appauvri avec l'aide de *Penicillium solitum* pour la production d'un cocktail enzymatique hydrolytique.

La cascade de valorisation a été appliquée sur un marc qui a été collecté et stocké par la société Gecco (SCG-1), provenant de bars et de restaurants de la région Hauts-de-France. Un marc frais provenant du laboratoire d'accueil de la thèse (SCG-2) a également été étudié, pour une meilleure compréhension des contraintes industrielles liées au stockage. La comparaison de deux méthodes d'extraction appliquées au SCG-1, une conventionnelle (CE) et une assistée par ultrasons (UAE), a permis de mettre en évidence l'influence positive des ultrasons sur la récupération des composés phénoliques antioxydants. L'UAE a permis d'extraire environ 30% de plus de polyphénols totaux (11,8 contre 9,1 mg GAE/g) et de réduire la consommation d'énergie d'au moins 3 fois (170 contre 630 Wh) dans les conditions optimales d'extraction (eau-éthanol 50-50 (v/v), 40 mL/g, puissance de 571 W/L pour l'UAE ou température de 70°C pour la CE). L'application de ces conditions optimisées sur le SCG-2 a permis d'obtenir 23% d'activité antioxydante supplémentaire (77,9 contre 63,5 µmol Trolox/g) dans l'extrait par rapport au SCG-1.

L'extrait de composés phénoliques obtenu à partir de SCG-2 dans les conditions d'UAE optimisées montre la présence d'acides chlorogéniques fréquemment retrouvés dans un marc de café avec 4,3 mg/g, 5,9 mg/g et 0,4 mg/g de 3-CQA, 5-CQA et 3,5-diCQA respectivement. Ces trois composés sont absents de l'extrait obtenu dans les mêmes conditions à partir de SCG-1, qui montre la présence d'autres composés aux propriétés antioxydantes formés lors du stockage par divers micro-organismes colonisateurs.

Suite à l'isolement et l'identification d'une quarantaine de champignons filamenteux présents sur SCG-1, *Penicillium solitum* a été retenu pour l'optimisation d'une fermentation en milieu solide (FMS) en vue de la production d'un cocktail enzymatique. Les conditions optimisées d'extraction (7 mL/g, 55 minutes) et de fermentation (74,1% d'humidité, 7 jours d'incubation et un inoculum de 10^7 spores/g) obtenues par modélisation, ont permis de produire un complexe enzymatique avec des activités lipase, mannanase et glucanase sur SCG-1. Au regard de la production de ces mêmes enzymes, les conditions optimales de fermentation sur SCG-2 ont été : (75% d'humidité, 7 jours d'incubation et un inoculum de $8{,}1 \times 10^6$ spores/g). Les activités calculées dans ces conditions par le modèle ont été de 65,3 et 49,5 U/g pour l'activité lipase, 948 et 939 mU/g pour l'activité mannanase, 295 et 206 mU/g pour l'activité glucanase respectivement pour les extraits obtenus à partir des fermentations sur SCG-1 et SCG-2. L'extrait produit sur SCG-1 dans les conditions optimisées par *Penicillium solitum* montre aussi d'autres activités mesurées avec 56,4 U/g, 626 mU/g et 856 mU/g respectivement d'activité protéase, xylanase et pectinase.

Mots clés : valorisation ; cascade ; marc de café ; éco-extraction ; fermentation ; microbiologie

Abstract

Coffee is one of the most popular beverages. According to the International Coffee Organization, between 2017 and 2022, its production increased by 2.2%, while consumption grew by 7.7%. The sole solid co-product resulting from aqueous extraction to obtain the caffeinated hot beverage is spent coffee grounds. This bio-waste represents approximately 6 million tons annually.

The primary objective of this thesis is to define and evaluate a cascade valorization approach for spent coffee grounds, aiming to progressively and efficiently exploit this resource to generate various industrially valuable products. To achieve this goal, two processes were selected. Firstly, solid-liquid eco-extraction, including ultrasound-assisted extraction, was used for the recovery of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. Subsequently, in a sequential manner, solid-state fermentation was implemented on the depleted grounds with the assistance of *Penicillium solitum* to produce a hydrolytic enzyme cocktail.

The valorization cascade was applied to a type of spent coffee grounds collected and stored by the Gecco company (SCG-1), sourced from bars and restaurants in the Hauts-de-France region. Fresh marc from the thesis host laboratory (SCG-2) was also investigated to gain a better understanding of the industrial constraints related to storage. The comparison of two extraction methods applied to SCG-1, conventional extraction (CE) and ultrasound-assisted extraction (UAE), revealed the positive influence of ultrasound on the recovery of antioxidant phenolic compounds. UAE enabled the extraction of approximately 30% more total polyphenols (11.8 vs. 9.1 mg GAE/g) and consumed at least 3 times less energy (170 vs. 630 Wh) under optimal extraction conditions (50-50 (v/v) water-ethanol, 40 mL/g, power of 571 W/L for UAE, or temperature of 70°C for CE). The application of these optimized conditions to SCG-2 resulted in a 23% additional antioxidant activity (77.9 vs. 63.5 µmol Trolox/g) in the extract compared to SCG-1.

The phenolic compound extract obtained from SCG-2 under optimized UAE conditions showed the presence of chlorogenic acids commonly found in spent coffee grounds, with concentrations of 4.3 mg/g, 5.9 mg/g, and 0.4 mg/g for 3-CQA, 5-CQA, and 3,5-diCQA, respectively. These three compounds were absent in the extract obtained under the same conditions from SCG-1, which exhibited the presence of other antioxidant compounds formed during storage by various colonizing micro-organisms.

Following the isolation and identification of around forty filamentous fungi present on SCG-1, *Penicillium solitum* was selected for optimizing solid-state fermentation (SSF) to produce a hydrolytic enzyme cocktail. The optimized extraction conditions (7 mL/g, 55 minutes) and fermentation conditions (74.1% moisture, 7 days of incubation, and an inoculum of 10^7 spores/g) obtained through modeling allowed for the production of an enzymatic complex with lipase, mannanase, and glucanase activities on SCG-1. Regarding the production of these same enzymes on SCG-2, the optimal fermentation conditions were (75% humidity, 7 days of incubation, and an inoculum of $8.1x10^6$ spores/g). The activities calculated under these conditions for both types of spent coffee grounds were 65.3 and 49.5 U/g for lipase activity, 948 and 939 mU/g for mannanase activity, and 295 and 206 mU/g for glucanase activity, respectively, for extracts obtained from fermentations on SCG-1 and SCG-2. Additionally, the optimized extract produced on SCG-1 by *Penicillium solitum* also exhibited other measured activities, with 56.4 U/g, 626 mU/g, and 856 mU/g, respectively, for protease, xylanase, and pectinase activities.

Keywords: Valorization ; cascade ; spent coffee grounds ; eco-extraction ; fermentation ; microbiology

Valorisations scientifiques

Publications

BEAUDOR M., VAUCHEL P., PRADAL D., ALJAWISH A., PHALIP V., Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, Volume 188, June 2023. https://doi.org/10.1016/j.cep.2023.109358

Communications orales

BEAUDOR M., VAUCHEL P., PRADAL D., PHALIP V., Cascade valorization of spent coffee grounds. Wasteeng22 (Engineering for Waste and Biomass Valorization), Copenhague, Danemark, 27-30 juin 2022.

BEAUDOR M., VAUCHEL P., PRADAL D., PHALIP V., Cascade valorization of spent coffee grounds. ISGC (International Symposium on Green Chemistry), Larochelle, France, 16-20 mai 2022.

BEAUDOR M., VAUCHEL P., PRADAL D., BIGAN M., PHALIP V., Valorisation en cascade du marc de café. Journée Jeunes Chercheurs, Regards Interdisciplinaires sur l'Économie Circulaire, Lille, France, 30 Septembre 2021 (prix de la meilleure présentation orale).

Communication par affiche

BEAUDOR M., VAUCHEL P., PRADAL D., BIGAN M., PHALIP V., Intensification of ultrasonic assisted extraction of polyphenols antioxidants from coffee grounds. 6ème édition des Journées Scientifiques Ultrasons et Procédés (JSUP 6), Lille, France, 5-7 Juillet 2021.

Liste des abréviations

AA	Activité antioxydante
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACN	Acétonitrile
ANOVA	Analyse de la variance
a_w	Activité de l'eau
ASE	Extraction accélérée par solvant
BHA	*Butylated hydroxyanisole*
BHT	*Butylated hydroxytoluene*
CE	Extraction conventionnelle
CGA	Acides chlorogéniques
CID	Dissociation induite par collision
CMC	Carboxyméthylcellulose
CQA	Acides caféoliquiniques
DDA	Analyse dépendante des données
DPPH	2,2-diphényl-1-pycrilhydrazyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
EAE	Extraction assistée par enzyme
EC	*Energetic consumption*
ET	*Electron transfer*
FA	Acide formique
FDR	*False discovery rate* ; taux de faux positif
FMS	Fermentation en milieu solide
GAE	*Gallic acid equivalent* ; équivalent acide gallique
GES	Gaz à effet de serre
HAT	*Hydrogen Atom Transfer*
HPLC	*High performance liquid chromatography* ; chromatographie liquid haute performance
HR	Humidité relative
ICO	*International Coffee Organization*

ITS	*Internal transcribed spacer*
MAE	Extraction assistée par micro-ondes
MLR	*Multilinear regression analysis*
m/z	Masse/nombre de charges
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDA	*Potato Dextrose Agar*
PDB	*Potato Dextrose Broth*
PEF	Champ électrique pulsé
PES	Polyéthersulfone
PHAs	Acides poly-hydroxylés
PHB	Poly(β-hydroxybutyrate)
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)
PL	Phase liquide
PLE	Extraction liquide pressurisée
PS	Phase solide
Q/TOF	*Quadrupole/Time of flight*
RLES	*Resource life-extending strategies*
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RT	*Room temperature*
SCG	*Spent coffee grounds* ; marc de café
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium
SFE	Extraction par fluide supercritique
TBHQ	*Tert*-butylhydroquinone
TEAC	*Trolox equivalent antioxidant capacity ;* activité antioxydante équivalent Trolox
TFA	Trifluoroacétique
TPC	*Total polyphenols content* ; polyphénols totaux
UAE	*Ultrasound-assisted extraction* ; extraction assistée par ultrasons
US	Ultrasons
XOS	Xylo-oligosaccharides

Table des matières

Avant-propos I
Remerciements III
Résumé V
Abstract VII
Valorisations scientifiques IX
Liste des abréviations XI
Liste des figures XVII
Liste des tableaux XXI
Introduction générale 1
Étude bibliographique 7
1. Le café, une denrée riche mondialement consommée 7
1.1. Le café et sa fabrication 8
1.1.1. La production et la consommation mondiale du café 8
1.1.2. De la graine à la poudre 10
1.1.3. Les coproduits associés à sa fabrication 11
1.2. Le marc de café 13
1.2.1. La caractérisation physique du marc 13
1.2.2. Sa composition 14
1.2.2.1. Les fibres et polysaccharides 15
1.2.2.2. Les protéines 17
1.2.2.3. La caféine 19
1.2.2.4. Les composés bruns 20
1.2.2.5. Les lipides 21
1.2.2.6. Les minéraux 23
1.2.2.7. Les composants phénoliques 23
2. Les cascades de valorisation dans l'économie circulaire 26
2.1. L'économie circulaire 26
2.1.1. Les principes de l'économie circulaire 26
2.1.2. La notion de biodéchets 30
2.1.3. La valorisation des biodéchets en Europe et en France 30
2.1.4. La valorisation du marc de café en France 32
2.1.5. Les différents modèles économiques d'une valorisation des biodéchets. 33
2.2. Principes et applications d'une cascade de valorisation 33
2.2.1. Définition, concept et principes 33
2.2.2. Application de la cascade de valorisation 35
2.2.3. Exemples de cascades de valorisation de biomasse 37
2.2.3.1. Cascade à partir de végétaux 37
2.2.3.2. Cascade à partir de biodéchets polluants 38
2.2.3.3. Cascade à partir de coproduit 38
2.2.4. Les différentes cascades de valorisation du marc de café 39
3. L'extraction solide-liquide des composés phénoliques du marc de café 42
3.1. Principes, mécanismes et cinétique de l'extraction solide-liquide 43
3.2. Paramètres influençant l'extraction solide-liquide des polyphénols 45

3.2.1. La nature du solvant 45
3.2.2. Le pH 46
3.2.3. La température 47
3.2.4. Le temps 48
3.2.5. Le ratio solide-liquide 48
3.2.6. L'humidité 49
3.2.7. La taille des particules et leur structure 49
3.2.8. L'agitation 50
3.3. Les outils et méthodes d'extractions 51
3.3.1. Les extractions conventionnelles 51
3.3.1.1. La macération 51
3.3.1.2. La percolation 52
3.3.1.3. L'infusion 52
3.3.1.4. La décoction 52
3.3.1.5. Le Soxhlet 53
3.3.2. L'extraction verte ou éco-extraction 54
3.3.3. Les outils et méthodes d'extractions alternatives 55
3.3.3.1. Extraction par fluide supercritique (SFE) 56
3.3.3.2. Extraction liquide pressurisée ou accélérée (PLE ou ASE) 56
3.3.3.3. Extraction assistée par micro-ondes (MAE) 57
3.3.3.4. Extraction assistée par ultrasons (UAE) 57
3.3.3.5. Extraction assistée par champ électrique pulsé (PEF) 58
3.3.3.6. Extraction assistée par enzyme (EAE) 59
3.4. Les applications des composants phénoliques du marc de café 60
3.4.1. Les polyphénols dans l'industrie agroalimentaire 61
3.4.2. Les polyphénols dans l'industrie cosmétique 62
3.4.3. Les polyphénols dans l'industrie pharmaceutique 62

4. L'utilisation du marc de café comme substrat pour la production d'enzymes par des champignons filamenteux 63
4.1. La valorisation des déchets par l'utilisation de bioprocédés 63
4.2. La fermentation solide de champignons à partir de biodéchets 63
4.3. Développement d'une fermentation solide 65
4.4. Les champignons filamenteux 66
4.4.1. Les champignons filamenteux et leur croissance en fermentation solide 66
4.4.1.1. Les ascomycètes 67
4.4.1.2. Les basidiomycètes 67
4.4.2. La croissance des champignons en fermentation solide 68
4.4.3. Les paramètres physico-chimiques influents pour la croissance fongique et la production d'enzymes en fermentation solide 70
4.4.3.1. La nature du substrat 71
4.4.3.2. Le type de micro-organisme, taille et âge de l'inoculum 71
4.4.3.3. L'humidité et l'activité de l'eau 72
4.4.3.4. Le temps 74
4.4.3.5. La température 75
4.4.3.6. L'aération et les transferts gazeux 76
4.4.3.7. Le pH 76
4.5. Les dispositifs de fermentation solide 77
4.6. Les enzymes produites par fermentation solide sur marc de café 79
4.6.1. Généralité sur les enzymes produites par fermentation solide 80
4.6.2. La récupération des enzymes 80

4.6.3. Les enzymes produites par fermentation solide sur le marc de café et leurs applications 81
4.6.3.1. Les lipases 84
4.6.3.2. Les amylases 84
4.6.3.3. Les laccases 85
4.6.3.4. Les hémicellulases 85
4.6.3.5. Les protéases 86
4.6.3.6. Les tannases 87
4.6.4. Les cocktails enzymatiques 87
4.7. Les principaux fabricants d'enzymes dans le monde 88
5. Conclusion et objectifs 88
Chapitre 1 : L'éco-extraction des composés phénoliques antioxydants du marc de café 92
1. Introduction 93
2. Étude préliminaire : impact de la granulométrie du marc de café sur l'extraction des composés phénoliques 94
2.1. Matériel et méthode 94
2.2. Résultats de l'étude préliminaire 95
3. Publication : Comparaison de l'efficacité de l'extraction des polyphénols antioxydants à partir de marc de café en utilisant un équipement d'extraction assistée par ultrasons innovant par rapport à une méthode conventionnelle. 96
4. Annexes : études complémentaires sur l'activité antioxydante des extraits 120
4.1. Étude de l'activité antioxydante 120
4.1.1. Matériel et méthode 120
4.1.2. Résultats sur la comparaison des dosages 121
5. Complément d'étude : évaluation de l'extrait obtenu après optimisation 125
5.1. La composition en caféine des extraits 125
5.1.1. Matériels et méthodes 126
5.1.2. Résultats 126
5.2. L'activité antimicrobienne des extraits 127
5.2.1. Matériels et méthodes 127
5.2.2. Résultats et discussion 129
6. Conclusion 131
Chapitre 2 : La fermentation solide sur marc de café appauvri issu de l'extraction de polyphénols pour la production d'enzymes 133
1. Introduction 134
2. Isolement et identification des champignons du marc de café 135
2.1. Matériel et méthode pour l'isolement des champignons 135
2.2. Identification des souches fongiques 137
2.2.1. Extraction de l'ADN 137
2.2.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 137
2.2.3. Électrophorèse 138
2.2.4. Purification, séquençage et analyse 139
3. Criblage des activités enzymatiques des différents isolats en croissance sur marc de café ayant subi une extraction de ses composés phénoliques 141
3.1. Matériel et méthode 141
3.1.1. La fermentation sur marc de café 141

3.1.2. L'extraction des enzymes 142
3.1.3. Les dosages d'activités 142
3.1.4. Précipitation des protéines 143
3.1.5. SDS-PAGE 144
3.2. Résultats 144

4. Publication : Optimisation des conditions de culture de *Penicillium* sp. et de l'extraction de ses enzymes extracellulaires sur marc de café épuisé en polyphénols en vue de la production d'un cocktail cellulolytique et lipolytique 150

5. Complément d'étude sur les extraits obtenus 176
5.1. La caractérisation des extraits par H(U)PLC-MS/MS 176
5.1.1. Préparation des échantillons par réduction, alkylation et digestion tryspique 176
5.1.2. Séparation des peptides et caractérisation des peptides par HPLC-ESI-Q/TOF 177
5.1.3. Séparation des peptides et caractérisation par nano-UPLC-ESI-ORBITRAP 177
5.1.4. Retraitement bio-informatique des données de spectrométrie de masse 178
5.2. Résultats de l'analyse 179

6. Conclusion 184

Chapitre 3 : Étude de l'impact du stockage du marc sur l'obtention des composés d'intérêt 186

1. Introduction 187

2. Description des marcs de café utilisés 188
2.1. Le marc de l'entreprise Gecco 188
2.2. Le marc frais 188

3. L'extraction des polyphénols de deux marcs différents 189
3.1. Comparaison de la composition des extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons 189
3.1.1. Matériel et méthode pour l'étude comparative des deux marcs 189
3.1.2. Séparation, identification et quantification des composés phénoliques 190
3.1.3. Composition des extraits après extraction assistée par ultrasons 191
3.1.4. Nature des composés phénoliques 193
3.2. Simulation d'un stockage du marc frais humide avec la croissance d'un champignon filamenteux avant extraction des composés phénoliques 196
3.2.1. Conditions de fermentation fongiques sur le marc frais 196
3.2.2. Mesure des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante 196
3.2.3. Composition des extraits en composés phénoliques 197

4. Influence du stockage sur l'étape de fermentation solide dans la cascade de valorisation 200
4.1. Matériel et méthode 201
4.1.1. L'extraction des composés phénoliques 201
4.1.2. La fermentation solide avec *Penicillium solitum* 201
4.2. Résultats du plan d'expérience appliqué au marc frais appauvri 201
4.3. Comparaison de deux marcs appauvris ayant subi des conditions de stockage différentes pour la production d'un cocktail enzymatique 203

5. Conclusion 204

Conclusion générale et perspectives 206

Bibliographie 211

Annexes 256

Liste des figures

Figure 1. Valorisation du marc de café dans le cadre de l'économie circulaire, d'après les sources (Arya et al., 2022; Campos-Vega et al., 2015; McNutt & He, 2019; Murthy & Madhava Naidu, 2012). Les produits issus de l'application de la cascade sont en rouge..... 6

Figure 2. Schéma de coupe d'une cerise de café..... 8

Figure 3. Production et consommation de café à travers le monde de 1990 à 2022 reproduit de (ICO, Coffee market report, mars 2023) 9

Figure 4. Schéma de la première transformation du café selon la voie sèche (en bas), la voie humide (en haut) ou la voie semi humide (au milieu) d'après (Barel, 2020; Murthy & Naidu, 2012b)..... 10

Figure 5. Schéma de la deuxième transformation du café selon le type de consommation d'après (Barel, 2020; Esquivel and Jiménez, 2012)..... 13

Figure 6. Composition du marc de café 14

Figure 7. Fibres du marc de café. A Cellulose ; B Mannane ; C Galactomannane ; D Arabinogalactane type II..... 16

Figure 8. Molécule de caféine..... 19

Figure 9. Schéma de mélanoïdine du café reproduit de (Iriondo-DeHond et al., 2021)..... 21

Figure 10. Différents lipides présents dans le marc de café 22

Figure 11. Différents composés phénoliques présents dans la composition du marc de café 24

Figure 12. Diagramme papillon représentant l'économie circulaire d'après (MacArthur, 2013) 27

Figure 13. Évolution du cadre légal de valorisation obligatoire des bio déchets en France ... 31

Figure 14. Schéma de valorisation en cascade mettant en avant les 3 premiers principes théoriques de son utilisation d'après (Sirkin & ten Houten, 1994) 35

Figure 15. Pyramide de valeur bio-sourcée adaptée de (Ministerie van Landbouw, 2007) ... 37

Figure 16. Schéma des cycles de pression associés à la déformation des bulles de cavitation d'après (H. M. Santos et al., 2008) 58

Figure 17. Formation des spores chez les Ascomycètes 67

Figure 18. Formation des spores chez les Basidiomycètes 68

Figure 19. Réactions biologiques et physicochimiques qui apparaissent à échelle microscopique, adapté de (Hölker and Lenz, 2005) 69

Figure 20. A : Schéma du bioréacteur à colonne breveté d'ORSTOM, tiré de (Durand, 2003) ; B : Réacteur à tambour avec pales d'agitation 78

Figure 21. Réacteur de type Koji 79

Figure 22. Schéma du procédé de récupération des enzymes extracellulaires après fermentation solide à l'échelle laboratoire 81

Figure 23. Schéma de la cascade de valorisation développée pendant la thèse 91

Figure 24. Disparité des tailles de grains en pourcentage des marcs de café brut et broyé .. 94

Figure 25. Corrélation entre les polyphénols totaux des extraits obtenus après extraction UAE et leur capacité antioxydante mesurée par la méthode DPPH et ABTS (n = 306) 121

Figure 26. Surfaces réponses des différents dosages réalisés après extraction assistée par ultrasons à 30 minutes. R = ratio liquide-solide, E = % éthanol dans l'eau, P = puissance des ultrasons 124

Figure 27. Récupération des polyphénols totaux après solubilisation des résidus séchés dans différents solvants 129

Figure 28. Tests antimicrobiens à différentes concentrations ; A : *L .monocytogenes* ; B : *K .varians* ; C : *E .coli* ; D : *L .innocua* 130

Figure 29. Répartition de la taille des grains avant et après UAE. Observation au microscope (x200) 132

Figure 30. Exemples de champignons isolés sur PDA (de face et de dos), sur marc de café après 7 jours de croissance. Observation de leurs spores respectives au microscope (grossissement x1000). A : *Penicillium* sp., B : *Fusarium* sp., C : *Trichoderma* sp. 136

Figure 31. Cycles PCR pour l'amplification de la région ITS1 - ITS4..... 138

Figure 32. Exemple de gels d'électrophorèse effectués sur les produits PCR 139

Figure 33. Nombre d'isolats de différents genres après isolement..... 140

Figure 34. Fermentation en milieu solide sur marc de café appauvri après 9 jours d'incubation à 25°C. A123 : *Trichoderma* 1, A456 : *Trichoderma* 2, B123 : *Paecilomyces* 1, B456 : *Penicillium* 1, C123 : *Trichoderma* 3, C456 : *Paecilomyces* 2, D123 : *Fusarium* 1, D456 : Témoin négatif 142

Figure 35. Résultats du criblage pour les activités protéase, lipase, mannanase, xylanase et CMCase effectué sur l'ensemble des champignons identifiés après séquençage. 146

Figure 36. Gel SDS-PAGE any-kD des différents extraits enzymatiques obtenus après fermentation solide sur marc de café. MM pour marqueur de masse moléculaire..... 148

Figure 37. Marc humide provenant de la société Gecco ayant été stocké pendant 1 à 6 mois. De gauche à droite : zone en surface, zone profonde 187

Figure 38. Superposition des chromatogrammes des 11 standards utilisés (C = 0,1mM).... 191

Figure 39. Superposition des deux chromatogrammes obtenus pour le marc de café frais et le marc de Gecco 194

Figure 40. Chromatogrammes des composés phénoliques extraits des différents marcs de café 197

Figure 41. Exemples de biotransformations des composés phénoliques d'origine végétale par diverses réactions enzymatiques. Figure tirée de (Tinikul et al., 2018)..... 200

Figure 42. Comparaison de l'application de la cascade optimisée sur deux marcs ayant subi des conditions de stockage différentes. EXP = valeurs expérimentales ; MOD = valeurs modélisées ; Ino = inoculum ; Suc = sucres réducteurs ; Prot : protéines ; Lip = activité lipase ; Man = activité mannanase ; Glu = activité glucanase..... 203

Figure 43. Exemples de perspectives intéressantes à développer en vue de l'industrialisation de la cascade étudiée..... 210

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition en fibres du marc de café 17

Tableau 2. Composition en acides aminés de trois échantillons de marc de café (Lago et al., 2001) 18

Tableau 3. Description du concept des 10R (Reike et al., 2018) 29

Tableau 4. Différentes cascades proposées à partir du marc de café 40

Tableau 5. Exemples d'extractions conventionnelles de composés phénoliques à partir de différentes sources 54

Tableau 6. Les six principes de l'extraction verte d'après (Chemat et al., 2012) 55

Tableau 7. Exemples d'extractions alternatives de composés phénoliques à partir de différentes sources 60

Tableau 8. Différentes enzymes produites en fermentation solide sur du marc de café par des champignons filamenteux et les conditions associées à leur production 82

Tableau 9. Activité antioxydante observée et prédite par le modèle à 30 minutes d'extraction pour les 17 essais du plan expérimental menée sur l'UAE 122

Tableau 10. Résultats de l'ANOVA pour le plan expérimental mené sur l'UAE 123

Tableau 11. Comparaison de la caféine résiduelle extraite (valeur en mg/g MS) 127

Tableau 12. Différentes souches testées pour les tests antimicrobiens 128

Tableau 13. Concentration des extraits après filtration et solubilisation dans le solvant 129

Tableau 14. Liste des six souches les plus prometteuses 147

Tableau 15. Liste des protéines identifiées par HPLC-ESI-Q/TOF et nano-UPLC-ESI-ORBITRAP. Le trait de séparation indique les identifications supplémentaires ajoutées grâce à l'analyse des données de l'ULPC 180

Tableau 16. Récapitulatif des activités enzymatiques mesurées en fonction des conditions de fermentation et d'extraction mises en place 185

Tableau 17. Polyphénols totaux, activités antioxydantes, sucres et protéines mesurés dans les extraits obtenus après extraction assistée par ultrasons sur les deux marcs 192

Tableau 18. Composés phénoliques identifiés dans chacun des deux marcs de café 195

Tableau 19. Composés phénoliques identifiés avant et après simulation de vieillissement, comparaison avec le marc de Gecco..... 198

Tableau 20. Données chromatographiques des composés non identifiés du marc de Gecco et du marc frais vieillis (Figure 40) 199

Tableau 21. Résultats des résolutions des équations des différents modèles pour l'optimisation des réponses recherchées 202

Introduction générale

Le café est l'une des boissons les plus populaires à l'échelle mondiale, sa production et sa consommation connaissant une croissance continue au cours des dernières années. Entre 2017 et 2022, sa production a augmenté de 2,2% tandis que sa consommation a progressé de 7,7% (Organisation Internationale du Café). Ses bienfaits pour la santé, ses vertus stimulantes, ainsi que sa diversité de saveurs continuent d'attirer de nouveaux adeptes depuis les débuts de son utilisation au XIIIe siècle sur la péninsule arabique (Murthy & Madhava Naidu, 2012). Actuellement, le café est ancré dans de nombreuses cultures en tant qu'élément quotidien de vie. Cette boisson populaire résulte d'un processus de transformation complexe, générant divers coproduits (Janissen & Huynh, 2018). En effet, seuls les grains de café, représentant 50% du poids sec de la cerise de café, sont utilisés pour préparer la boisson (Campos-Vega et al., 2015). Le principal coproduit résultant du traitement de ces grains est le marc de café, qui est généré chaque année à hauteur plus de 6 millions de tonnes dans le monde (Mussatto et al., 2011). Ce chiffre met en exergue l'importance croissante de valoriser ce biodéchet. En France, depuis 2010, les lois dites de Grenelle II sur les biodéchets, sont un point de départ pour l'encadrement de la valorisation des déchets alimentaires dans les établissements de restauration.

La valorisation du marc de café est très limitée, car dans la plupart des cas, il n'est ni trié ni recyclé, mais incinéré ou enfoui avec d'autres déchets non recyclables. Bien que quelques initiatives locales aient vu le jour pour collecter et traiter une partie du marc de café par méthanisation en vue de produire du biogaz, cette approche n'exploite pas pleinement cette ressource. Par conséquent, de nombreuses études scientifiques se sont penchées sur des méthodes d'exploitation alternatives et responsables de ce biodéchet. Sa composition riche en fibres, protéines, lipides, composés phénoliques ou encore minéraux (Campos-Vega et al., 2015) permet d'envisager toutes sortes de valorisations.

Le marc de café peut être utilisé tel quel comme fertilisant grâce à sa teneur en matière organique élevée (Afriliana et al., 2021), comme adsorbant à des fins de dépollution de par sa

nature poreuse (Nguyen et al., 2022) ou encore comme matériau composite dans le domaine de la construction avec ses propriétés physique comme sa stabilité thermique (Zarrinbakhsh et al., 2016).

Cependant, la valorisation du marc de café ne se limite pas à son utilisation brute. En utilisant des procédés d'extraction, il devient possible de récupérer des composés d'intérêt, ouvrant ainsi la voie à leur utilisation dans divers secteurs industriels. Par exemple, dans le domaine de l'énergie, du biodiesel peut être obtenu par transestérification d'huile extraite du marc de café (Al-Hamamre et al., 2012; N. Caetano et al., 2012). Le secteur agroalimentaire peut bénéficier de l'utilisation des protéines, des sucres et des fibres extraits du marc de café (Arya et al., 2022; Mussatto, Machado, et al., 2011). Quant aux industries cosmétique et médicale, elles peuvent exploiter les molécules bioactives aux propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, anti-cancéreuses et antidiabétiques (Bajko et al., 2016; Hwang et al., 2014; Ribeiro et al., 2018; Rodrigues et al., 2023). Même le secteur textile peut tirer parti des colorants issus du marc de café (Mongkholrattanasit et al., 2021).

En plus des composés extractibles que le marc de café peut offrir, il est également envisageable de produire des produits à haute valeur ajoutée en utilisant des procédés de fermentation (Massaya et al., 2019). Ces procédés peuvent être appliqués directement sur le marc de café par fermentation solide ou sur divers composés extraits, tels que ses sucres issus de l'hydrolyse des fibres ou encore à partir de son huile par fermentation liquide.

En fermentation liquide, l'huile du marc peut être utilisée pour la biosynthèse de polymère comme le poly(β-hydroxybutyrate) (PHB), une alternative biodégradable au polyéthylène et au polypropylène (Obruca et al., 2014). Les sucres réducteurs du marc peuvent eux aussi être exploités pour la production de molécules plateformes comme l'acide lactique en utilisant des bactéries (Hudeckova et al., 2018) ou de biocarburant comme le bioéthanol en utilisant des levures (Mussatto et al., 2012).

En fermentation solide, la biosynthèse d'esters volatils servant d'arômes en agroalimentaire peut aussi être envisagée (Medeiros et al., 2003), tout comme la production d'enzymes pouvant être utilisées dans des domaines divers (Favaro et al., 2020; Mansor et al., 2019; Rocha et al., 2021).

Le mémoire de thèse est organisé en 4 grandes parties :

Le manuscrit débute par une étude bibliographique qui introduit également nos travaux de recherche. La première section de cette étude rappelle le contexte en fournissant des données chiffrées sur le marché mondial du café. Elle explore également la composition complexe d'un de ses principaux coproduits, à savoir le marc de café, qui constitue l'objet central de notre étude. Ces informations nous orientent vers des choix potentiels de voies de valorisation. La deuxième section de cette étude nous offre un aperçu détaillé des enjeux liés à la valorisation des biodéchets, dans un contexte économique mondial en mutation, passant d'un modèle linéaire à un modèle circulaire. Cette partie met en avant un système séquentiel et efficace de valorisation, connu sous le nom de "cascade". Il s'agit d'un concept clé qui guide nos travaux et permet de tirer au mieux parti de la richesse du marc. Cette approche permet de générer une grande variété de produits pouvant se substituer aux produits d'origine pétro-sourcés dans de nombreux secteurs industriels comme l'agroalimentaire, la chimie fine, la cosmétique, etc. Les deux sections suivantes sont consacrées à la description approfondie de deux procédés de valorisation : l'éco-extraction solide-liquide pour la récupération de composés phénoliques et la fermentation solide pour la production d'enzymes. Ces parties fournissent un éclairage détaillé sur leur principe de fonctionnement, les paramètres influents, les outils nécessaires à leur mise en œuvre, ainsi que les applications potentielles des produits recherchés.

Dans la perspective d'une valorisation industrielle du marc de café, il a été choisi de prendre comme référence pour les expérimentations des deux premiers chapitres, le marc fourni par l'entreprise partenaire du projet, Gecco. Ces deux premiers chapitres abordent deux étapes de la cascade de valorisation du marc de café et leur enchaînement.

Le premier chapitre porte sur l'extraction des composés phénoliques du marc. Il débute par une pré-étude axée sur la granulométrie du marc de café et son impact sur l'extraction des composés phénoliques. Dans la continuité, une étude comparative a été menée en utilisant deux techniques d'extraction distinctes : l'extraction conventionnelle (CE) et l'extraction assistée par ultrasons (UAE), afin d'étudier le potentiel de ce procédé d'éco-extraction. Deux plans d'expériences factoriels ont été utilisés pour étudier les performances de chaque procédé en fonction des paramètres opératoires, à savoir le rapport liquide-solide,

le pourcentage d'éthanol dans le solvant et la température pour la CE, ainsi que la puissance des ultrasons pour l'UAE. Les performances des procédés ont été évaluées et comparées en termes de récupération des polyphénols totaux, d'activité antioxydante des extraits, et de consommation d'énergie. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un article paru dans le journal *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, qui constitue le cœur du chapitre 1. Un complément d'étude a été réalisé dans le but de comparer différents tests antioxydants (DPPH et ABTS) pour caractériser l'activité des composés phénoliques extraits. Par la suite, nous avons examiné de plus près l'extrait résultant de l'UAE optimisée, en mettant l'accent sur l'une des molécules les plus présentes dans le marc, à savoir la caféine. De plus, nous avons cherché à évaluer l'activité antimicrobienne de cet extrait à l'égard de quatre souches bactériennes, dont *Listeria monocytogenes*, espèce pathogène majeure.

Le deuxième chapitre se concentre sur l'utilisation de la fermentation solide appliquée à un marc de café ayant déjà subi une extraction (issus du chapitre 1) dans le but de produire un cocktail enzymatique hydrolytique complet et de valider l'enchainement de la cascade. Dans cette démarche, la première étape a consisté à identifier les champignons qui se développent naturellement sur le marc de café, en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Parmi les champignons détectés, un processus de criblage a été mis en place pour sélectionner un candidat capable de produire diverses enzymes telles que les cellulases, les lipases et les protéases, sur un marc appauvri. Une fois le candidat choisi, l'optimisation des conditions d'extraction et de production d'un cocktail enzymatique lipolytique et (hémi)cellulolytique sur un marc appauvri a été réalisée en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Pour l'extraction, nous avons examiné le rapport liquide-solide et le temps de contact entre le solvant et le substrat fermenté. Pour la fermentation, nous avons étudié les conditions de culture, telles que la durée d'incubation, la taille de l'inoculum et l'humidité. Les résultats de cette étude ont été décrits sous forme d'un article non publié à ce jour. En utilisant une approche protéomique, nous avons obtenu un aperçu complet des enzymes produites sur le marc appauvri dans les conditions optimales obtenues. Nous avons ensuite croisé ces identifications avec les mesures des activités enzymatiques associées.

Le troisième chapitre se focalise sur une perspective d'application industrielle de la cascade composée des deux procédés décrits au chapitre 1 et 2, à savoir les conditions de

stockage du marc de café avant valorisation. Pour ce faire, le marc provenant de la société Gecco a été comparé à un marc frais n'ayant pas subi de vieillissement en conditions humides à l'air libre. La séparation, l'identification et la quantification par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) des composés phénoliques antioxydants présents dans les extraits obtenus à partir des deux différents marcs dans les conditions optimisées de l'UAE définis dans le chapitre 1 ont été réalisés. Afin de mieux appréhender les différences constatées, une simulation de vieillissement a été menée sur du marc frais dans le but de mimer les conditions de stockage subies par le marc de Gecco. Une fois appauvri en composés phénoliques, le marc frais a été soumis à une étude similaire à celle du marc de Gecco détaillée au chapitre 2 pour la production d'un cocktail enzymatique lipolytique et (hémi)cellulolytique.

Ce manuscrit s'achève par une conclusion générale qui comporte une analyse critique de l'ensemble des résultats obtenus lors des travaux, met en avant l'apport de ces travaux de thèse d'un point de vue industriel et ouvre sur les perspectives potentielles à donner aux recherches effectuées.

La Figure 1 propose une adaptation graphique de cette introduction générale. Elle présente des exemples de valorisations des différents composés du marc et définit la cascade étudiée dans cette thèse ainsi que les produits résultant de son application.

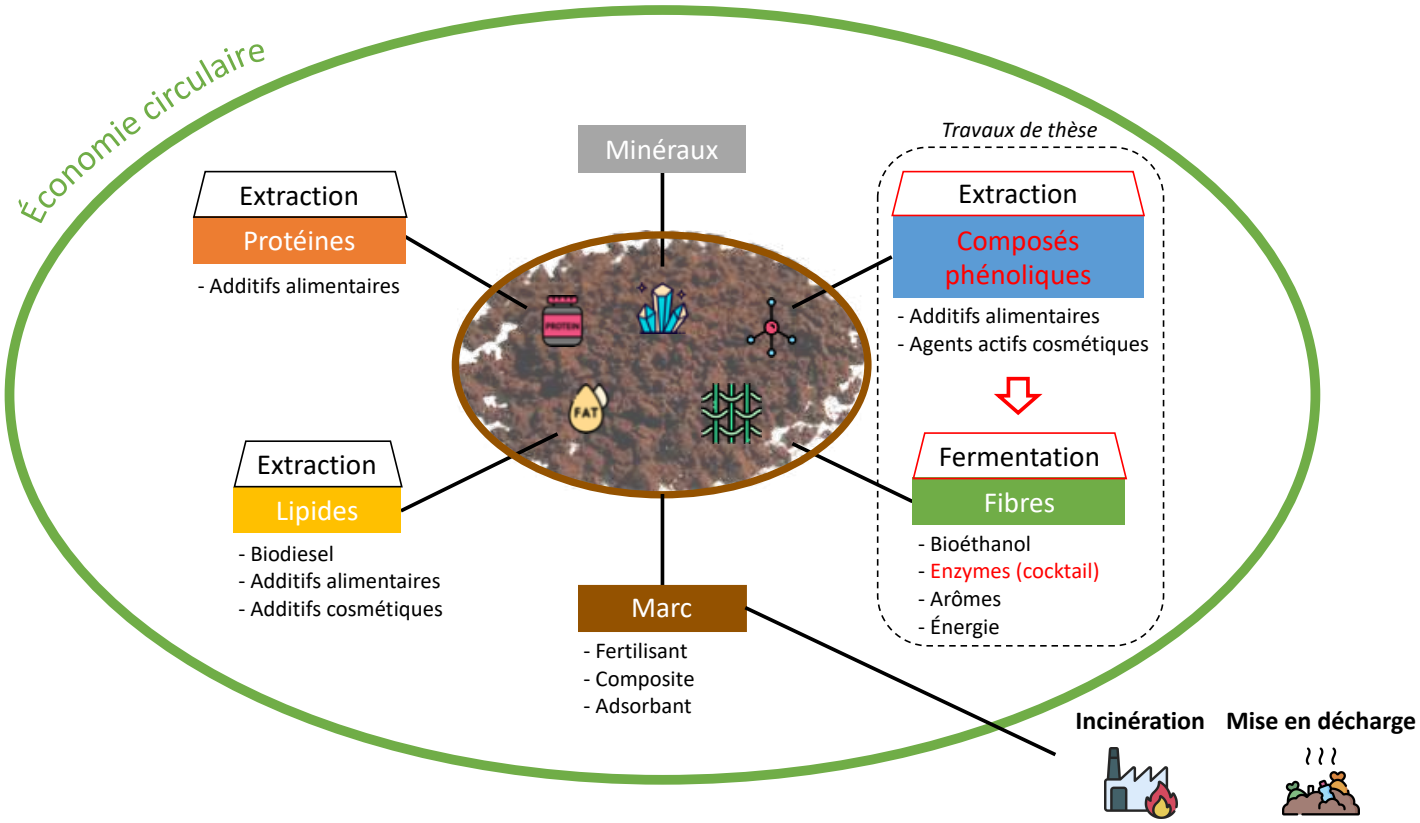

Figure 1. Valorisation du marc de café dans le cadre de l'économie circulaire, d'après les sources (Arya et al., 2022; Campos-Vega et al., 2015; McNutt & He, 2019; Murthy & Madhava Naidu, 2012).
Les produits issus de l'application de la cascade sont en rouge.

Étude bibliographique

1. Le café, une denrée riche mondialement consommée

Le café que nous connaissons provient des graines du caféier, un arbre faisant partie de la famille des Rubiacées et du genre *Coffea*. Il existe deux espèces différentes : *Arabica* et *Robusta* (ou *Robusta canephora*) qui donnent naissance à deux types de graines distincts. L'Arabica pousse en altitude à partir de 600 mètres et possède une quinzaine de variétés telles que le Blue Mountain, le Bourbon, le Caturra, le Kent's et le Mokka. Le grain est plat, long et large avec un sillon central sinueux, sa couleur varie du bleu au marron et il contient entre 1% et 1,5% de caféine. Les arômes caractéristiques de cette espèce sont floraux, fruités, parfumés et acidulés. En revanche, la *Canephora*, appelée *Robusta* de manière abusive car elle est la variété la plus cultivée, pousse uniquement à basse altitude, soit sous les 600 mètres. Son grain est plus petit, de forme arrondie et trapue avec un sillon central rectiligne. Sa couleur est brune et son taux de caféine plus élevé, allant de 2% à 2,5%. On retrouve des arômes plus amers mais aussi plus corsés (Barel, 2020).

Les fruits du caféier qui donneront les graines de café sont des baies appelées « cerises de café » qui deviennent rouges à maturité. La graine de café se compose de plusieurs couches : l'exocarpe qui joue un rôle de protection, le mésocarpe qui est une pulpe mucilagineuse plus ou moins abondante selon les espèces, et enfin l'endosperme, qui est un noyau formé de deux graines opposées par leur face plate. Chacune de ces graines est recouverte d'une enveloppe ligneuse appelée endocarpe ou parche et d'une pellicule adhérente connue sous le nom de pellicule argentée ou périsperme (Figure 2).

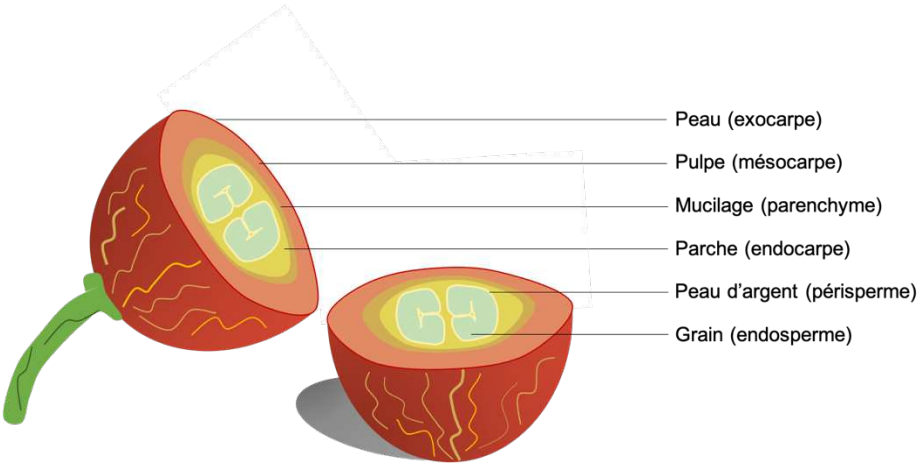

Figure 2. Schéma de coupe d'une cerise de café

1.1. Le café et sa fabrication

1.1.1. La production et la consommation mondiale du café

Le café est le résultat de la préparation d'une boisson par infusion de grains de café torréfiés et moulus, avec un arôme et une saveur caractéristique, qui en ont fait l'un des produits les plus consommés dans le monde (Sofía Torres-Valenzuela et al., 2020).

La consommation de café est une pratique ancrée dans la culture mondiale depuis des siècles. Le café est devenu une boisson incontournable pour des millions de personnes à travers le monde. Originaire des régions d'Afrique de l'Est, le café a rapidement conquis d'autres régions du monde, notamment l'Arabie et l'Europe. Au fil du temps, la consommation de café s'est répandue dans le monde entier, avec différentes méthodes de préparation, de torréfaction et de dégustation selon les traditions et les préférences locales (Clifford & Willson, 1985).

Aujourd'hui, le café représente une industrie mondiale en plein essor. Selon l'organisation internationale du café, la consommation mondiale de café a atteint près de 10 milliards de kilogrammes en 2021, faisant du café l'une des boissons les plus populaires au monde. L'Amérique du sud produit la grande majorité du café mondial, avec en 2022, une production estimée à 48,1% du total des grains devant le groupe Asie-Océanie (29%), l'Afrique (11,3%) et le groupe Mexique-Amérique centrale (11,5%) (ICO, Coffee market report, mars 2022).

Le café est consommé sous de nombreuses formes et dans de nombreuses cultures (ICO, Coffee market report, décembre 2022). Depuis plusieurs années la production couvre à peine la consommation, avec en 2021 un écart négatif de 2,1% (Figure 3). Concernant la répartition, on observe une production d'*Arabica* estimée à 56,2% et de *Robusta* à 43,8%. L'Europe est le premier continent consommateur avec 31,8% du marché mondial (ICO, Annual rewiew 2021/2022).

Il existe différentes formes de consommation de café, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients. Le café soluble est très pratique car il est rapide et facile à préparer, mais il a tendance à avoir un goût moins riche et complexe que le café moulu ou en grains. Le café moulu est la forme la plus courante de café en France, et est utilisé pour préparer le café filtre, le café expresso, le café turc, etc. Le café en grains est quant à lui souvent utilisé pour les machines à café automatiques, dans des cafés ou restaurants. Il offre une plus grande variété de goûts et de nuances, tout en nécessitant une certaine expertise dans la préparation.

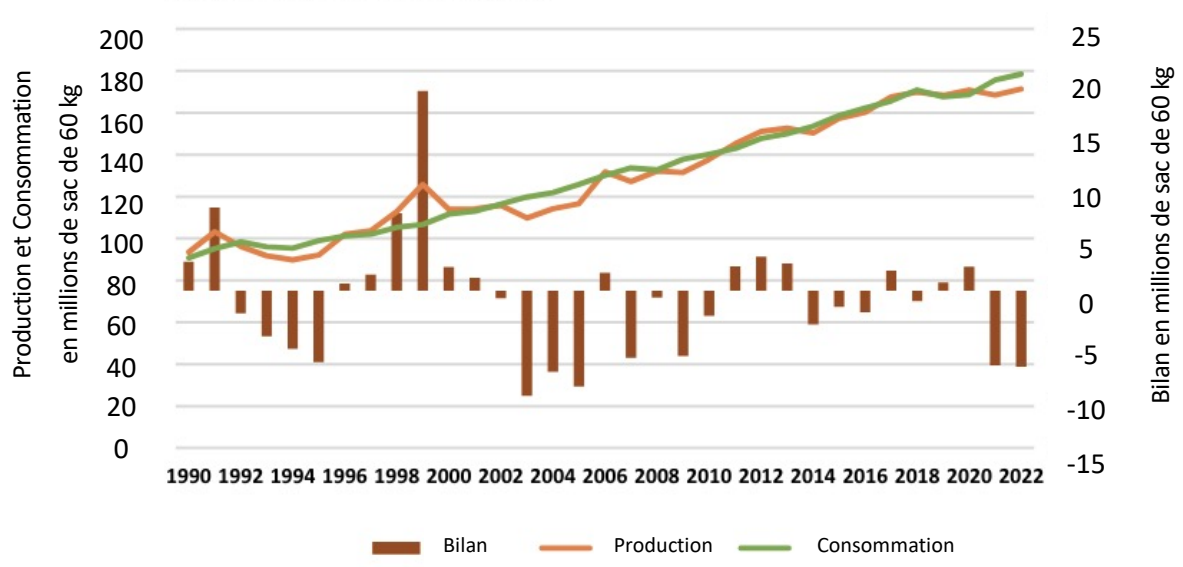

Figure 3. Production et consommation de café à travers le monde de 1990 à 2022 reproduit de (ICO, Coffee market report, mars 2023)

1.1.2. De la graine à la poudre

Le grain de café est récolté une fois qu'il a atteint le stade de maturation commercial ; il doit ensuite être rapidement transformé en café parche séché (sans pulpe) pour éviter une fermentation accélérée en raison de sa teneur élevée en eau et en sucre (Barel, 2020; Rodríguez-Valencia et al., 2022). Cette étape est nécessaire afin que le café garde son intégrité et toutes ses propriétés gustatives. Il est possible de transformer les fruits du caféier en grains de café vert commercialisables selon trois méthodes différentes, à savoir la voie sèche, la voie humide et la voie semi-humide (Figure 4). Le choix de la méthode à appliquer dépend généralement de la quantité de pulpe présente dans le type de café cultivé. Les cerises contenant peu de pulpe, comme les *Robusta*, sont directement séchées, c'est pourquoi on applique la voie sèche dans ce cas. En revanche, pour les *Arabica* dont la pulpe est abondante et riche en eau, ce qui complexifie le séchage, il est nécessaire de l'éliminer (dépulpage) avant de procéder au séchage. Pour ce faire, on utilise la voie humide, ainsi nommée car elle implique des opérations sous eau (Barel, 2020).

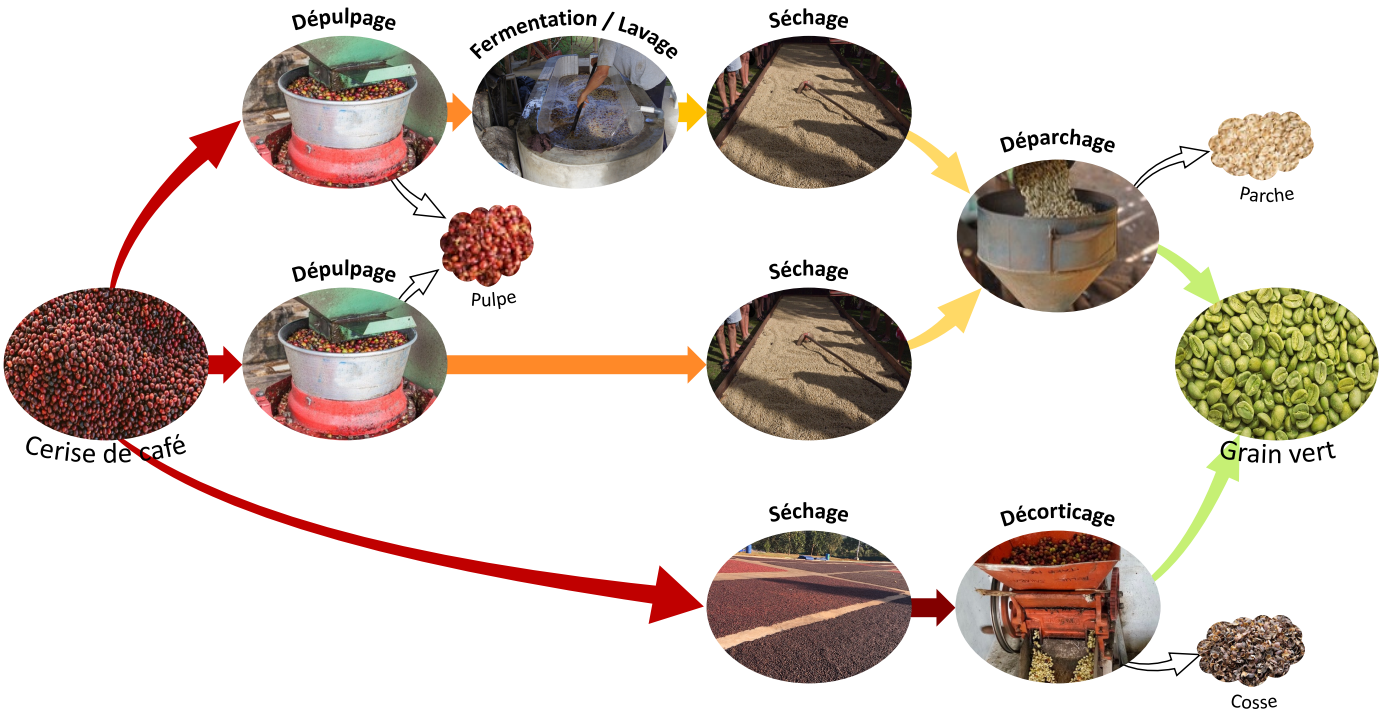

Figure 4. Schéma de la première transformation du café selon la voie sèche (en bas), la voie humide (en haut) ou la voie semi humide (au milieu) d'après (Barel, 2020; Murthy & Naidu, 2012b)

En sortie, un grain vert sans arôme est obtenu. Celui-ci va pouvoir être soit décaféiné ou soit directement torréfié en fonction de l'usage que l'on veut lui donner. C'est lors de cette torréfaction que les réactions de Maillard vont avoir lieu. Les grains de café vert sont soumis à une chaleur intense de 200 à 250°C pendant plusieurs minutes, en fonction des besoins de la torréfaction finale, qu'elle soit claire, moyenne ou foncée. Ce processus complexe entraîne des changements physiques et chimiques dans les grains de café torréfiés, tels que la dégradation thermique des antioxydants phénoliques naturels et la formation de composés aromatiques bruns, connus sous le nom de produits de la réaction de Maillard. Ces modifications affectent l'activité antioxydante finale du café (Liu & Kitts, 2011). Des études antérieures ont montré que l'activité antioxydante du café dépend principalement des conditions de torréfaction, plutôt que des méthodes d'infusion ou de la source des grains de café (Sacchetti et al., 2009).

1.1.3. Les coproduits associés à sa fabrication

À chaque étape de transformation, en fonction du procédé, de la cerise au grain vert, des coproduits vont être générés (Figure 4). Pour le procédé humide, la pulpe est le principal coproduit, puis vient la parche. Pour le procédé sec, l'unique coproduit est la cosse (pouvant être appelée coque) (L. S. Oliveira & Franca, 2015). A partir du grain vert (Figure 4), vient la torréfaction où la peau d'argent est séparée (Pérez-Sariñana & Saldaña-Trinidad, 2017). Ces coproduits peuvent être valorisés comme compost sous leur formes basiques. Mais aussi peuvent être traités avec des procédés d'extraction pour donner des biomolécules (antioxydants) ou encore être utilisés pour de la fermentation, méthanisation ou pyrolyse (Sofía Torres-Valenzuela et al., 2020). Ces coproduits peuvent aussi servir de matériaux de construction composite (Zarrinbakhsh et al., 2016). Cependant, ces voies de valorisation sont très dépendantes des pays producteurs et/ou exportateurs.

En général, le grain de café est classé en fonction de sa taille, de sa couleur et du pourcentage d'imperfections. Ceux étant considérés comme impropre à la consommation humaine après le triage sont des grains de café de basse qualité, qui contiennent des imperfections : grains noirs, brun foncé, endommagés par les insectes, tachetés, aigres, immature ou contenant des morceaux. Ces grains sont obtenus soit en raison d'une formation inadéquate à l'intérieur du fruit, soit d'un traitement défectueux. Ces grains produisent un

goût indésirable dans la boisson. Ils représentent environ 15 à 20% de la production de café en poids et posent un problème pour leur élimination (Ramalakshmi et al., 2009). Le plus souvent, ces grains sont utilisés pour la nourriture de bétails, volailles ou autre animaux (variable en fonction des réglementations locales et des considérations environnementales associées) (J.-F. Cruz et al., 2016).

Une fois qu'il a été torréfié, le grain de café peut être commercialisé sous plusieurs formes : entier, moulu ou soluble. L'unique coproduit solide résultant de l'extraction à l'eau pour obtenir la boisson chaude est le marc de café (Esquivel & Jiménez, 2012) (Figure 5). Le marc de café représente les résidus insolubles qui restent après l'infusion des grains de café broyés. Il existe deux sources principales de marc : celles générées par l'industrie du café soluble, qui utilise environ 50% de la récolte mondiale de café chaque année, et celles générées par les cafés et le grand public, qui représentent les 50% restants (R. Cruz et al., 2012).

Auparavant, les producteurs de café soluble ou "instantané" déversaient de grandes quantités de marcs de café (SCG de l'anglais *spent coffee ground*) dans les décharges, une pratique qui pouvait altérer l'écologie locale en participant à la production de méthane (gaz à effet de serre) par digestion anaérobie (Kostenberg & Marchaim, 1993). L'incorporation des SCG dans l'alimentation animale est également limitée en raison de l'activité anti nutritionnelle des tanins (Scully et al., 2016).



Figure 5. Schéma de la deuxième transformation du café selon le type de consommation d'après (Barel, 2020; Esquivel and Jiménez, 2012)

1.2. Le marc de café

Jusqu'à 90% du café préparé (propre à la consommation) fini sous forme de marc de café (Kourmentza et al., 2018). Ce qui correspond à une production mondiale d'environ 6 millions de tonnes de marc chaque année (Getachew & Chun, 2017). Ce biodéchet constitue un gisement valorisable, dont les caractéristiques et la composition sont présentés ci-dessous.

1.2.1. La caractérisation physique du marc

Le marc de café, de par sa structure poreuse et sa composition, présente une capacité d'adsorption de liquides, telle que l'eau. En effet, une étude a démontré qu'il était capable de retenir 5,7 g d'eau par gramme de marc sec (Ballesteros et al., 2014). Concernant sa structure des analyses de la distribution de taille des mésopores ont montré un profil bien défini avec la plupart des mésopores autour de 3 et 12 nm, et une quantité non significative supérieurs à 18 nm. Ces analyses confirment que le marc de café est un matériau avec une très faible porosité, contenant des mésopores de moins de 12 nm, des aires spécifiques comprises entre 2 et 5 m^2/g, et des volumes de pores spécifiques entre 0,003 et 0,004 cm^3/g (Ballesteros et al.,

2014). Ses caractéristiques font de ce coproduit un excellent substrat naturel pour la croissance de nombreux micro-organismes (França et al., 2022; Yuliyanti et al., 2021).

1.2.2. Sa composition

La composition du marc de café est similaire à celle des grains de café torréfiés dont certains éléments ont déjà été extraits lors de l'infusion à l'eau chaude après broyage. Celle-ci varie en fonction de la variété de café utilisée, des méthodes de traitement de la cerise, de la torréfaction ainsi que de la méthode d'extraction pour obtenir la boisson caféinée. On peut cependant affirmer qu'il est majoritairement composé de fibres (50 à 70%), c'est-à-dire de cellulose, hémicellulose et lignine. La cellulose étant un polymère de glucose, l'hémicellulose des polymères de sucres (C5 et C6) et la lignine est un enchevêtrement complexe de diverses molécules phénoliques. On retrouve aussi des protéines (de 13 à 18%), des lipides (de 10 à 15%), des molécules complexes comme les composés bruns ainsi que des minéraux (Campos-Vega et al., 2015) (Figure 6). Des développements approfondis seront consacrés aux composés phénoliques et aux fibres présentes dans le marc de café au sein de cette section. En effet, ces éléments jouent un rôle essentiel dans les axes de valorisation sélectionnés pour cette thèse.

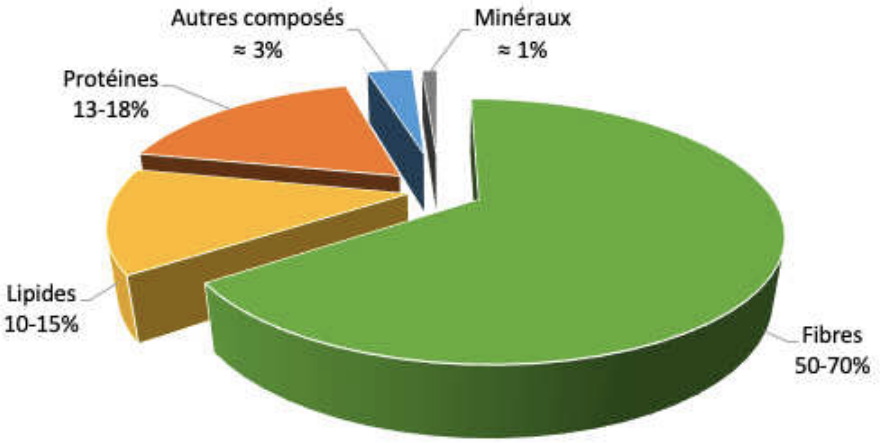

Figure 6. Composition du marc de café

1.2.2.1. Les fibres et polysaccharides

Le grain de café est une source importante de polysaccharides (représentant environ 50% du poids sec du grain vert), principalement constitués de mannanes ou galactomannanes, d'arabinogalactanes de type II et de cellulose (Figure 7). Le mannane, principal polysaccharide présent dans l'extrait de café, est responsable de sa haute viscosité, qui affecte négativement les processus technologiques impliqués dans la production de café instantané. Ce polysaccharide est composé de chaînes de mannane β-(1 → 4) substituées environ tous les 100 résidus dans la position *O*-6 par des résidus de galactose simples. Les arabinogalactanes ont un rapport arabinose/galactose de 0,4/1 et sont constitués d'un squelette de galactose lié par des liaisons β-(1 → 3), substitué à la position *O*-6 par des résidus d'arabinose et/ou de galactose. Les chaînes latérales contiennent des résidus d'arabinose et de galactose avec l'arabinose en tant que résidu terminal. Ces liaisons sont caractéristiques des arabinogalactanes de type II, un polymère généralement lié de manière covalente aux protéines (Bradbury & Halliday, 1990; Campos-Vega et al., 2015). Le processus de torréfaction augmente la solubilité des arabinogalactanes et des mannanes en desserrant la structure de la paroi cellulaire à mesure qu'elle gonfle et en dépolymérisant les polysaccharides (Wei et al., 2012). Les polysaccharides hydrosolubles qui apparaissent après la torréfaction jouent un rôle important dans la rétention des substances volatiles et contribuent à la viscosité du café infusé, ainsi qu'à la sensation crémeuse connue sous le nom de "corps" en bouche (Illy & Viani, 1995).

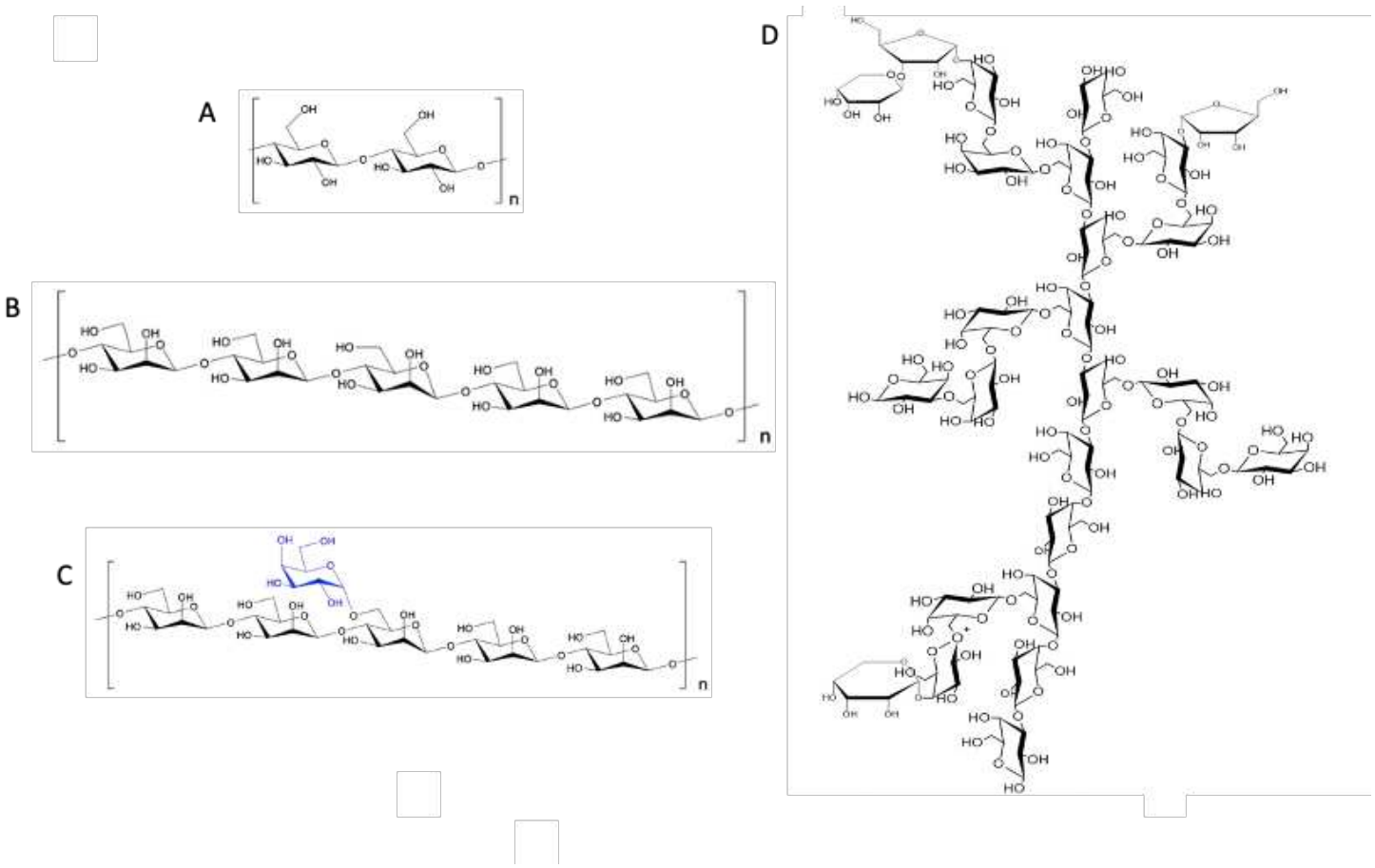

Figure 7. Fibres du marc de café. A Cellulose ; B Mannane ; C Galactomannane ; D Arabinogalactane type II

Ces galactomannanes et arabinogalactanes sont en parti extraits pendant la préparation de la boisson, en utilisant de l'eau chaude sous pression (Nunes & Coimbra, 2010). Cependant, la plupart de ces polysaccharides restent sous forme de matériau insoluble lié à la matrice du marc (Mussatto, Carneiro, et al., 2011; Simões et al., 2013). Contrairement à la peau d'argent de la graine de café, le marc ne contient pas de xylose et le xylan n'est pas présent en tant que fibre (Ballesteros et al., 2014).

Tableau 1. Composition en fibres du marc de café

Type de marc	Lignine (%)	Cellulose Glucose (%)	Hémicellulose Mannose (%)	Hémicellulose Galactose (%)	Hémicellulose Arabinose (%)	Références
CI	38,5	16,3	37,7			(López-Linares et al., 2021)
CI	23,9	12,40	19,07	16,43	3,6	(Ballesteros et al., 2014)
CI	29,8	9	23,4	13,8	1,2	(Kwon et al., 2013)
CI	-	8,6	21,2	13,8	1,7	(Mussatto, Carneiro, et al., 2011)
CP	20,50	22,21	28,81			(Caballero-Galván et al., 2018)
E	-	12	27,6	16,2	4,2	(Simões et al., 2013)

NB : CI = café instantané, CP = cafetière à piston, E = expresso

Plusieurs études ont fourni des teneurs en fibres différentes. L'hémicellulose décrire précédemment est majoritaire avec une proportion allant d'environ 30 à 50% du marc de café (Tableau 1). Puis vient la lignine, un autre polymère couplé avec la cellulose et l'hémicellulose et qui agit comme stabilisateur contre les stress mécaniques et autres stress biologiques internes/externes (Koshijima & Watanabe, 2013). Elle représente environ 20 à 40% (Tableau 1) de la masse totale du marc de café, et est divisée en deux parties, une insoluble majoritaire environ 17% (appelée lignine de Klason) et une soluble de 6% (Ballesteros et al., 2014). Et enfin, la cellulose représente environ 10 à 20% du marc.

1.2.2.2. Les protéines

Le marc de café contient une proportion relativement importante de protéines, qui peut varier en fonction du type d'extraction que les grains ont subi, de 12,8 à 16,9% d'après (R. Cruz et al., 2012) pour le marc issu de café expresso, 17,4% d'après (Ballesteros et al., 2014), et 13,6% d'après (Mussatto, Carneiro, et al., 2011) pour le marc issu de café soluble. Cette concentration est plus élevée que dans le grain de café torréfié, car au cours du processus de préparation du café avec de l'eau, de nombreux autres composants des grains sont extraits, ce qui entraîne une concentration des composants non extraits (comme les protéines) dans le matériau solide résiduel (R. Cruz et al., 2012). Il est important de noter que ces teneurs en protéines mesurées avec la méthode Kjeldahl peuvent-être surestimées en raison de la

présence d'autres substances contenant de l'azote (caféine, trigonelline ou encore acides aminés) (Delgado et al., 2008). Cependant, de nombreux auteurs rapportent des teneurs en protéines plus faibles, variant entre 6,7% et 9,9% (Lago et al., 2001) et entre 11,5 et 14,8% (Ravindranath et al., 1972).

Une étude qui a utilisé différents marcs de café collectés auprès de trois fabricants de café instantané en utilisant quatre extracteurs différents a permis de connaître la composition en acides aminés (Lago et al., 2001) (Tableau 2). Les protéines du marc présentent des taux d'acides aminés essentiels similaires ou supérieurs à ceux de coproduits alimentaires courants tels que le tourteau de soja, notamment en ce qui concerne la leucine, la valine, la phénylalanine et l'isoleucine. La teneur en isoleucine, leucine et valine des SCG est plus de deux fois supérieure à celle du tourteau de soja. Les acides aminés essentiels représentent près de la moitié (49%) de l'ensemble des acides aminés.

Tableau 2. Composition en acides aminés de trois échantillons de marc de café (Lago et al., 2001)

	Marc 1	Marc 2	Marc 3
ASP	0,02	0,05	0,11
GLU	0,78	0,89	0,63
SER	0,07	0,07	0,05
HIS	0,29	0,31	0,01
GLY	0,16	0,36	0,26
THR	0,13	0,14	0,07
ALA	0,32	0,35	0,32
ARG	nd	nd	0,01
TYR	0,21	0,24	0,17
CYS	nd	nd	0,33
VAL	0,39	0,45	0,38
MET	0,11	0,12	0,06
PHE	0,37	0,43	0,41
ILE	0,29	0,33	0,34
LEU	0,60	0,68	0,72
LYS	0,12	0,13	0,11
PRO	0,22	0,26	0,31

NB : ASP = acide aspartique ; GLU = acide glutamique ; SER = sérine ; HIS = histidine ; GLY = glycine ; THR = thréonine ; ALA = alanine ; ARG = arginine ; TYR = tyrosine ; CYS = cystéine ; VAL = valine ; MET = méthionine ; PHE = phénylalanine ; ILE = isoleucine ; LEU = leucine ; LYS = lysine ; PRO = proline

1.2.2.3. La caféine

La caféine, également connue sous le nom de 1,3,7-triméthyl-xanthine (Figure 8), est l'alcaloïde renfermant le noyau purine le plus largement identifié dans le café et les produits dérivés du café. Elle est éliminée des grains de café par le processus de décaféination (processus d'extraction par trempage, CO_2 supercritique ou solvant organique) (Barel, 2020), largement utilisé dans l'industrie à grande échelle (Katz, 1987). Bien que la teneur en caféine des coproduits du café soit inférieure à celle des grains de café, une proportion importante de caféine demeure dans ces coproduits. Les concentrations de caféine varient de 0,8 à 1,4% et 1,7 à 4,0% pour le grain de café *Arabica* et *Robusta* respectivement. Concernant le marc de café, les quantités de caféine varient de 0,2 à 0,8%, avec une quantité moyenne de 0,5% pour un café expresso mélange *Arabica*/*Robusta* (R. Cruz et al., 2012). Dans une deuxième étude, menée sur du marc de café expresso 100% *Arabica,* les variations ont été mesurées allant de 0,8 à 1,2% avec des méthodes d'extraction assistée par ultrasons dans différents types de solvants polaires (S. Angeloni et al., 2020). On note une différence significative entre les deux articles qui peut s'expliquer par la méthode d'extraction, qui dans la première étude consiste en une extraction solide-liquide de 5 minutes dans de l'eau bouillante.

Dans la percolation de style expresso, une pression hydrostatique considérable est appliquée dans un laps de temps réduit. Cela permet d'extraire la caféine de la structure cellulaire et entraîne un rendement d'extraction de 75 à 85%, avec seulement 15 à 25% de caféine restant dans les SCG (Oestreich-Janzen, 2019).

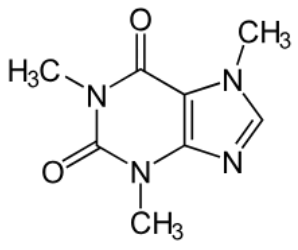

Figure 8. Molécule de caféine

1.2.2.4. Les composés bruns

Les composés bruns azotés du café sont générés par une réaction de brunissement non-enzymatique (Maillard) entre les sucres réducteurs et des composés dotés d'un groupe amino libre, qui créent divers produits, dont les mélanoïdines (Figure 9) (Moreira et al., 2012). Les mélanoïdines sont des produits à haut poids moléculaire (Bartel et al., 2015) avec de faibles quantités d'acides aminés (< 6%), principalement de l'acide glutamique et de la glycine, qui sont libérés par hydrolyse acide. Lors de la préparation du café, seulement 33% des protéines initiales du grain de café vert sont extraites avec de l'eau chaude, protéines résiduelles restent insolubles en raison de l'association avec les arabinogalactanes de la paroi cellulaire. Les galactomannanes modifiés par la torréfaction et les populations de mélanoïdines enrichies en galactomannanes représentent 47% de la matière brune de haut poids moléculaire (Nunes et al., 2012). Ils contribuent aux propriétés antioxydantes et fonctionnelles du café par eux-mêmes et en raison de la présence de composés phénoliques dans leur structure (Bravo et al., 2012). Cependant, bien que les mélanoïdines et d'autres composés bruns puissent agir en tant qu'antioxydants, en raison de leur quantité inférieure dans le marc de café, leur contribution à la capacité antioxydante pourrait être assez limitée (Delgado et al., 2008). Il a également été découvert que plus de 50% de l'activité antioxydante in vitro des mélanoïdines de café est due aux composés de faible poids moléculaire qui sont liés de manière non covalente au squelette de mélanoïdine (Delgado-Andrade & Morales, 2005). Concernant leur proportion dans le marc, il a été suggéré par (Passos & Coimbra, 2013) qu'elle soit autour des 16%. Ce chiffre correspond à la gamme de 13 à 25% proposée par (Mesías & Delgado-Andrade, 2017). Ces chiffres, qui peuvent paraître importants, regroupent une partie des polysaccharides et protéines totales du marc.

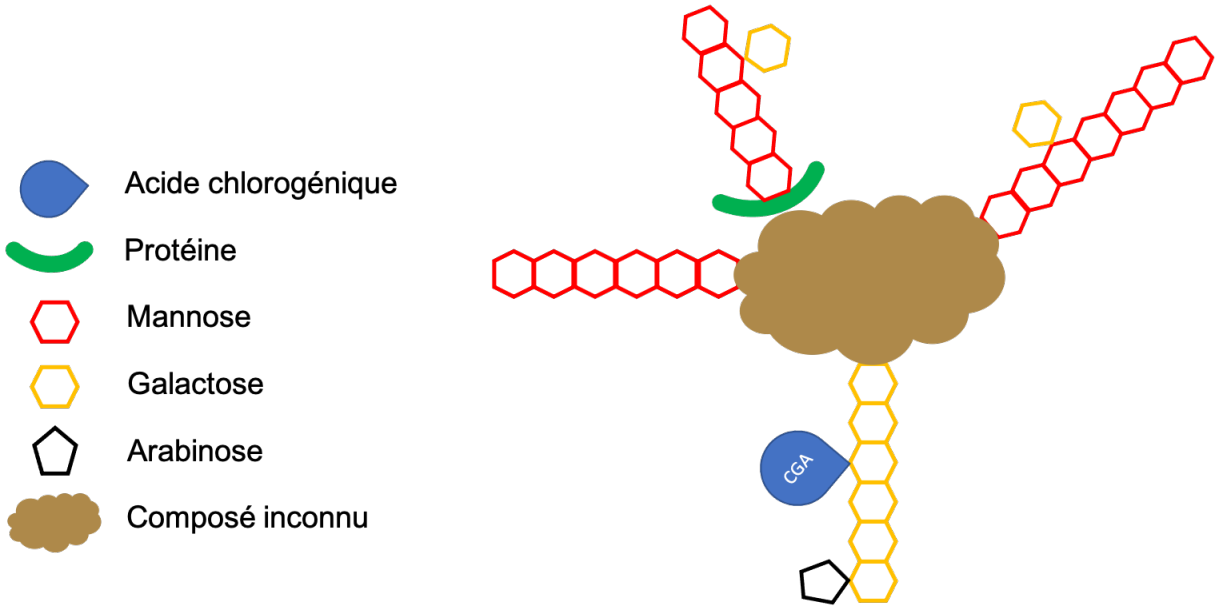

Figure 9. Schéma de mélanoïdine du café reproduit de (Iriondo-DeHond et al., 2021)

1.2.2.5. Les lipides

Les principales classes de lipides trouvées dans le marc de café sont les triglycérides, les esters d'alcools diterpéniques et les acides gras (Ratnayake et al., 1993). L'huile de marc de café extrait à l'aide de CO_2 supercritique est principalement composée de triglycérides (71,3% en poids), avec de faibles quantités de mono- et diglycérides (0,7% et 5,8% en poids, respectivement), ainsi que d'acides gras libres (1,6% en poids). La présence d'autres composés a également été détectée, tels que des tocophérols, des stérols, des esters de dipertènes, des alcools, des stérols et des acides gras (Figure 10), représentant jusqu'à 20% (en poids) de la masse d'huile extraite (M. V. Cruz et al., 2014). Le marc de café a souvent été signalé pour contenir entre 10 et 15% (Jenkins et al., 2014), et parfois même jusqu'à 20% en moyenne de lipides (Lago et al., 2001; McNutt & He, 2019). Les résultats révèlent que l'utilisation d'hexane comme solvant d'extraction pendant 30 minutes donne le rendement d'huile le plus élevé (15,3%) juste au-dessus du pentane pour un temps similaire (15,2%). Les indices d'acidité et de saponification des huiles extraites varient en fonction du solvant utilisé pour l'extraction. Les résultats montrent que l'indice d'acidité (qui mesure la quantité d'acides gras libres présents) de l'huile extraite de SCG avec de l'hexane est de (7,3 mg KOH/g). Cette valeur est inférieure à celles obtenues avec d'autres solvants (éthanol 7,7, isopropanol 12,8,

chloroforme 9,1 et toluène 8,3 mg KOH/g) (Al-Hamamre et al., 2012). Les huiles de haute qualité ont généralement un faible indice d'acidité.

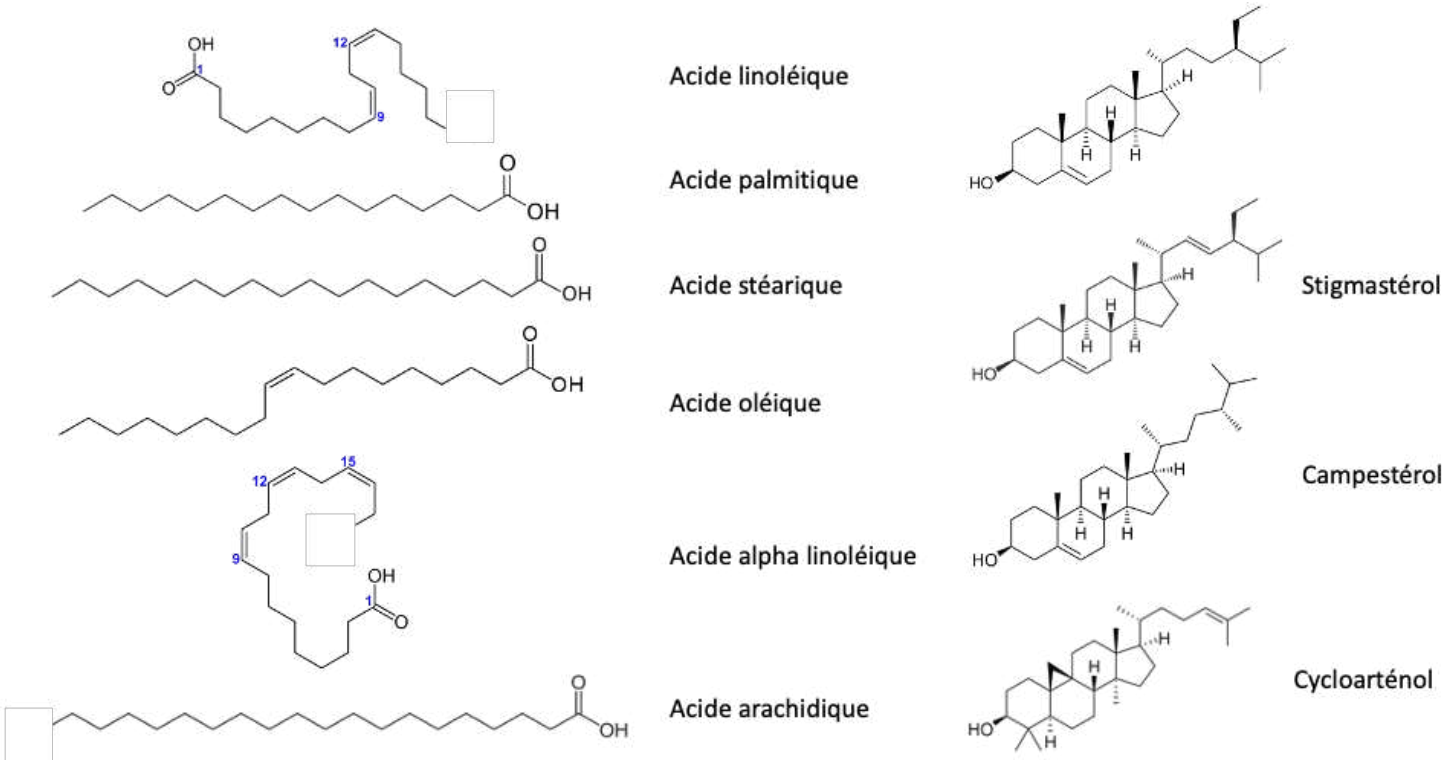

Figure 10. Différents lipides présents dans le marc de café

Plusieurs publications ont mis en évidence que la composition des huiles contenues dans les marcs de café est dominée par l'acide linoléique (C18:2), qui représente généralement environ 45% des acides gras (Acevedo et al., 2013; Jenkins et al., 2014). L'acide palmitique (C16:0) est présent à hauteur d'environ 37%, tandis que les acides stéarique (C18:0) et oléique (C18:1) sont tous deux présents à environ 7%. Les acides alpha-linolénique (C18:3) et arachidique (C20:0) sont présents en quantités moindres, représentant chacun environ 1% des acides gras. Ces valeurs sont similaires pour les marcs de café provenant de différentes régions du monde, qu'ils soient issus de café *Arabica* ou *Robusta*, décaféiné ou non, et qu'ils aient été préparés sous forme d'expresso, de café filtré ou pressé (Jenkins et al., 2014). Les stérols représentent environ 5,4% des lipides totaux dans le café Arabica et se composent de sitostérol (53%), stigmastérol (21%), campestérol (11%), cycloarténol (8%) et les autres stérols

représentent chacun 5% ou moins de la fraction totale des stérols (Spiller, 1997). La saponification directe permet d'obtenir un niveau élevé de diterpènes (2,14 et 4,66 mg/g de marc de kahweol et de cafestol, respectivement) (Acevedo et al., 2013).

1.2.2.6. Les minéraux

Lors de la préparation du café, la plupart des minéraux sont aisément extraits en utilisant de l'eau chaude. En ce qui concerne le marc de café expresso, la teneur totale en minéraux (K, Mg, P, Ca, Na, Fe, Mn et Cu) varie de 0,82 à 3,52% (R. Cruz et al., 2012). Le marc de café contient alors les minéraux qui ne sont pas présents dans la boisson, que l'on retrouve dans les cendres (1,3%). Le potassium est l'élément le plus abondant, suivi du phosphore et du magnésium (Ballesteros et al., 2014; Mussatto, Carneiro, et al., 2011). D'autres minéraux sont aussi présents comme le soufre et le calcium mais on retrouve aussi en plus petite proportion du fer, de l'aluminium, du sodium, du cuivre etc… (Ballesteros et al., 2014).

1.2.2.7. Les composants phénoliques

Aujourd'hui, de nombreuses études ont examiné la récupération des composés phénoliques provenant des sous-produits de l'industrie du café et leur activité antioxydante. Les composés phénoliques des sous-produits du café (pulpe, enveloppe, pellicule argentée et marc) peuvent être extraits à l'aide de différents solvant ou différentes méthodes avec ou sans prétraitements (Campos-Vega et al., 2015; Conde & Mussatto, 2016; Iriondo-DeHond et al., 2020). Le marc de café est une source riche de composés antioxydants, tels que les polyphénols, qui ont été caractérisés par plusieurs études utilisant la chromatographie liquide à haute performance. La proportion de ces derniers est très variable, certaines études comme (López-Barrera et al., 2016) ont mesuré certains composés phénoliques par HPLC, ce qui donne une fourchette allant de 4,6 à 9,9 mg/g de marc. D'autres, comme (Mussatto, Ballesteros, et al., 2011) avec le test de Folin-Ciocalteu pour quantifier les polyphénols totaux, ont quantifié jusqu'à 16 mg GAE/g de marc, voir même jusqu'à 35,5 mg GAE (équivalent acide gallique)/g pour (Panusa et al., 2013). L'origine du café et le procédé d'extraction de la boisson ont un impact sur les polyphénols restant à disposition dans le marc. En effet, il a été possible d'extraire 17,75 mg GAE/g à partir d'un marc de café provenant de bars, tandis qu'un marc provenant de capsules expresso a permis d'extraire 21,56 mg GAE/g (Zuorro & Lavecchia, 2012).

Parmi les polyphénols présents, les acides caféoliquiniques (CQA) sont les plus abondants, avec une concentration moyenne de 6,4% dans l'arabica et 3% dans le *Robusta*, suivis des acides dicaféoliquiniques (diCQA) qui se retrouvent à hauteur de 5,4% dans l'arabica et 3,8% dans le *Robusta*. Ces acides chlorogéniques (CGA) sont des esters hydrosolubles formés entre l'acide quinique et une ou deux fractions de l'acide caféique (Bravo et al., 2012). Outre ces polyphénols, d'autres composés phénoliques connus pour jouer un rôle bioactif tels que l'acide gallique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique, l'acide caféique et l'acide vanillique, mais aussi des flavonoïdes comme la catéchine, la quercétine et la rutine ont également été identifiés et quantifiés (Figure 11) (S. Angeloni et al., 2020; López-Barrera et al., 2016).

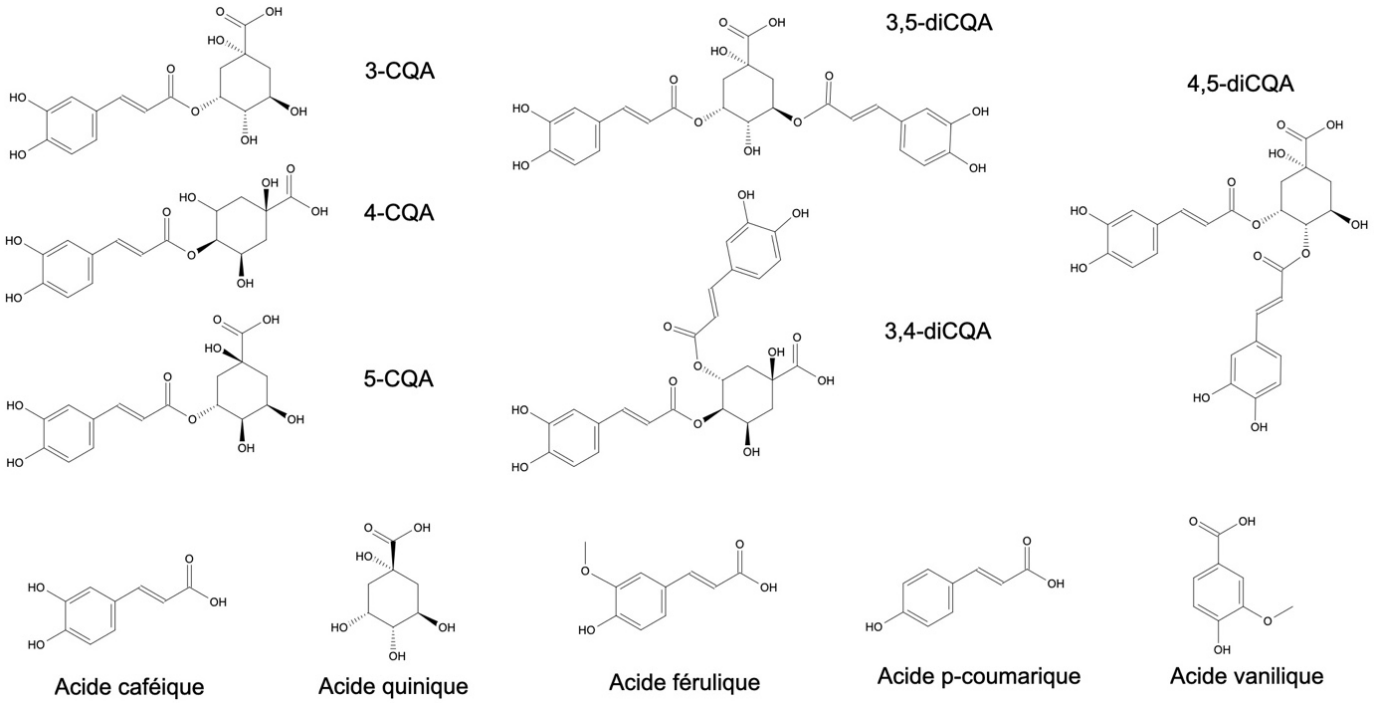

Figure 11. Différents composés phénoliques présents dans la composition du marc de café

Les composés phénoliques, sont largement considérés comme précieux en raison de leur large gamme d'activités physiologiques. En effet, ils ont été reconnus pour leur potentiel antioxydant, antimicrobien, anti-mutagène, anti-inflammatoire et anti-allergène. Ces propriétés ont conduit à leur utilisation dans divers domaines tels que la biologie, la médecine

et la technologie alimentaire (Bravo et al., 2013; Jeong et al., 2011; López-Barrera et al., 2016; Murthy and Naidu, 2012; Scalbert et al., 2005).

Les propriétés antioxydantes de l'acide chlorogénique sont attribuées à sa structure moléculaire unique, comprenant cinq groupes hydroxyles actifs et un groupe carboxyle.

La structure phénolique hydroxyle réagit facilement avec les radicaux libres, formant des radicaux libres d'hydrogène qui présentent un effet antioxydant. Cela permet à l'acide chlorogénique de neutraliser efficacement les radicaux hydroxyles et les anions superoxydes, démontrant ainsi de fortes propriétés antioxydantes (Miao & Xiang, 2020).

Afin d'évaluer l'activité antiradicalaire des extraits phénoliques obtenus à partir du marc de café, plusieurs tests ont été réalisés dans la littérature, notamment des tests basés sur un transfert d'électron appelés ET (electron transfer) tels que le test utilisant le 2,2-diphényl 1-pycrilhydrazyle (DPPH) ou l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS). Bien que les deux tests puissent être exprimés dans la même unité, ils ne possèdent pas la même spécificité. En effet, des extraits peuvent avoir une capacité antioxydante de 140,3 µmol Trolox/g de marc et 82,4 µmol Trolox/g de marc respectivement avec un dosage à l'ABTS et au DPPH (Bravo et al., 2013). Il existe aussi des tests antiradicalaires basés sur un transfert d'atome d'hydrogène qui sont appelés tests HAT (Hydrogen Atom Transfer). Le test ORAC a déjà été utilisé pour évaluer l'activité antioxydante d'un extrait phénolique obtenu à partir de marc de café, ainsi que deux autres tests (DPPH et FRAP, basés sur un transfert d'électron). Les valeurs mesurées sont de 24,2 µmol Trolox/g de marc, 36,7 µmol Trolox/g de marc et 4,28 µmol Trolox/g de marc pour les tests ORAC, DPPH et FRAP respectivement (Leyva-López et al., 2021). Il n'y a pas de test antioxydant unanimement préféré à tous les autres, car chaque test a ses avantages et ses inconvénients. Le choix du test dépendra de plusieurs facteurs, notamment la nature des échantillons, la sensibilité requise, le coût, la reproductibilité, les préférences réglementaires et les objectifs de l'étude. Il est généralement préférable de ne pas comparer les tests entre eux, mais de choisir celui qui répond le mieux aux critères recherchés (Dudonné et al., 2009; Thaipong et al., 2006). Malgré l'utilisation de radicaux synthétiques qui ne sont pas intrinsèquement liés aux systèmes alimentaires ou biologiques, les tests à l'ABTS et au DPPH sont largement adoptés en raison de leur simplicité, de leur reproductibilité acceptable et de leur coût abordable. La littérature scientifique

abonde en faveur de l'utilisation prédominante des radicaux synthétiques DPPH et ABTS dans les dosages des antioxydants (Floegel et al., 2011). Cette étude a tout de même démontré que le dosage ABTS a été plus adapté par rapport au dosage DPPH lorsqu'il est appliqué à une variété d'aliments d'origine végétale contenant des composés antioxydants hydrophiles, lipophiles et hautement pigmentés.

2. Les cascades de valorisation dans l'économie circulaire

2.1. L'économie circulaire

Notre économie industrielle a adopté un modèle linéaire de consommation des ressources, où les entreprises récoltent et extraient des matériaux, les utilisent pour fabriquer des produits, et les vendent aux consommateurs qui les jettent une fois qu'ils ne sont plus utiles. Ce schéma de "prendre-produire-jeter" a entraîné une détérioration de l'environnement, à la fois par l'épuisement des ressources naturelles et par la pollution causée par les déchets. Cependant, le concept d'économie circulaire propose une alternative à ce modèle linéaire, en transformant les déchets en ressources et en favorisant la réutilisation, le recyclage et d'autres pratiques durables. Comme le soulignent (Ghisellini et al., 2016) l'économie circulaire est souvent mal interprétée comme étant uniquement "une approche plus appropriée de la gestion des déchets". Cependant, l'économie circulaire vise plutôt à réduire l'épuisement des ressources naturelles et à préserver la valeur du capital naturel en minimisant la pollution. C'est une approche plus durable qui s'oppose au modèle linéaire traditionnel de l'économie (MacArthur, 2013; Murray et al., 2017).

2.1.1. Les principes de l'économie circulaire

L'économie circulaire repose sur des principes simples. Tout d'abord, son objectif central est d'éliminer les déchets. Les produits sont conçus pour être désassemblés et réutilisés, évitant ainsi la perte d'énergie et de travail associée à l'élimination et au recyclage. Deuxièmement, la circularité distingue clairement les composants consommables et durables d'un produit. Les consommables sont principalement composés d'ingrédients biologiques non toxiques, pouvant être renvoyés en toute sécurité dans la biosphère, tandis que les durables sont conçus pour être réutilisés et sont composés de matériaux techniques non-

biodégradables. Enfin, l'énergie nécessaire pour alimenter ce cycle doit être renouvelable, réduisant ainsi la dépendance aux ressources et renforçant la résilience du système (Kirchherr et al., 2017; MacArthur, 2013).

Le diagramme papillon (Figure 12) est une représentation visuelle utilisée dans le domaine de l'économie circulaire pour illustrer les principes et les stratégies de ce modèle économique durable (MacArthur, 2013).

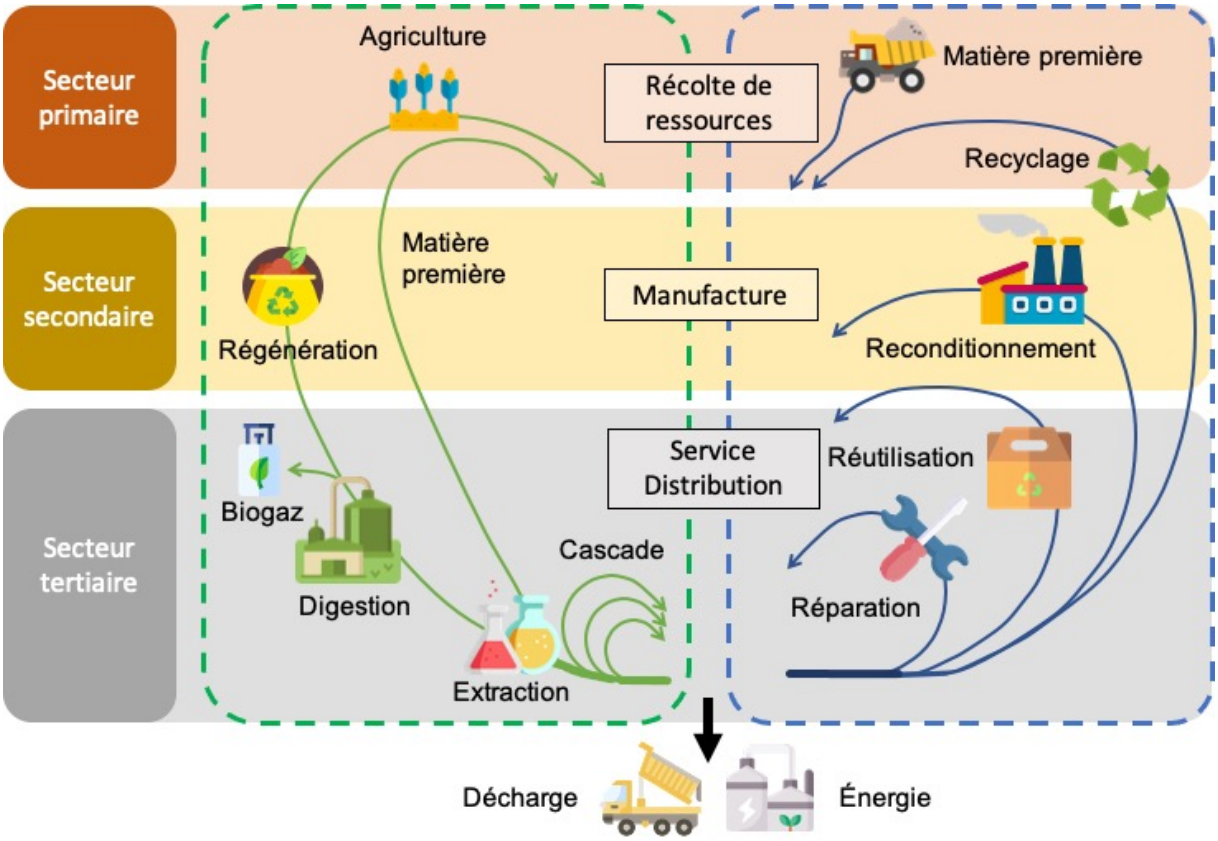

Figure 12. Diagramme papillon représentant l'économie circulaire d'après (MacArthur, 2013)

L'aile gauche, représentant la biosphère ou la biomasse, met l'accent sur les matériaux et les ressources d'origine biologique utilisés dans l'économie circulaire. Cela inclut les plantes, les arbres, les cultures agricoles et les déchets organiques. L'aile gauche se concentre sur la régénération des ressources naturelles, la promotion de l'agriculture durable, la production d'énergie renouvelable à partir de sources biologiques et d'autres pratiques respectueuses de

l'environnement. L'objectif de cette aile est de favoriser une utilisation responsable et durable des ressources biologiques, en minimisant les impacts environnementaux négatifs et en préservant la biodiversité.

L'aile droite, qui représente généralement la technosphère, symbolise les matériaux et les ressources d'origine technique utilisés dans l'économie circulaire. Ces matériaux incluent les métaux, les plastiques, les produits électroniques et d'autres produits manufacturés. L'aile droite met l'accent sur les processus de fabrication, de consommation et de gestion des déchets associés à ces matériaux. L'objectif principal de cette aile est de maximiser l'utilisation efficace des ressources techniques en favorisant la réutilisation, le recyclage, la remanufacturation et d'autres pratiques qui permettent de prolonger la durée de vie des produits et de réduire la quantité de déchets générée.

En combinant ces deux ailes, l'économie circulaire vise à créer une synergie entre les ressources techniques et biologiques, en favorisant leur utilisation efficiente et en minimisant la production de déchets. L'objectif ultime est de parvenir à un système économique circulaire, où les matériaux sont utilisés et réutilisés de manière efficace et où les ressources naturelles sont préservées et régénérées (Ekins, 2020).

Cette perception est renforcée par des principes tels que les 3R (réduire, réutiliser et recycler), initiative du gouvernement japonais qui remonte à 2004 (Ekins, 2020), souvent cités pour résumer l'approche fondamentale de l'économie circulaire (Blomsma & Brennan, 2017). Elle englobe, par exemple, une conception différente des produits ou des processus de consommation améliorés afin de réduire les déchets qui en résultent. Le premier R, "réduction", représente donc l'effort d'éco-efficacité dans la production et la consommation. Le deuxième R, "réutilisation", implique également une meilleure conception des produits et des modèles commerciaux pour une séquence cyclique de "désassemblage et de réutilisation". Le troisième R, "recycler", fait référence à "toute opération de valorisation par laquelle des déchets sont retraités pour en faire des produits, des matériaux ou des substances, que ce soit pour leur usage d'origine ou pour d'autres usages" (Geisendorf & Pietrulla, 2018). Cependant cette approche peut aussi être plus détaillée comme le propose (Reike et al., 2018) avec la typologie des 10R (Tableau 3).

Tableau 3. Description du concept des 10R (Reike et al., 2018)

	R	Concept	Description
Downcycling	R9	Ré-exploiter	Extraire des matériaux des décharges pour leur donner une nouvelle utilisation
	R8	Récupération (Énergie)	Capturer l'énergie présente dans les déchets et l'utiliser en incinération pour produire de l'énergie
	R7	Recycler	Traitement des flux de produits post-consommation ou de déchets pour récupérer des matériaux purs par le broyage, la fusion et d'autres processus de recyclage
	R6	Re-penser	Réutilisation de biens ou de composants abandonnés, adaptés à une autre fonction
Product upgrade	R5	Re-fabriquer	Démontage, vérification, nettoyage et remplacement ou réparation des composants d'un produit multi-composants dans un processus industriel
	R4	Reconditionner	Réfection d'un produit multi-composants en remplaçant des composants spécifiques pour une amélioration globale du produit
	R3	Réparer	Réparation de produits en remplaçant des éléments après de légers défauts
User choices	R2	Re-vendre Re-utiliser	Permettre la revente et la réutilisation de produits qui nécessitent peu d'adaptation et qui fonctionnent aussi bien que neufs
	R1	Réduire	Encourager les consommateurs à acheter moins et les producteurs à refuser l'utilisation de matériaux ou de conceptions spécifiques
	R0	Refuser	Encourager les consommateurs à acheter moins et les producteurs à refuser l'utilisation de matériaux ou de conceptions spécifiques

Afin de regrouper certaines de ces idées variées, (Blomsma & Brennan, 2017) décrivent l'économie circulaire comme un "concept-parapluie" essentiellement ancré dans les préoccupations liées à la gestion des ressources et des déchets. Les stratégies de l'économie circulaire, appelées stratégies de prolongation de la vie des ressources (RLES de l'anglais « resource life-extending strategies »), cherchent "principalement et de plus en plus" à prolonger la durée de vie des ressources, par exemple : la réutilisation, le recyclage, la réparation, la valorisation énergétique des déchets, les approches axées sur la longévité des produits et la cascade des substances (c'est-à-dire la transformation des matériaux à travers différentes phases d'utilisation) (Ekins, 2020).

2.1.2. La notion de biodéchets

Si l'on se penche sur la partie biosphère de l'économie circulaire, on peut voir qu'une importante partie de sa mise en place fait appel à la valorisation des biodéchets en général et plus particulièrement des coproduits. L'exploitation de ces coproduits, souvent ici de l'industrie, peut être optimisée de manière à économiser les ressources naturelles (Renaud, 2019).

En France, l'article L. 541-1-1 du code de l'environnement définit les biodéchets comme : "Les déchets non dangereux biodégradables de jardin ou de parc, les déchets alimentaires ou de cuisine provenant des ménages, des bureaux, des restaurants, du commerce de gros, des cantines, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que les déchets comparables provenant des usines de transformation de denrées alimentaires."

Les coproduits sont des produits qui sont générés de manière prévisible lors d'un processus de transformation, en même temps qu'un ou plusieurs produits. On distingue généralement les coproduits de première transformation, qui sont issus de la transformation d'une matière première agricole (par exemple, les pulpes de betteraves générées lors de la production de sucre à partir de betteraves), des coproduits de deuxième transformation, qui sont produits par des industries alimentaires utilisant différentes matières premières, qu'elles soient brutes ou issues de la première transformation (par exemple, les drêches générées lors de la production de bière à partir du malt ou encore du marc de café lors de la préparation du café) (Renaud, 2019).

2.1.3. La valorisation des biodéchets en Europe et en France

En Europe, l'économie circulaire a principalement émergé en Allemagne en 1976 avec la loi sur l'élimination des déchets, tandis qu'au niveau de la Communauté européenne, l'économie circulaire a été promue beaucoup plus tard, grâce à la directive sur les déchets 2008/98/CE (Pinjing et al., 2013) et plus spécifiquement avec le paquet économie circulaire (EC, 2014; Ghisellini et al., 2016). Le projet NoAW (No Agro-Waste), financé par la Commission européenne, est motivé par l'exigence d'une société "presque sans déchets" et se concentre sur le développement d'approches innovantes permettant de convertir les déchets et sous-produits agricoles en produits bioéconomiques éco-efficaces (Donner et al., 2020).

Sans valorisation, la mise en décharge des biodéchets est à l'origine d'émissions de gaz à effet de serre (GES) : le tassement des déchets provoque également la fermentation de déchets alimentaires dans un milieu sans oxygène, créant ainsi des conditions favorables à l'émission de méthane dans l'atmosphère. Ce gaz a de plus un pouvoir de réchauffement global 25 fois supérieur à celui du CO_2. De même, l'incinération de ces déchets produit également des GES et notamment du CO_2 lors de leur combustion. Depuis le 1er janvier 2012, les personnes qui produisent ou détiennent une quantité importante de bio déchets ont l'obligation de trier ces bio déchets et de les faire valoriser dans des filières adaptées (méthanisation, engrais, etc…) (Figure 13).

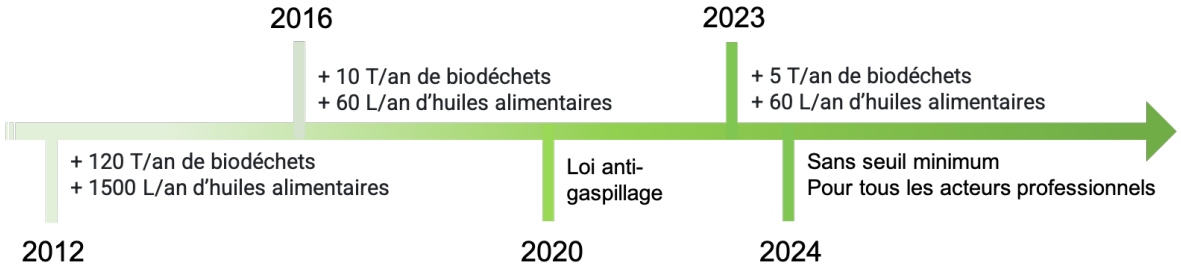

Figure 13. Évolution du cadre légal de valorisation obligatoire des bio déchets en France

Pour éviter l'élimination des biodéchets et permettre leur valorisation agronomique en tant que fertilisant, il est nécessaire de mettre en place le tri à la source.

Conformément à la loi anti-gaspillage du 10 février 2020, également appelée loi relative à la lutte contre le gaspillage et à l'économie circulaire, la généralisation du tri à la source est prévue en France d'ici le 1er janvier 2024 pour tous les producteurs de déchets, qu'il s'agisse des collectivités, des administrations, des ménages, des professionnels, etc. Cette mesure vise à promouvoir une gestion plus durable des déchets et à favoriser la transition vers une économie circulaire.

En parallèle, pour favoriser le développement de la bioéconomie, la France a mis en place en 2017 une stratégie nationale, accompagnée d'un plan d'action pour la période 2018-2020.

Cette stratégie vise à être cohérente avec d'autres initiatives telles que la stratégie nationale de mobilisation de la biomasse et la feuille de route pour l'économie circulaire.

2.1.4. La valorisation du marc de café en France

Actuellement, il n'existe pas de filière nationale généralisée pour la valorisation du marc de café en France, comparable à celles qui existent pour d'autres matériaux recyclables ou pour l'eau. Le marc de café non trié en France, est incinéré avec les autres déchets. Cependant, de plus en plus d'initiatives locales et d'entreprises commencent à se mobiliser pour collecter et valoriser ce biodéchet à l'échelle régionale ou même locale.

Au niveau individuel, la valorisation du marc de café comme engrais est une pratique courante. Beaucoup de personnes utilisent le marc de café comme amendement pour leurs jardins et plantes en raison de ses propriétés bénéfiques pour le sol.

Pour les entreprises de restauration, de cafés ou de brasseries, la récupération du marc de café pour une utilisation similaire est également une méthode de valorisation qui gagne en popularité. Le programme « Du marc pour votre jardin » initié par Starbucks® est un excellent exemple de valorisation à échelle locale réalisée par une grande chaîne de café. Cette initiative permet à ses clients de venir récupérer des sacs de marc frais.

Des réseaux de collecte et de transformation émergent autour des lieux de consommation de café, donnant naissance à une série d'initiatives remarquables. L'entreprise Gecco, présente dans les Hauts-de-France, se distingue en convertissant le marc en buchettes allume-feu. De même, le partenariat entre les entreprises Smart & Green et Cèdre en Île-de-France offre une approche similaire. Lemon Tri se démarque en collectant le marc des machines à café automatiques pour en faire un substrat utilisé dans la culture de pleurotes. La boîte à champignons, offre aussi ce type de valorisation. D'autres concepts comme Les Joyeux Recycleurs, installent des poubelles de tri dans les bureaux d'entreprise en Île-de-France, intégrant par la suite un processus de méthanisation en conjonction avec d'autres déchets alimentaires.

2.1.5. Les différents modèles économiques d'une valorisation des biodéchets.

D'après (Donner et al., 2020), il existe plusieurs catégories de modèles économiques circulaires différents dans leur manière de créer de la valeur et/ou dans leur structure organisationnelle. La centrale de biogaz en est un exemple : les agriculteurs et/ou autres acteurs du secteur agroalimentaire, produisant une quantité importante de sous-produits agricoles vont les valoriser grâce à des processus de digestion anaérobie (Bolzonella et al., 2013). D'autres ont aussi vu le jour, comme l'upcycling, qui consiste à convertir des sous-produits de faible valeur, en matériaux de haute valeur, plutôt que de les utiliser comme matières premières (downcycling) (Oyenuga & Bhamidimarri, 2007).

Si l'on associe plusieurs acteurs et plusieurs procédés cela peut rendre le modèle économique plus rentable. On parle alors de bioraffinerie environnementale ou d'agroparc. Une bioraffinerie est une un modèle industriel qui utilise diverses technologies pour transformer la biomasse en produits commercialisables et en énergie, tout en visant à maximiser la valeur ajoutée dans une perspective de durabilité environnementale, économique et sociale (Garcia-Bernet & Daboussi, 2016). Tandis que l'agroparc est un lieu où les activités agricoles et économiques liées sont regroupées de manière organisée. Il favorise une utilisation efficace des ressources naturelles en fermant les cycles de l'eau, des minéraux et des composés gazeux, tout en réduisant au maximum l'utilisation d'énergie fossile grâce au traitement des déchets et des sous-produits (Smeets, 2010).

Ces deux derniers modèle peuvent être complémentaires dans certains cas et permettent indépendamment ou ensemble de promouvoir un type de valorisation particulier, la valorisation en cascade (Odegard et al., 2012).

2.2. Principes et applications d'une cascade de valorisation

2.2.1. Définition, concept et principes

Le but est de pouvoir valoriser au mieux ces biodéchets qui sont produits en quantités croissantes. Le concept de cascade de valorisation repose sur l'idée de réutiliser de manière séquentielle les qualités restantes des ressources déjà utilisées. La cascade se compose d'un modèle régit par quatre dimensions/principes qui guident l'exploitation et la conservation des

ressources (Figure 14). Il peut s'appliquer à toutes les ressources, qu'elles soient naturelles ou fabriquées par l'homme (Sirkin & ten Houten, 1994) :

1. Ce concept offre une approche systématique pour optimiser l'utilisation des ressources et promouvoir la durabilité. Le concept de « cascading » des ressources est inspiré de l'analogie d'une cascade d'eau qui descend de différents niveaux jusqu'à atteindre un équilibre.
2. Il repose sur les dimensions de la qualité des ressources et du temps d'utilisation. En utilisant cette approche, il est possible de maximiser le profit d'une ressource et de favoriser sa conservation.
3. Pour une économie efficace des ressources, il est possible de récupérer et de valoriser la qualité des ressources vers des niveaux supérieurs de la cascade ou vers d'autres cycles de substances. Cela permet d'étendre la durée de vie utile des ressources et de minimiser les pertes. La récupération des ressources peut se faire à travers des processus de recirculation, de régénération et de retraitement. De plus, cette récupération peut être transmise à d'autres cascades (secondaires), ce qui permet d'optimiser davantage l'utilisation des ressources disponibles.
4. Pour garantir la durabilité, il est important de prendre en compte le rythme de consommation des ressources par rapport à leur capacité de renouvellement. Si les ressources sont utilisées plus rapidement qu'elles ne peuvent se régénérer pour les générations futures, cela compromet la durabilité.

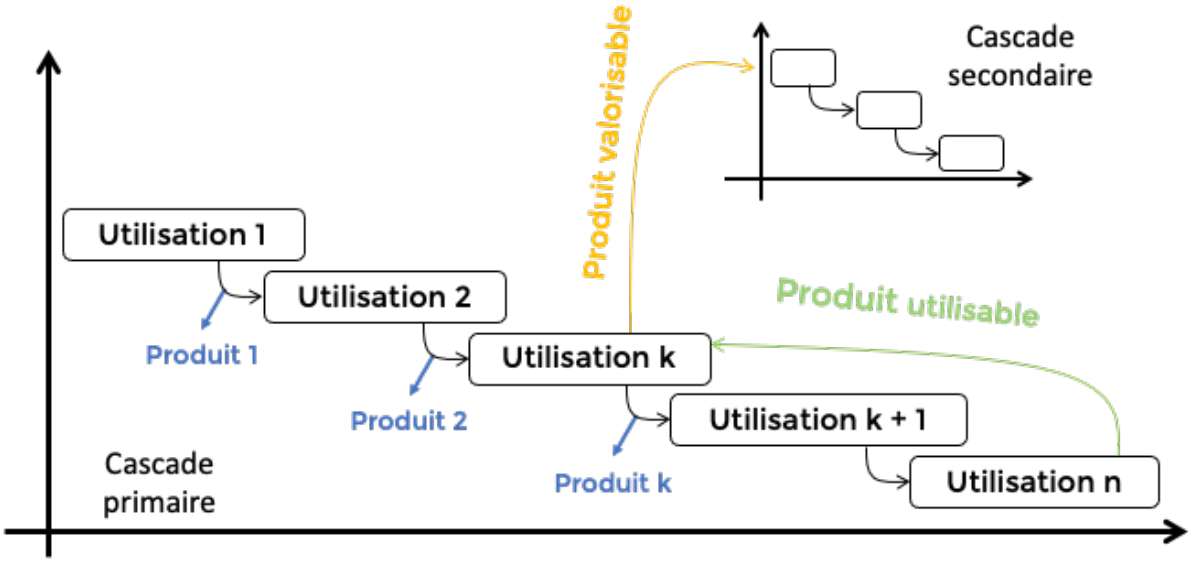

Figure 14. Schéma de valorisation en cascade mettant en avant les 3 premiers principes théoriques de son utilisation d'après (Sirkin & ten Houten, 1994)

Ce modèle de valorisation abouti permet aussi d'être corrélé au cadre des 10R de (Reike et al., 2018) précédemment décrites comme le soutient et l'explicite (Campbell-Johnston et al., 2020).

2.2.2. Application de la cascade de valorisation

L'utilisation en cascade d'une biomasse peut se décliner en trois formes complémentaires, telles que décrites par (Garcia-Bernet & Daboussi, 2016; Odegard et al., 2012) :

La cascade dans le temps : cette approche consiste à utiliser la biomasse de manière séquentielle pour différentes applications, ce qui prolonge sa durée de vie. Il est préférable de privilégier les utilisations qui préservent le plus d'options possibles en fin de vie de la biomasse.

La cascade en valeurs : Cette approche vise à optimiser la valeur de la biomasse en considérant différents aspects tels que les valeurs économiques, environnementales et socio-économiques.

La cascade en fonctions : Cette approche implique la coproduction de différents flux fonctionnels à partir d'une seule biomasse, en utilisant des bioraffineries.

Dans la pratique, la cascade est principalement étudiée sous la forme de bioraffinerie et est beaucoup appliquée à l'industrie du bois et ses sous-produits (Bais-Moleman et al., 2018; Brar et al., 2022; Jarre et al., 2020; Teuber et al., 2016). D'autres recherches se sont penchées sur l'utilisation secondaire des textiles (Fischer & Pascucci, 2017) ou encore de déchets de l'agroalimentaire (Donner et al., 2020; Egelyng et al., 2018; Venkata Mohan et al., 2016). Cependant, la manière dont le principe de la cascade est opérationnalisé est rarement détaillée par les auteurs mentionnés (Campbell-Johnston et al., 2020).

Dans ces systèmes industriels favorisant l'économie circulaire, des industries qui travaillent traditionnellement en tant qu'entités séparées peuvent s'engager dans des interactions complexes d'échange de ressources (matériaux, eau, énergie et sous-produits), appelées "symbiose industrielle" ou agroparc, dans le but d'obtenir des avantages économiques et environnementaux (Lowe et al., 1995). Un exemple est donné par (Husgafvel et al., 2016) avec des résidus tels que les cendres volantes issues de la production d'énergie biomasse et les boues issues des processus de traitement des eaux usées de l'industrie des produits forestiers. La symbiose industrielle est également appelée écologie industrielle par certains auteurs (Ghisellini et al., 2016).

Dans le cas d'une cascade de valorisation, on peut dire que la valeur est maximale lorsque le plus grand nombre possible d'options pour une utilisation ultérieure est laissé ouvert. Cela signifie que la valeur peut ne pas toujours être une valeur économique, bien que ce soit souvent le cas (Odegard et al., 2012). Cependant, dans la politique de l'économie bio-basée, l'objectif d'atteindre la plus grande valeur ajoutée reste central (Figure 15). Ce principe de la pyramide suppose que tout d'abord, la biomasse est utilisée pour les applications les plus intéressantes sur le plan économique (haute valeur ajoutée), après quoi les résidus sont utilisés, dans la mesure du possible, pour d'autres applications de moindre valeur (Luzardo & Venselaar, 2012). C'est donc dans une logique liée à ces deux axes que la cascade de valorisation va s'établir. Obtenir plusieurs options de valorisation et pouvoir en tirer le plus d'avantages économiques pour rendre la cascade viable et industriellement intéressante.

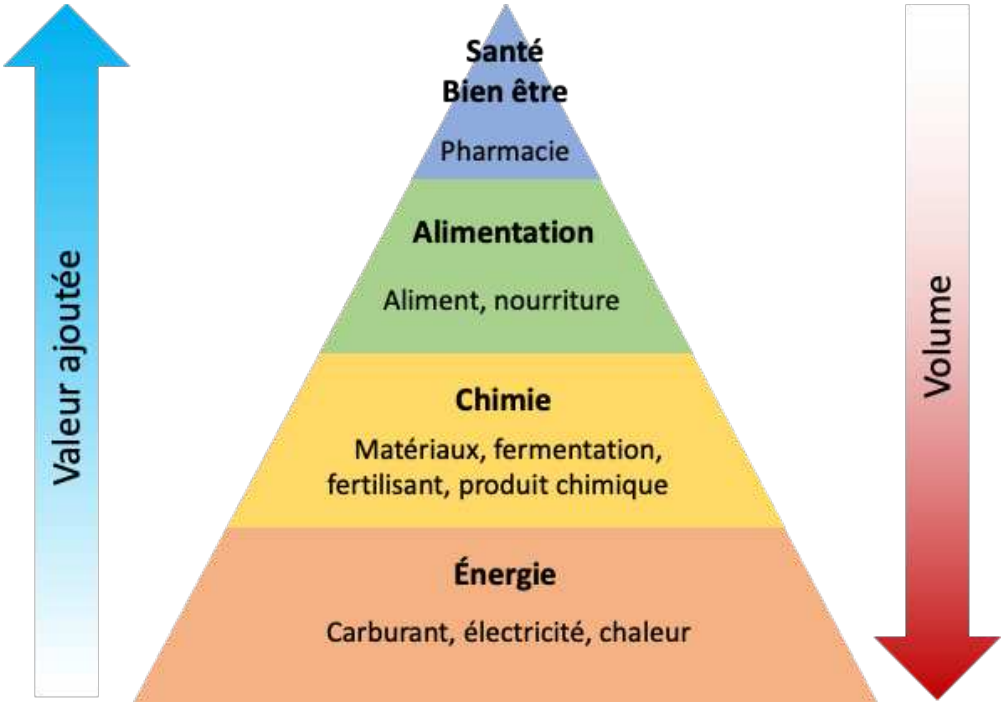

Figure 15. Pyramide de valeur bio-sourcée adaptée de (Ministerie van Landbouw, 2007)

2.2.3. Exemples de cascades de valorisation de biomasse

2.2.3.1. Cascade à partir de végétaux

Dans la littérature scientifique, on retrouve l'étude de plusieurs cascades de valorisation appliquées à diverses formes de biomasses. Comme par exemple à partir de végétaux avec le cas du bambou décris par (Xu et al., 2020). Dans cette étude on retrouve le bioraffinage du bambou initié par l'utilisation d'un acide dilué et de peroxyde d'hydrogène alcalin, qui permet d'obtenir successivement des xylo-oligosaccharides (XOS), de la lignine, du glucose et un précurseur de cathode lithium-soufre. Le bambou est d'abord soumis à une hydrolyse à l'acide dilué, ce qui permet d'obtenir un rendement élevé de XOS (intéressants dans le domaine du biocontrôle par exemple). Ensuite, la lignine est extraite à partir de la biomasse traitée à l'aide de peroxyde d'hydrogène alcalin. En parallèle, une hydrolyse enzymatique de la cellulose, permet d'obtenir du glucose. Enfin, les résidus de cellulose enzymatique sont utilisés pour synthétiser un biocharbon dopé à l'azote qui fonctionne comme cathode lithium-soufre pour le stockage d'énergie.

2.2.3.2. Cascade à partir de biodéchets polluants

La cascade de valorisation peut aussi être appliquée pour se débarrasser de biodéchets polluants comme le cas des algues brunes (Pardilhó et al., 2023) :

Au cours des dernières années, l'accumulation de déchets de macroalgues marines (dérives et échouages) a augmenté, polluant les plages pendant des semaines voire des mois par leur décomposition naturelle (Pardilhó et al., 2021b). L'objectif de l'étude était de réaliser des extractions en cascade afin d'obtenir plusieurs extraits d'intérêt. Dans un premier temps, une extraction à l'aide de n-hexane (1:20 (p/v)) a été réalisée pour extraire la fraction lipidique. Ensuite, une extraction au méthanol (1:20 (p/v)) a été effectuée pour retirer les pigments (comme le fucoxanthine). Enfin, une extraction à l'eau (1:100 (p/v)) a été réalisée suivie d'une précipitation à l'éthanol (1:3 (v/v)) pour récupérer les polysaccharides (principalement composés de galactose et de glucose). La fraction solide restante contient les minéraux et autres composants solides non extraits.

2.2.3.3. Cascade à partir de coproduit

On retrouve très souvent des recherches sur l'application de la cascade sur des coproduits comme la bagasse d'agave (Fernández-Rodríguez et al., 2017) :

Lors du procédé de fabrication de la téquila à partir d'agave, plusieurs coproduits sont générés. Dans cette étude, l'utilisation de la biomasse de l'agave bleu, notamment la bagasse et les fibres des feuilles, ont servi pour la production de nanocellulose. La bagasse d'agave est la fibre résiduelle qui reste après avoir broyé et extrait les sucres des têtes d'agave cuites. Elle représente environ 40% du poids total de l'agave broyé sur la base du poids humide (Iñiguez-Covarrubias et al., 2001). Dans le cadre de ce processus, une cascade d'extraction a été mise en place pour obtenir la liqueur noire des co-produits. Tout d'abord, la lignine a été extraite de la bagasse et des fibres de feuilles de l'agave grâce à un procédé organosolv et de blanchiment. Les liqueurs noires ont été collectées à chaque étape de la cascade (cuisson et blanchiment), permettant d'isoler la lignine par précipitation sélective. Des rendements élevés de récupération de lignine ont été obtenus, avec environ 90% pour la bagasse et 75% pour les feuilles. Il est important de noter que les rendements d'extraction de lignine ont diminué progressivement au fur et à mesure de la séquence de blanchiment (Fernández-Rodríguez et al., 2017).

Un autre flux important lié à l'industrie agroalimentaire est le marc de raisin, qui peut faire l'objet d'une valorisation en cascade (Monari et al., 2020). Les raisins sont principalement utilisés dans la production de vin, où environ 20% de leur poids se retrouve sous forme de marc (García-Lomillo & González-SanJosé, 2017; Teixeira et al., 2014). Cette étude visait à valoriser intégralement les résidus de marc de raisin *Garganega* en récupérant des extraits de phénols bioactifs et en testant les résidus d'extraction de fibres solides dans des formulations composites destinées à des applications d'emballage. Les extraits de phénols ont été obtenus par extraction à l'aide de solvants et par extraction liquide sous pression, et leurs compositions phytochimiques ont été comparées en termes de quantité totale de phénols, flavonoïdes, flavanols, anthocyanes, acides hydroxycinnamiques et sucres réducteurs. Le rendement en phénols le plus élevé a été obtenu par extraction à l'aide d'un solvant à 75% d'acétone (v/v), avec un rapport solide/liquide de 1:5 (p/v) et une incubation de 2 heures à 50°C. Le résidu solide fibreux de l'extraction a été utilisé pour la préparation de composites par mélange à l'état fondu avec le polymère PHBV (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) renouvelable et biodégradable, selon une approche respectueuse de l'environnement.

2.2.4. Les différentes cascades de valorisation du marc de café

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses cascades de valorisation du marc de café sous forme de bioraffineries théoriques ont été développées. Dans certaines études, la cascade a été réalisée dans son ensemble, dans d'autres une revue des procédés et de leur potentiel enchaînement en cascade est proposée (Atabani et al., 2019; Massaya et al., 2019; Mata et al., 2018; Rajesh Banu et al., 2020; Zabaniotou & Kamaterou, 2019). Le Tableau 4 résume les références qui mettent en œuvre ces cascades, ainsi que les processus associés et les produits générés.

Tableau 4. Différentes cascades proposées à partir du marc de café

Auteur et année	Processus séquentiel de valorisation	Produits obtenus
(Kondamudi et al., 2008)	1. Extraction au *n*-hexane/éther	Tryglycérides
A	1.1. Transesterification (PL)	Biodiesel/glycérol
	1.1.1. Vaporeformage glycérol	Hydrogen
	2. Séchage (PS)	Granulés combustibles
(Vardon et al., 2013)	1. Extraction au *n*-hexane	Huile de café
A	1.1. Transeterification (PL)	Biodiesel
	2. Pyrolyse lente (PS)	Huile, biochar
(Kwon et al., 2013)	1. Hydrolyse acido-enzymatique	Sucres simples
A	1.1 Fermentation des sucres (PL)	Bioéthanol
	2. Extraction au *n*-hexane (PS)	Huile de café
	2.1. Transestérification (PL)	Biodiesel
(M. Haile, 2014)	1. Extraction au *n*-hexane/isopropanol	Huile de café
A	1.1. Transeterification (PL)	Biodiesel/glycérol
	1.2. Mélange glycérol et marc (PS)	Granulés combustibles
(Obruca et al., 2014)	1. Extraction *n*-hexane	Huile de café
R	1.1. Fermentation *C. necator H16* (PL)	PHAs
	2. Extraction éthanol (PS)	Polyphénols
	3. Hydrolise acido-enzymatique (PS)	Sucres
	3.1. Fermentation *S. roseus* (PL)	Caroténoïdes
	4. Chaudière industrielle (PS)	Énergie/chaleur
(Burniol-Figols et al., 2016)	1. Extraction éthanol	Acides chlorogéniques
	2. Hydrolyse acide (PS)	Sucres
	2.1. Fermentation *S. cerevisiae* (PL)	Bioéthanol
(N. S. Caetano et al., 2017)	1. Extraction solvant polaire	Antioxydants, caféine
R	1. Culture champignons	*Pleurotus sp*
	2. Extraction solvant apolaire (PS)	Huile de café
	2.1. Transeterification (PL)	Biodiesel/Glycérol
	2.1.1. Vaporeformage glycérol	Hydrogen
	3. Hydrolyse/fermentation (PS)	Bioéthanol
	3. Pyrolyse/torrefaction (PS)	Biochar/huile
	3. Séchage (PS)	Granulés combustibles
(Karmee, 2018)	1. Digestion anaérobie	Biogas
R	1. Extraction n-hexane/diethyl ether	Huile de café
	1.1. Esterification/transesterification (PL)	Biodiesel
	1.1. Hydrodéoxygénation (PL)	Diesel renouvelable
	2. Pyrolyse (PS)	Biochar/huile
	2. Fermentation (PS)	Bioéthanol

Auteur et année	Processus séquentiel de valorisation	Produits obtenus
(Kourmentza et al., 2018)	1. Extraction solvant polaires	Phénols
R	2. Méthanisation (PS)	Biogas
	2. Culture champignons (PS)	Champ coméstibles/enzymes
	2. Extraction au *n*-hexane (PS)	Huile de café
	2.1. Transesterification (PL)	Biodiesel
	2.1. Fermentation bactérie (PL)	PHAs
	3. Hydrolyse (PS)	Sucres
	3.1. Fermentation levure (PL)	Bioéthanol
	3.1. Fermentation bactérie (PL)	PHAs
	4. Pyrolyse (PS)	Biochar
(Battista et al., 2020)	1. Extraction *n*-hexane ou éthanol-iso-propanol	Huile de café
A	2. Hydrolyse acido-enzymatique (PS)	Sucres
	2.1. Fermentation *S. Cerevisiae* (PL)	Bioéthanol
	3. Digestion anaérobie (PS)	Biogaz
(Battista et al., 2021)	1. Extraction *n*-hexane	Huile de café
A	1.1. Transeterification (PL)	Biodiesel/glycérol
	2. Hydrolyse acido-enzymatique (PS)	Sucres
	2.1. Biotransformation (PL)	Produits haute valeur ajoutée
	3. Digestion anaérobie (PS)	Méthane
(López-Linares et al., 2021)	1. Extraction assistée par micro-ondes avec NADES	Antioxydants
A	2. Hydrolyse acido-enzymatique (PS)	Sucres
	2.1. Fermentation *C. beijerinckii* (PL)	Butanol

NB : PHAs = acides poly-hydroxylés ; Champ = champignons ; PL = Phase liquide ; PS = Phase solide ; R = revue littéraire regroupant et assemblant des procédés étudiés indépendamment ; A = Articles réalisant et caractérisant la cascade dans son ensemble ainsi que les produits générés ; Deux procédés ayant la même annotation numéraire indique qu'un choix peut être fait entre l'un ou l'autre

Bien que certaines cascades puissent présenter des similitudes, l'ordre d'application des procédés diffère souvent, offrant ainsi un large éventail de choix. On observe également que certains ouvrages laissent la porte ouverte à plusieurs possibilités et ne se limitent pas à une seule option dans la construction de la cascade, ce qui devra cependant être fait en cas d'industrialisation.

Récemment, certaines recherches ont exploré la mise en place théorique de cascades à l'échelle industrielle, ce qui a permis de mieux comprendre les contraintes économiques qui y sont associées (Taifouris et al., 2021; Yeoh & Ng, 2022). La première étude explore cinq produits potentiels issus des SCG - extrait naturel sec, pigment naturel sec pour l'industrie

textile, biogaz, digestat et énergie électrique - en utilisant trois processus distincts. Les coûts opérationnels estimés s'élèvent à 4,59 millions d'euros par an, accompagnés d'une exigence d'investissement de 13,97 millions d'euros.

La deuxième étude s'axe sur deux configurations, une sur la production de biodiesel et d'électricité, et une autre sur la production de biodiesel et de produits chimiques à haute valeur ajoutée. Celle avec une production d'énergie offre les meilleures performances. Elle présente une valeur actualisée nette de 3,1 millions de livres sterling et des émissions de GES inférieures de 85% et 13% respectivement par rapport à l'enfouissement des SCG et au biodiesel conventionnel.

3. L'extraction solide-liquide des composés phénoliques du marc de café

L'extraction solide-liquide est un processus fondamental utilisé dans de nombreux domaines, allant de l'industrie chimique à la préparation des aliments en passant par le milieu pharmaceutique. Il s'agit d'une technique permettant de séparer les composants souhaités d'un solide en les extrayant à l'aide d'un solvant approprié. Elle permet aussi d'éliminer des composants non souhaités comme la caféine dans le café décaféiné par exemple. Cette méthode repose sur la différence de solubilité entre les substances présentes dans le solide, ce qui permet d'isoler les composés recherchés de manière efficace (Chanioti et al., 2014; Leybros & Frémeaux, 1990).

L'extraction solide-liquide peut être utilisée pour diverses applications. Dans l'industrie pharmaceutique, par exemple, elle permet d'extraire des principes actifs à partir de matières premières végétales, telles que les plantes médicinales. De même, dans l'industrie alimentaire, elle est utilisée pour obtenir des arômes, des colorants ou des additifs à partir de différentes sources naturelles (Aguilera, 2003; Seidel, 2012).

3.1. Principes, mécanismes et cinétique de l'extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide est un processus physique où des substances sont transférées d'une phase solide vers une phase liquide à l'aide d'un solvant d'extraction. Lorsque le solvant entre en contact avec le solide, les substances solubles passent dans la phase liquide, réduisant leur concentration dans la phase solide et l'augmentant dans la phase liquide. Ce transfert de matière se fait par diffusion moléculaire (Leybros & Frémeaux, 1990). L'extraction est un processus dynamique qui atteint un équilibre lorsque les deux phases se stabilisent, mais si le solvant est continuellement renouvelé, l'extraction se poursuit jusqu'à ce que la phase solide soit épuisée. L'extraction solide-liquide réalisée à partir d'une matrice végétale n'est pas sélective, car elle extrait également d'autres substances en plus de celles recherchées à partir de la phase solide vers le solvant (Dibert et al., 1989; Maillard & Berset, 1995).

Le processus d'extraction solide-liquide implique généralement plusieurs étapes : la préparation du solide, la mise en contact du solide avec le solvant et la séparation du liquide extrait du solide résiduel. La préparation du solide peut impliquer un broyage ou un concassage afin d'augmenter la surface de contact et faciliter l'extraction ultérieure. Une fois le solide préparé, il est mis en contact avec le solvant dans un équipement approprié, tel qu'un extracteur. Le solvant, qui peut être choisi en fonction de sélectivité pour les composants souhaités, est généralement chauffé ou agité pour accélérer l'extraction. Quand l'extraction est terminée, l'extrait liquide est séparé du solide résiduel à l'aide de techniques de séparation tel que la filtration ou la centrifugation par exemple (Leybros & Frémeaux, 1990).

Au cours de la mise en contact entre le solvant et le solide, plusieurs mécanismes vont intervenir et influencer la cinétique de l'extraction (Aguilera, 2003; Chanioti et al., 2014) :

- Pénétration du solvant : ce mécanisme correspond à l'hydratation du solide. Il dépend de l'état de la matière solide, de la surface d'échange ainsi que de la viscosité et la polarité du solvant.

- Diffusion interne : il s'agit de la diffusion du soluté à travers la matrice solide vers la surface de contact avec la phase liquide. Ce mécanisme est généralement limitant et contrôle la vitesse globale de l'extraction solide-liquide.
- Diffusion externe : ce mécanisme fait référence à la diffusion du soluté depuis la surface du solide vers la phase liquide. Il est principalement influencé par le gradient de concentration à l'interface solide-liquide.
- Adsorption/désorption : certains solutés peuvent être adsorbés à la surface des particules solides. Lors de l'extraction, ces solutés peuvent être désorbés de la surface solide et transférés dans la phase liquide.
- Réactions chimiques : dans certains cas, des réactions chimiques peuvent se produire entre le soluté et les composants de la matrice solide ou du solvant, entraînant ainsi des changements dans la composition de la solution extraite.

Il est important de noter que la contribution relative de chaque mécanisme peut varier en fonction des propriétés physico-chimiques du système solide-liquide étudié.

La description mathématique de l'extraction solide-liquide est très complexe en raison de nombreuses difficultés. Cela comprend la forme irrégulière de la source solide, la granulométrie de la phase solide (particules de tailles différentes), la structure spécifique de chaque source solide, le changement de structure lors de l'extraction (gonflement considérable de la matrice végétale dû à la pénétration du solvant), les variations de la teneur en substance d'intérêt dans la source solide, l'extraction compétitive simultanée d'autres substances du solide, et l'influence du traitement préliminaire mécanique ou thermique. Par conséquent, il est pratiquement impossible de prédire exactement la vitesse d'extraction dans un système non étudié (Chanioti et al., 2014; Leybros & Frémeaux, 1990). Une méthode relativement simple pour pouvoir décrire la diffusion des molécules ciblées est de réaliser une approche expérimentale pour chaque combinaison solide-liquide afin de trouver les meilleures conditions opératoires en variant les paramètres du procédé. L'expression de la concentration en fonction du temps de contact entre les deux phases permet de décrire la cinétique d'extraction (Castillo-Santos et al., 2017).

La durée de l'extraction solide-liquide est déterminée par l'étape la plus lente qui contrôle la vitesse de l'opération, ce qui est souvent l'étape de diffusion interne dans la matrice

végétale. Par conséquent, le modèle de diffusion est souvent utilisé pour décrire mathématiquement l'extraction (Castillo-Santos et al., 2017; Chanioti et al., 2014).

3.2. Paramètres influençant l'extraction solide-liquide des polyphénols

Il est crucial de contrôler différents paramètres lors d'une opération d'extraction solide-liquide afin d'assurer une extraction efficace. Dans ce paragraphe, nous mettrons en évidence certains paramètres opératoires qui ont une influence spécifique sur l'extraction des polyphénols. L'extraction constitue l'une des premières étapes pour isoler les composés phénoliques, et une procédure d'extraction bien optimisée permet d'augmenter les rendements d'extraction tout en préservant la stabilité des polyphénols.

3.2.1. La nature du solvant

Le choix d'un solvant d'extraction repose sur plusieurs critères essentiels. Tout d'abord, la solubilité et la diffusivité des composés ciblés dans le solvant sont des aspects fondamentaux. Par exemple, les huiles végétales composées de triglycérides d'acides gras sont généralement extraites avec de l'hexane, tandis que des alcools plus polaires sont utilisés pour l'extraction des composés antioxydants que sont les polyphénols (Antolovich et al., 2000; Mokrani & Madani, 2016). De plus, les propriétés physiques comme la faible tension interfaciale et la viscosité du solvant sont importantes. Le solvant doit être capable de mouiller les solides, de pénétrer à travers les pores et les capillaires de la matrice, et sa faible viscosité doit favoriser les taux de diffusion dans la phase liquide (Leybros & Frémeaux, 1990).

D'autres facteurs à considérer sont la récupération du solvant, car il sera réutilisé lors d'extractions ultérieures. Idéalement, le solvant devrait être non toxique, non dangereux, non réactif, non inflammable, sans danger pour l'environnement et abordable. Il est également crucial de limiter les pertes de solvant grâce à une meilleure conception du processus (Chanioti et al., 2014; Seidel, 2012).

En ce qui concerne les lois sur les solvants d'extraction utilisés dans le domaine agroalimentaire, elles sont principalement axées sur les exigences de santé humaine. Certaines substances telles que le propane, le butane, l'acétate de propyle, l'acétate d'éthyle,

l'éthanol, le dioxyde de carbone, l'acétone et l'oxyde nitreux sont acceptables en petites quantités résiduelles. Cependant, des solvants tels que l'hexane, l'acétate de méthyle, l'éthylméthylcétone et le dichlorométhane peuvent être acceptables dans des conditions spécifiques et avec des limitations en raison de leur toxicité inhérente pour les produits pharmaceutiques et alimentaires (Chanioti et al., 2014).

Pour l'extraction de polyphénols, les solvants couramment utilisés sont le méthanol, l'éthanol, le propanol, l'acétone, l'acétate d'éthyle, l'eau, ainsi que leurs mélanges (Calle Chumo et al., 2022; Chanioti et al., 2014; Seidel, 2012).

Concernant l'extraction des polyphénols à partir du marc de café, les mélanges de solvants alcooliques avec de l'eau sont souvent utilisés et sont plus efficaces que les solvants purs (Boyadzhieva et al., 2018; Mussatto et al., 2011; Panusa et al., 2013; Zuorro, 2013).

3.2.2. Le pH

La polarité de nombreuses molécules peut varier en fonction du pH du solvant, ce qui influence leur solubilité. Par conséquent, l'acidité ou l'alcalinité du solvant peut également jouer un rôle dans l'extraction des composés ciblés. L'acidification du solvant est souvent utilisée afin d'extraire des polyphénols de nombreuses sources végétales pour plusieurs raisons (Bravo et al., 2013; Maeztu et al., 2001; Zimmermann & Gleichenhagen, 2011) :

1. Augmenter la stabilité des polyphénols : L'acidification du solvant peut contribuer à préserver la stabilité des polyphénols pendant l'extraction.
2. Améliorer la dissolution des polyphénols : Un solvant acidifié peut favoriser une meilleure dissolution des polyphénols, ce qui facilite leur extraction
3. Favoriser la dénaturation des membranes cellulaires : L'acidification peut provoquer la dénaturation des membranes cellulaires, permettant ainsi une libération plus efficace des polyphénols de la matrice végétale.

Le pH du milieu d'extraction joue également un rôle important dans la détermination de l'effet de la température. (Havlikovfi & Mikovi, 1985) ont étudié la stabilité des anthocyanes à différents pH et températures. À des températures plus basses (50-60°C), le pH joue un rôle significatif dans la stabilité thermique des anthocyanes, mais à des températures supérieures à 70°C, le pH n'a pas d'effet significatif.

3.2.3. La température

L'optimisation de la température d'extraction est essentielle pour minimiser les coûts énergétiques du processus. La température joue un rôle essentiel dans le processus d'extraction solide-liquide. Voici quelques rôles clés de la température dans ce type d'extraction :

1. Augmentation de la cinétique d'extraction : L'augmentation de la température accélère la vitesse à laquelle les solutés se diffusent de la phase solide à la phase liquide. Cela peut améliorer l'efficacité de l'extraction en permettant une extraction plus rapide des composés cible (Bucić-Kojić et al., 2007).
2. Augmentation de la solubilité : La température influence la solubilité des composés dans le solvant d'extraction. En général, une augmentation de la température entraîne une augmentation de la solubilité des solutés, ce qui favorise leur extraction (Chanioti et al., 2014).
3. Réduction de la viscosité : À des températures plus élevées, la viscosité du solvant diminue, ce qui facilite la pénétration du solvant à travers la matrice solide et améliore la diffusion des composés d'intérêt (Aguilera, 2003).

Dans les extractions traditionnelles, le rendement en polyphénols à partir de marc de café est généralement optimal autour de 60 à 80°C (Seo & Park, 2019; Solomakou et al., 2022; Zuorro, 2013; Zuorro & Lavecchia, 2012, 2011). Étant donné qu'il y a une perte de solvant à des températures supérieures, les études examinant l'impact des températures d'extraction n'incluent pas de températures de traitement plus élevées (> 80-90°C). Les conditions optimales de température peuvent varier en fonction de la source des polyphénols et des objectifs spécifiques de l'extraction. Des études expérimentales sont souvent nécessaires pour déterminer la plage de température optimale pour chaque cas d'extraction de polyphénols (Mokrani & Madani, 2016; Spigno et al., 2007).

En résumé, (Maillard & Berset, 1995) ont proposé trois mécanismes pour expliquer le comportement des polyphénols en fonction de la température. Le premier mécanisme suggère que les composés phénoliques insolubles peuvent être libérés lorsque les liaisons entre la lignine et les acides phénoliques sont rompues. Le deuxième mécanisme met en évidence la dégradation de la lignine elle-même à des températures élevées, ce qui entraîne

une augmentation de la quantité d'acides phénoliques. Le dernier mécanisme est la dégradation des polyphénols qui est dépendante du temps et du solvant dans lequel ils se trouvent.

3.2.4. Le temps

Les résultats concernant la durée optimale d'extraction des polyphénols dépendent fortement du type d'extractions utilisé, de la source et des autres conditions comme la température par exemple. Certains auteurs recommandent des durées courtes de 5 à 10 minutes pour des extraits obtenus à partir de pépins de raisin à 60°C (Bucić-Kojić et al., 2007). Tandis que d'autres suggèrent des temps de contact plus longs de 30 à 450 minutes pour des extraits obtenus à partir de pêche à 25 C (Mokrani & Madani, 2016). Mais une extraction avec macération, comme utilisée par (Spigno et al., 2007), peut aller jusqu'à 25h. Cependant, une durée excessive peut entraîner une oxydation des polyphénols, ce qui réduit le rendement d'extraction et dégrade l'activité antioxydante des extraits (Naczk & Shahidi, 2004).

Concernant le marc de raisin, (Fontana et al., 2013) ont démontré que le rendement de l'extraction augmente avec la durée de macération à une température de 45°C. Cependant, pour les anthocyanes et les tanins en particulier, une réduction semblait se produire au-delà de 20 heures de macération à une température de 60°C en raison de la dégradation thermique associée au temps (Spigno et al., 2007).

De plus, l'utilisation de solvants adaptés à la récupération des polyphénols comme le mélanges eau/éthanol, permet d'extraire très rapidement une grande partie des polyphénols des pépins de raisin (Bucić-Kojić et al., 2007) de sorte qu'une extraction prolongée a un effet limité sur leur récupération car un plateau est atteint avant les trente premières minutes. Cette tendance est vérifiée par (Peshev et al., 2018) sur l'extraction d'acide chlorogénique à partir de fines particules de marc de café dans des conditions de température comprises entre 40 et 60°C avec une extraction quasi complète autour de 10 minutes de process.

3.2.5. Le ratio solide-liquide

Selon les principes régissant le transfert de matière, le gradient de concentration entre le solide et le milieu liquide extérieur joue un rôle crucial dans le processus d'extraction. Une diminution du ratio solide-liquide favorise une meilleure extraction des polyphénols. Ce ratio

peut être amélioré en augmentant le volume de liquide ou en réduisant la quantité de solide. Cependant, l'augmentation du volume de solvant peut avoir des implications en termes de toxicité, de coût économique et énergétique de l'extraction, ainsi que d'allongement de la durée du processus d'extraction en raison de la nécessité d'éliminer le solvant en fin de procédé. Par conséquent, il est important de trouver un équilibre entre le ratio solide-liquide afin d'éviter une saturation excessive du soluté dans le solvant et de garantir une pénétration adéquate du solvant dans la matrice végétale. Concernant l'extraction de composés phénoliques, (Cacace & Mazza, 2003) ont montré qu'un rendement liquide-solide élevé de 40 mL/g a permis de placer le plateau d'extraction plus haut (1,2 fois) qu'avec des rendements de 6 mL/g après 50 minutes d'extraction, à 40°C avec un solvant eau-éthanol. Une autre étude menée sur une gamme de 10 à 40 mL/g a montré que l'extraction de polyphénols était largement influencée par ce ratio. En effet un optimum de 40 mL/g a pu être trouvé en utilisant un solvant polaire (mélange eau-méthanol) (Mussatto, Ballesteros, et al., 2011).

3.2.6. L'humidité

Comme mentionné précédemment, le marc de café usagé est obtenu avec une teneur en eau supérieure à 50% en masse. Par conséquent, il serait idéal d'utiliser le marc sans le sécher, car le séchage est un processus énergivore et donc coûteux, nécessitant de la chaleur pour vaporiser l'eau. La teneur en eau du marc de café peut varier en fonction de divers facteurs tels que la méthode de torréfaction, la durée de conservation et les conditions de stockage (Chanioti et al., 2014; Seidel, 2012).

En ce qui concerne l'extraction de polyphénols à partir du marc de café, la teneur en eau peut avoir un impact sur l'efficacité de l'extraction. Une teneur en eau élevée peut faciliter l'extraction des polyphénols, car elle favorise la dissolution des composés solubles dans l'eau sans avoir de phase d'hydratation du solide (Mabona et al., 2018).

3.2.7. La taille des particules et leur structure

Dans tous les procédés de récupération de molécules d'intérêt à partir de matrices solides, il est essentiel de prendre en compte sa structure. Ainsi, le succès de l'extraction par solvant dépend fortement de la taille des particules et de sa porosité (Chanioti et al., 2014; Leybros & Frémeaux, 1990). Une étape de prétraitement à considérer est la fragmentation ou le broyage de la matière première. Le broyage avant l'extraction par solvant favorise une augmentation

de la surface de contact entre le solvant et la matrice solide. Plus la taille des particules est petite, plus le taux de transfert du soluté est élevé. L'aire de l'interface entre le solide et le liquide est plus grande et la résistance à la diffusion intraparticulaire diminue en raison des distances de diffusion plus courtes. Ainsi, l'efficacité de l'extraction augmente avec la diminution de la taille des particules (Aguilera, 2003; Chanioti et al., 2014; Pinelo et al., 2007). Cette observation est également valable pour l'extraction de polyphénols à partir de raisins, où l'on constate une augmentation de 2,8 fois de la quantité totale de polyphénols extraite pour des particules de taille comprise entre 0,125 et 0,16 mm par rapport à des particules de taille supérieure à 0,63 mm. En effet, plus les particules sont petites, plus le taux de transfert du soluté est élevé (Bucić-Kojić et al., 2007).

(Pinelo et al., 2007) ont examiné l'effet de la distribution de la taille des particules de marc de café sur l'extraction des acides phénoliques sur une gamme plus large allant de 0,25 à 2 mm. Par exemple, pour l'acide chlorogénique (5-CQA), l'extraction était de 25,5% pour les particules de 0,25 mm, tandis que l'extraction était de 16,5% pour les particules de 2 mm. En outre, les auteurs ont noté que la taille des particules avait un impact sur la viscosité de la suspension de marc de café, ce qui peut affecter l'efficacité de l'extraction. Cette tendance est confirmée par (Peshev et al., 2018).

Cependant, les particules de taille très fine peuvent provoquer des problèmes technologiques en raison de leur tendance à s'agglomérer, ce qui limite la pénétration du solvant à l'intérieur de la matrice solide. De plus, la séparation des particules très fines de l'extrait liquide en fin d'extraction est plus complexe.

3.2.8. L’agitation

L’agitation mécanique de la matière végétale dans le solvant permet le maintien en suspension des particules solides et l’homogénéisation du milieu. Elle a un effet toujours favorable sur l’opération car elle permet de réduire la résistance au transfert de solutés au niveau de l’interface solide-liquide (couche limite) et d’augmenter le coefficient de transfert. Si l’agitation est très intense et/ou maintenue durant une longue période, elle peut favoriser des chocs entre les différentes particules et permettre ainsi l’éclatement de certaines structures qui vont faciliter la libération des composés recherchés dans le milieu (Dibert et al., 1989; Leybros & Frémeaux, 1990).

(Cacace & Mazza, 2003) mettent en avant que la vitesse d'agitation doit garantir des nombres de Reynolds supérieurs à 10^4 pour rester dans le régime turbulent.

3.3. Les outils et méthodes d'extractions

Les méthodes d'extraction solide-liquide conventionnelles, telles que la macération, la décoction, la percolation etc… sont couramment utilisées pour extraire des composés à partir de matières solides. Cependant, des méthodes non conventionnelles, telles que l'extraction par ultrasons, micro-ondes, ou encore CO_2 supercritique, sont de plus en plus investiguées en recherche et développement. Ces méthodes offrent des avantages tels qu'une extraction plus rapide, une meilleure sélectivité et une diminution de l'utilisation de solvants. Cependant, elles nécessitent un équipement spécialisé et des conditions de fonctionnement contrôlées. Le choix de la méthode d'extraction dépend des caractéristiques du matériau solide, des composés recherchés et des objectifs spécifiques de l'extraction (Devgun et al., 2012, 2012; Osorio-Tobón, 2020; Peng et al., 2010; Tiwari, 2015; Wong-Paz et al., 2017).

3.3.1. Les extractions conventionnelles

Historiquement, les techniques conventionnelles les plus couramment utilisées pour l'extraction solide-liquide de composés sont la macération, la percolation, la décoction, l'infusion ou encore l'extraction par Soxhlet (Alara et al., 2021; Osorio-Tobón, 2020; Wong-Paz et al., 2017). Voici une présentation de ces opérations.

3.3.1.1. La macération

La macération est une méthode simple d'extraction solide-liquide qui consiste à mettre en contact le matériel végétal avec un solvant pendant un certain temps, avec ou sans agitation, généralement à température ambiante. Bien qu'elle soit souvent longue et présente un rendement faible (Osorio-Tobón, 2020), elle est utilisée pour extraire des molécules thermosensibles. Une macération sans agitation peut durer plusieurs jours voire semaines pour être efficace (Handa et al., 2008; Hidayat & Patricia Wulandari, 2021). Cependant, cela peut entraîner des inconvénients tels que la fermentation ou des contaminations bactériennes, surtout si de l'eau est utilisée comme solvant, ce qui peut entraîner la dégradation des molécules actives. Afin de prévenir ou de réduire ces inconvénients, la macération peut être réalisée dans un récipient couvert, à l'abri de la lumière (Bayoï et al.,

2014; Handa et al., 2008). Ainsi, les principaux avantages de la macération sont que le processus est souvent réalisé sans apport d'énergie lié à un chauffage, ce qui rend le processus peu coûteux et facile à mettre en place. Une variante de cette méthode est appelé digestion, elle consiste à chauffer légèrement le mélange (Handa et al., 2008).

3.3.1.2. La percolation

La percolation est plus efficace que la macération car il s'agit d'un processus continu dans lequel le solvant saturé est constamment remplacé par un solvant frais. Elle s'effectue dans un percolateur (récipient en forme de cône ouvert des deux côtés), où le solide (souvent en poudre) est placé à tremper dans le solvant d'extraction qui peut être chauffé ou non. L'extraction va s'entamer puis en ouvrant le haut du percolateur l'extrait va s'écouler lentement (goutte à goutte) par le bas. On ajoute du solvant supplémentaire au besoin pour continuer l'extraction (Devgun et al., 2012; Handa et al., 2008; Hidayat & Patricia Wulandari, 2021). Les principaux inconvénients de la percolation à grande échelle sont la nécessité de grandes quantités de solvant et le temps nécessaire (Handa et al., 2008). À noter qu'une percolation froide (appelée en anglais « cold drip ») peut être utilisée pour l'extraction du café à partir de poudre de grains torréfié (G. Angeloni et al., 2019).

3.3.1.3. L'infusion

L'infusion est une méthode qui implique de mettre des parties de plantes (comme des fleurs, des feuilles, des baies ou des racines) en suspension dans un solvant chaud ou froid, puis de laisser le mélange reposer pendant plusieurs minutes. Les infusions sont des solutions diluées contenant les constituants facilement solubles. Après cette étape, le produit est filtré pour obtenir une infusion. Ce procédé est particulièrement adapté aux plantes délicates et aux fleurs (Handa et al., 2008).

3.3.1.4. La décoction

Parmi les méthodes traditionnelles d'extraction de matière végétale pour obtenir un extrait, la décoction est l'une des plus décrites. Dans ce processus, la préparation liquide est obtenue en faisant bouillir la matière végétale avec de l'eau ou un autre solvant pendant plusieurs minutes (Hidayat & Patricia Wulandari, 2021). La décoction diffère de l'infusion en ce sens que cette dernière n'est pas portée activement à ébullition (Handa et al., 2008). La décoction est la méthode de choix lorsqu'il s'agit de travailler avec des plantes résistantes et

fibreuses, des écorces et des racines, ainsi qu'avec des plantes contenant des substances hydrosolubles. L'extrait obtenu par décoction contient un grand nombre d'impuretés solubles dans l'eau ou d'autres solvants. La décoction ne peut pas être utilisée pour extraire des composants thermolabiles ou volatils (Handa et al., 2008; Hidayat & Patricia Wulandari, 2021).

3.3.1.5. Le Soxhlet

Dans cette méthode, la matière végétale finement broyée est placée dans un sac poreux ou un papier filtre résistant, qui est inséré dans une chambre de l'appareil Soxhlet. Le solvant contenu dans le flacon de la partie inférieure est chauffé et ses vapeurs se condensent dans le condenseur. Le solvant goutte dans le compartiment contenant la matière végétale et l'extraie par contact. Lorsque le niveau de liquide dans la chambre atteint le sommet du tube siphon, le contenu liquide de la chambre s'écoule dans le flacon par siphonage. Ce processus est continu est poursuivi jusqu'à ce qu'une goutte de solvant provenant du tube siphon ne laisse aucun résidu lorsqu'elle est évaporée (Handa et al., 2008). L'avantage de cette méthode, par rapport aux méthodes précédemment décrites, est que de grandes quantités de matières végétales peuvent être extraites avec une quantité beaucoup plus faible de solvant (Alara et al., 2021). Cela permet d'économiser considérablement en termes de temps, d'énergie et donc de coûts financiers. Les méthodes basées sur l'extraction Soxhlet ont été et sont actuellement utilisées comme référence lorsque des méthodes conventionnelles basées sur d'autres principes doivent être évaluées (Alara et al., 2021; Azwanida, 2015).

Cette méthode présente néanmoins un inconvénient notable. Le chauffage continu de l'extrait à la température d'ébullition du solvant utilisé peut potentiellement entraîner la dégradation des composés thermolabiles et la formation d'artefacts, ce qui peut affecter la qualité du produit final. De plus sa mise en œuvre n'est pas aussi simple et une mise à l'échelle au niveau industriel parait plus contraignant (Handa et al., 2008; Luque De Castro & García-Ayuso, 1998).

En résumé, le Tableau 5 offre un aperçu des conditions et des résultats obtenus en utilisant différentes techniques conventionnelles pour extraire les polyphénols de deux sources distinctes. Comme discuté précédemment, le Soxhlet se révèle être une méthode efficace qui permet d'extraire 56% de polyphénols de plus que la macération à partir du marc de café (Caballero-Galván et al., 2018). De même, la décoction, employée à des températures

élevées, permet une extraction nettement plus efficace que l'infusion (4,3 fois) et la macération (21,9 fois) à partir de feuilles de plante africaine (Faye et al., 2022).

Tableau 5. Exemples d'extractions conventionnelles de composés phénoliques à partir de différentes sources

Référence scientifique	Matière première	Type d'extraction	Conditions appliquées	Polyphénols totaux (mg/g MS)
(Caballero-Galván et al., 2018)	Marc de café	Soxhlet	Température : T°C ébullition Durée : 6h Ratio solide/liquide : 1/25 Solvant : éthanol 60%	13,98
		Macération	Température : 25°C Durée : 8 heures Ratio solide/liquide : 1/20 Solvant : éthanol 60%	8,99
(Faye et al., 2022)	Feuille de plante africaine (*Combretum micranthum*)	Décoction	Température : 100°C Durée : 90 minutes Ratio solide/liquide : 1/60 Solvant : eau	5,7
		Macération	Température : 25°C Durée : 48 heures Ratio solide/liquide : 1/60 Solvant : eau	0,26
		Infusion	Température : 50 à 80°C Durée : 60 minutes Ratio solide/liquide : 1/60 Solvant : eau	1,32

3.3.2. L'extraction verte ou éco-extraction

La conception de méthodes d'extraction écologiques et durables pour les produits naturels est actuellement un sujet de recherche populaire dans le domaine multidisciplinaire de la chimie appliquée, de la biologie et de la technologie (Armenta et al., 2015). Les six principes de l'extraction verte ont été définis par (Chemat et al., 2012). Le concept, les principes et les exemples d'extraction verte discutés ici offrent un aperçu actualisé des importants efforts technologiques déployés et des diverses applications qui sont développées

dans ce domaine (Ali et al., 2018; K. S. Andrade et al., 2012; Barbosa et al., 2014; Chatel, 2018; Lopes et al., 2020; Pettinato et al., 2019; Solomakou et al., 2022; Vergara-Salinas et al., 2012).

La liste des "six principes de l'extraction verte des produits naturels" (Tableau 6) devrait être considérée par l'industrie et les scientifiques comme une orientation visant à établir norme innovantes et respectueuses de l'environnement, ainsi qu'une réflexion pour innover non seulement dans les processus, mais dans tous les aspects de l'extraction solide-liquide (Chemat et al., 2012) :

Tableau 6. Les six principes de l'extraction verte d'après (Chemat et al., 2012)

Principe	Description
Principe 1	Innovation par la sélection de variétés et l'utilisation de ressources végétales renouvelables.
Principe 2	Utilisation de solvants alternatifs, principalement l'eau ou les solvants agricoles.
Principe 3	Réduction de la consommation d'énergie grâce à la récupération d'énergie et à l'utilisation de technologies innovantes.
Principe 4	Production de co-produits au lieu de déchets, en incluant l'industrie de la bio-raffinerie et de l'agro-raffinerie.
Principe 5	Réduction des opérations unitaires et favorisation de processus sûrs, robustes et contrôlés.
Principe 6	Recherche d'un extrait non dénaturé et biodégradable, sans contaminants.

Même si certaines des extractions conventionnelles citées précédemment peuvent répondre à certains principes, les extractions alternatives qui vont être décrites proposent de pouvoir coupler une approche économique, écologique et performante de l'extraction solide-liquide (Picot-Allain et al., 2021).

3.3.3. Les outils et méthodes d'extractions alternatives

Les technologies d'extraction conventionnelles à partir de matrices végétales présentent un ou plusieurs inconvénients tels que la présence élevée d'impuretés, un temps d'extraction long et la perte de composés thermolabiles. En revanche, les technologies d'extraction

alternatives, qui permettent d'améliorer le rendement d'extraction, de réduire la dégradation des composés thermolabiles et d'augmenter la vitesse d'extraction par rapport aux technologies conventionnelles, ont trouvé de nouvelles applications dans le domaine de l'extraction de composés à haute valeur ajoutée tels que les polyphénols." (Osorio-Tobón, 2020; Wong-Paz et al., 2017).

3.3.3.1. Extraction par fluide supercritique (SFE)

La méthode d'extraction par fluide supercritique (SFE) utilise des solvants supercritiques (au-dessus des pressions et températures critiques). Dans cet état, les fluides supercritiques ont un pouvoir de solvatation important en raison de leur densité relativement élevée (Osorio-Tobón, 2020). Elle suscite un intérêt croissant depuis la seconde moitié du siècle dernier en tant que solvant alternatif pour l'extraction de molécules bioactives d'origine végétale (Handa et al., 2008; Hauthal, 2001). Le solvant le plus souvent utilisé est le CO_2 qui a l'avantage d'être non toxique, non corrosif, peu coûteux, non inflammable et respectueux de l'environnement (Osorio-Tobón, 2020). Cependant, le CO_2 étant non polaire, il n'est pas efficace pour les composés phénoliques polaires. L'ajout de co-solvants tels que l'éthanol, le méthanol ou l'eau améliore la solubilité des composés phénoliques et augmente grandement le rendement d'extraction (Mourtzinos & Goula, 2019; S. A. O. Santos et al., 2012). La SFE présente des avantages tels que la sélectivité, l'utilisation de températures douces et la facilité de séparation du solvant (Osorio-Tobón, 2020).

3.3.3.2. Extraction liquide pressurisée ou accélérée (PLE ou ASE)

Également appelée extraction accélérée par solvant (ASE), l'extraction liquide pressurisée (PLE) est une méthode qui utilise une haute pression pour maintenir le solvant à l'état liquide à température élevée. Les avantages incluent une meilleure solubilisation des molécules grâce aux hautes températures et pressions, ce qui améliore la vitesse et le rendement de l'extraction (Benthin et al., 1999). L'utilisation de pressions élevées maintient le solvant en dessous de son point d'ébullition, ce qui facilite la pénétration du solvant dans la matrice et réduit la viscosité et la tension de surface du solvant, favorisant ainsi l'extraction des composés situés dans les pores internes (Bursać Kovačević et al., 2018; Otero et al., 2019). Avec l'utilisation de l'eau comme solvant, sous des conditions subcritiques (températures supérieures au point d'ébullition du solvant, mais inférieures au point critique), les liaisons

hydrogène intermoléculaires de l'eau se rompent et la constante diélectrique diminue (Mourtzinos & Goula, 2019). À mesure que la température augmente, la constante diélectrique de l'eau est réduite, jusqu'à atteindre celle de l'éthanol par exemple. Pour cette raison, les conditions subcritiques sont idéales pour l'extraction des polyphénols (Ramos et al., 2002). L'utilisation de l'eau à 100% élimine le coût de l'éthanol lui-même et le coût du processus d'évaporation des solvants organiques (Grigoras et al., 2013).

3.3.3.3. Extraction assistée par micro-ondes (MAE)

Les micro-ondes sont une méthode simple et rapide pour chauffer le solvant d'extraction. Contrairement au chauffage conventionnel qui dépend de la conductivité thermique, le chauffage par micro-ondes permet de chauffer instantanément tous les éléments individuels d'un matériau (Robinson et al., 2009). Les micro-ondes sont une forme d'énergie électromagnétique non ionisante qui peut pénétrer certains matériaux et interagir avec les composants polaires à l'intérieur, comme l'eau, pour générer de la chaleur (Rostagno & Prado, 2013). Les composés chimiques polaires absorbent bien l'énergie des micro-ondes, ce qui permet de chauffer sélectivement les matériaux ciblés en fonction de leur constante diélectrique. Les mouvements de rotation des molécules polaires provoquent des collisions multiples qui augmentent la température du milieu (Rostagno & Prado, 2013).

La MAE est considérée comme une alternative importante à l'extraction solide-liquide en raison de ses avantages : temps d'extraction réduit et consommation de solvant réduite (Azmir et al., 2013; Chan et al., 2011).

3.3.3.4. Extraction assistée par ultrasons (UAE)

Les ultrasons sont des ondes mécaniques dans la gamme de fréquences de 20 kHz à 10 MHz. Dans l'industrie alimentaire, deux fréquences d'ultrasons sont couramment utilisées : les ultrasons diagnostiques (2 à 10 MHz) et les ultrasons de puissance conventionnels (20 à 100 kHz) (Pingret et al., 2013). Les ultrasons diagnostiques sont utilisés en imagerie médicale par exemple, tandis que les ultrasons de puissance conventionnels sont utilisés dans l'extraction de composés bioactifs, le dégazage et la stérilisation, entre autres applications (Chemat et al., 2011; Osorio-Tobón, 2020). Dans ce processus, les ultrasons provoquent des cycles alternatifs de compressions et de décompressions dans le milieu liquide, ce qui entraîne des changements de pression, la formation et la rupture des bulles (Tiwari, 2015) (Figure 16).

En effet, lorsque les bulles deviennent trop grandes pour être contenues par la force de tension de surface, elles s'effondrent, entraînant des forces de cisaillement permettant rompre ou perturber la structure de la matrice végétale mais aussi pour le solvant d'extraction de pénétrer en profondeur et ainsi améliorer le transfert de masse (Pitt et al., 2004; Şahin et al., 2013). L'implosion des bulles de gaz dans un milieu liquide génère un changement rapide de température et une augmentation de pression (Chemat et al., 2017).

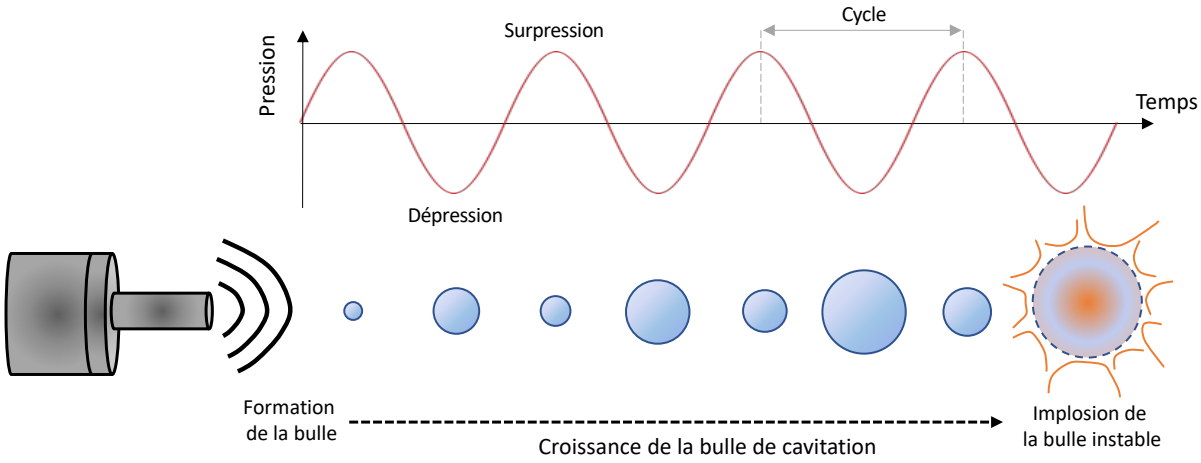

Figure 16. Schéma des cycles de pression associés à la déformation des bulles de cavitation d'après (H. M. Santos et al., 2008)

L'UAE est associée à des rendements d'extraction de composés phénoliques plus élevés et à des vitesses d'extraction plus rapides, tout en utilisant des températures plus basses et des quantités plus petites de solvants (Rutkowska et al., 2017). Dans cette utilisation, la puissance et l'amplitude des ultrasons sont parmi les paramètres de processus les plus importants et ont une relation positive avec l'extraction des composés phénoliques (Osorio-Tobón, 2020).

3.3.3.5. Extraction assistée par champ électrique pulsé (PEF)

Le traitement par champ électrique pulsé (PEF) est reconnu comme étant utile pour améliorer les processus de pressage, de séchage, d'extraction et de diffusion (Barsotti et al., 1999; El-Belghiti & Vorobiev, 2004). Le principe du PEF est de détruire la structure de la

matrice végétale pour augmenter l'efficacité d'extraction grâce à un potentiel électrique qui sépare les molécules selon leur charge (Azmir et al., 2013). L'efficacité du traitement par PEF dépend des paramètres du processus, notamment de l'intensité du champ, de l'apport d'énergie spécifique, du nombre d'impulsions et de la température de traitement (Heinz et al., 2003). Le PEF peut augmenter le transfert de masse pendant l'extraction et réduire le temps de process. Il est également applicable sur les matières végétales en tant que processus de prétraitement avant l'extraction conventionnelle pour réduire l'effort d'extraction (López et al., 2009).

3.3.3.6. Extraction assistée par enzyme (EAE)

L'extraction assistée par enzyme (EAE) est une technologie alternative et respectueuse de l'environnement qui permet une extraction avec moins de solvants. Les méthodes assistées par enzyme ont montré des rendements d'extraction élevés pour de nombreux composés, tels que les polysaccharides, les huiles, les pigments naturels, les arômes et les composés phénoliques (Haure et al., 2022; Shinwari, 2021; Sowbhagya & Chitra, 2010). Certains composés comme les polyphénols sont imbriqués dans les matrices végétales et interagissent avec le réseau polysaccharide-lignine par des liaisons hydrogène, rendant ces matrices inaccessibles aux solvants dans les processus d'extraction habituels (Azmir et al., 2013; Dumas & Charriere-Ladreix, 1979; Gligor et al., 2019; Rosenthal et al., 1996). Le prétraitement enzymatique a été utilisé pour améliorer la libération des polyphénols en participant à la détérioration de la structure végétale, permettant ainsi d'augmenter le rendement de récupération des polyphénols (Nagendra chari et al., 2013). Malgré certains désavantages tels que les coûts élevés des enzymes, l'EAE demeure une technologie verte pour l'amélioration de la récupération de composés bioactifs et l'utilisation de faibles quantités de solvants (Puri et al., 2012).

En somme, le Tableau 7 présente un résumé des conditions et des résultats issus de l'emploi de diverses méthodes alternatives pour l'extraction des polyphénols contenus dans le marc de café. Les valeurs affichées se révèlent délicates à comparer, étant donné que le marc de café provient de sources différentes pour les études réalisées à l'aide de la PLE ou de l'EAE. Cependant, elles fournissent une évaluation intéressante de l'efficacité des méthodes employées. Il est cependant à noter que l'utilisation d'enzymes conduit à des rendements très

élevés, comme démontré par (Khairill Anuar M. et al., 2020). De plus, l'application des micro-ondes suivant les conditions de (Solomakou et al., 2022) permet une augmentation de 36% de l'extraction des polyphénols à partir du marc de café.

Tableau 7. Exemples d'extractions alternatives de composés phénoliques à partir de différentes sources

Référence scientifique	Matière première	Type d'extraction	Conditions appliquées	Polyphénols totaux (mg/g MS)
(Solomakou et al., 2022)	Marc de café	MAE	Puissance : 100-600 W Durée : 5 minutes Ratio solide/liquide : 1/5-1/60 g/mL Solvant : éthanol 0-100%	32,2
		UAE	Puissance : 130 W (fréquence 20 kHz) Température : 20-60°C Durée : 20 minutes Ratio solide/liquide : 1/5-1/60 g/mL Solvant : éthanol 0-100%	18,54
(Shang et al., 2017)	Marc de café	PLE	Température : 80-160°C Pression : 500-2500 psi Durée : 5-20 minutes Ratio solide/liquide : 1/12-1/60 g/mL Solvant : éthanol 25-75%	22,64
(Khairill Anuar M. et al., 2020)	Marc de café	EAE	Pectinase à 0,2 M pH 5,5 ; 37°C ; 20–100 min Solvant : Tampon acétate 0,2 M (15mL)	76,17

3.4. Les applications des composants phénoliques du marc de café

Les polyphénols ont suscité un intérêt grandissant dans les industries agroalimentaires, de la santé et de la cosmétique en raison de leurs propriétés antioxydantes remarquables. Leur capacité à neutraliser les radicaux libres et à protéger les cellules contre les dommages oxydatifs en font des candidats prometteurs pour diverses applications (Galanakis, 2018).

Comme décris à la section 1.2.2.7, dans le marc de café, les composés phénoliques sont principalement des acides chlorogéniques, qui correspondent à une classe d'esters hydrosolubles dans lesquels une ou deux fractions d'acides caféique ou férulique sont estérifiées à une molécule d'acide quinique. Les plus abondants sont les acides caféoylquinique, dicaféoylquinique, féruloylquinique et p-coumaroylquinique (Franca & Oliveira, 2022).

3.4.1. Les polyphénols dans l'industrie agroalimentaire

Dans les industries agroalimentaires, l'utilisation des polyphénols en tant qu'agents conservateurs constitue un domaine de recherche et de développement en pleine expansion. En effet, la présence de conservateurs chimiques synthétiques dans les produits alimentaires suscite des inquiétudes chez les consommateurs (Wang et al., 2022). Par conséquent, la recherche d'antimicrobiens et antioxydants naturels acceptables pour les consommateurs est devenue une priorité (Muthuswamy & Rupasinghe, 2007). Ces composés naturels qui peuvent être issus de biodéchets, comme ici du marc de café, jouent un rôle essentiel dans la préservation de la qualité et de la fraîcheur des aliments, contribuant ainsi à prolonger leur durée de conservation et à réduire le gaspillage alimentaire (Nazzaro et al., 2022). L'acide chlorogénique a été étudié comme additif alimentaire par (Santana-Gálvez et al., 2017). Il a démontré une activité antimicrobienne avérée contre de nombreuses souches de bactéries Gram +, Gram -, champignons, levures et virus (Bajko et al., 2016; X. Li et al., 2013; Lou et al., 2011; Sung & Lee, 2010). De plus, il présente une activité antioxydante envers les lipides et les émulsions d'huiles dans l'eau (Laguerre et al., 2009; Sasaki et al., 2010). En outre, l'acide chlorogénique a la capacité d'inhiber la dégradation d'autres composés phytochimiques bioactifs naturels présents dans les aliments, comme les anthocyanes (Kopjar et al., 2012).

Cependant, l'utilisation des polyphénols en agroalimentaire peut présenter des défis en termes de stabilité et de biodisponibilité (de Araújo et al., 2021; Iglesias-Carres et al., 2019; Wang et al., 2022). En février 2017, l'entreprise Herta a lancé un produit appelé "Le Bon Paris au torchon conservation sans nitrite". Cette nouvelle méthode de conservation repose sur l'utilisation de polyphénols (Rapport de l'Assemblé Nationale, 2022).

3.4.2. Les polyphénols dans l'industrie cosmétique

Dans l'industrie cosmétique, les polyphénols connaissent une popularité croissante en raison de leurs propriétés bénéfiques pour la peau. En particulier, leur capacité à agir comme de puissants antioxydants est mise en avant, car cela permet de protéger la peau contre les dommages causés par le stress oxydatif (Rodrigues et al., 2023). Les CQA ont montré des effets bénéfiques sur la peau en stimulant la synthèse de collagène dans les fibroblastes dermiques humains. Ils régulent aussi positivement l'expression de gènes impliqués dans la barrière cutanée, comme la filaggrine, essentielle pour la fonction protectrice de la peau, sans présenter de toxicité cellulaire (Lee et al., 2021). Les CGA montrent aussi des propriétés protectrices pour la peau en réduisant les dommages causés à l'ADN par les rayons UVB dans les cellules HaCaT humaines et en neutralisant les radicaux libres, ce qui les rend photoprotecteur contre le rayonnement UVB (Cha et al., 2014). En outre, les CGA ont des propriétés anti-inflammatoires de par leur action inhibitrice sur les cytokines pro-inflammatoires (Hwang et al., 2014). En 1995, l'entreprise Caudalie est devenue la première marque à introduire dans l'industrie cosmétique des polyphénols de pépins de raisin stabilisés ayant pour but de ralentir de vieillissement cutané.

3.4.3. Les polyphénols dans l'industrie pharmaceutique

Dans le domaine de la santé, les polyphénols, présentent un potentiel considérable en matière de bienfaits pour la santé. On leur reconnait diverses propriétés telles que antioxydantes, antimicrobiennes, immunomodulatrices, antihypertensives, anticancéreuses et anti-inflammatoires (Rathod et al., 2023).

Il a été rapporté que les composés phénoliques, y compris les acides phénoliques, ont plusieurs potentiels biologiques et peuvent agir comme agents antihypertenseurs et donc avoir un effet positif sur les maladies cardiovasculaires (Oak et al., 2018; Sanches-Silva et al., 2020). Les polyphénols possèdent des effets immunomodulateurs bien établis, car ils régulent les gènes des cellules immunitaires. Ils influencent également les cytokines et les voies de signalisation, suppriment l'activation des cellules T et des cellules tueuses naturelles, ainsi que les macrophages associés aux tumeurs (de Carvalho et al., 2020; Mohammadian Haftcheshmeh et al., 2021; Soto-Hernández et al., 2017; Yahfoufi et al., 2018). Récemment, les polyphénols ont suscité un vif intérêt en tant que traitements potentiels contre le cancer

en raison de leurs effets secondaires réduits et de leur faible toxicité. Des études épidémiologiques, précliniques et cliniques ont montré une forte corrélation entre la consommation quotidienne de polyphénols et la prévention de différents types de cancer (Lewandowska et al., 2016; Yi et al., 2019). L'acide dihydrocaféique, qui est un dérivé de l'acide chlorogénique est un candidat potentiel pour la prévention et le traitement du cancer (Santana-Gálvez et al., 2020).

4. L'utilisation du marc de café comme substrat pour la production d'enzymes par des champignons filamenteux

4.1. La valorisation des déchets par l'utilisation de bioprocédés

L'utilisation de micro-organismes à des fins de transformation de ressources ou de déchets en produits à valeur ajoutée constitue une forme avancée de valorisation. Cette approche offre un moyen écologique de réduire l'impact environnemental des déchets, tout en générant des produits valorisables (Banerjee & Arora, 2021). En exploitant les capacités des micro-organismes, tels que les bactéries, les levures, ou les champignons pour décomposer, métaboliser ou convertir des composants de diverses biomasses (Usmani et al., 2022), on peut obtenir des produits cibles tel que de l'engrais (Ayilara et al., 2020), du biogaz (ou énergie) (Pagliano et al., 2019), des composés chimiques volatils tels que des arômes (Ben Akacha & Gargouri, 2015), des molécules à hautes valeurs ajoutées (V. Kumar et al., 2021) ou encore des enzymes (Uçkun Kiran et al., 2014).

4.2. La fermentation solide de champignons à partir de biodéchets

La fermentation solide offre une nouvelle approche dans la gestion des déchets alimentaires et agricoles. La fermentation en milieu solide (FMS) est un processus de fermentation dans lequel des micro-organismes se développent sur des matériaux solides sans présence d'eau libre (Lonsane, 1985) contrairement à la fermentation en milieu liquide. Elle ne requiert pas d'agitation pour l'oxygénation, car le mycélium (structure filamentaire des champignons) est directement en contact avec l'oxygène de l'air (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). L'objectif de la FMS est de mettre en contact étroit les champignons (ou les bactéries)

cultivés avec le substrat insoluble et d'obtenir la concentration en nutriments la plus élevée à partir du substrat pour la fermentation (Bhargav et al., 2008).

Le substrat joue un rôle essentiel en fournissant un support et des sources de nutriments aux micro-organismes qui s'y développent. Ces micro-organismes se trouvent soit à la surface, soit à l'intérieur du substrat humide, mais toujours en contact avec les particules solides. L'eau présente dans le substrat est "liée" au support et doit avoir une activité de l'eau (aw) permettant aux micro-organismes de métaboliser, mais elle ne doit pas dépasser la capacité maximale de rétention en eau des particules solides (Duchiron & Legin-Copinet, 2019).

Un avantage important des fermentations en milieu solide par rapport aux fermentations en milieu liquide réside dans les faibles volumes d'eau à traiter. Cela réduit les problèmes liés aux effluents et facilite la récupération des produits. En effet, les faibles quantités d'eau utilisées dans le processus de fermentation en milieu solide entraînent une diminution des déchets liquides à gérer, ce qui contribue à une meilleure gestion environnementale et économique de l'ensemble du processus. De plus, la fermentation en milieu solide offre des avantages significatifs, notamment l'utilisation de réacteurs plus petits tout en maintenant une productivité similaire voir supérieure à celle de la fermentation en milieu liquide si l'on ramène la productivité par volume de réacteur. Par exemple, la production de L-Asparaginase a été réalisé par voie submergée à une température de 30°C et un pH de 6,2 dans un milieu de culture proline medium 2 avec *Aspergillus terreus* pour une activité enzymatique de 58,8 U/L (Sarquis et al., 2004). En fermentation solide, sur son de riz, à 30°C, avec une teneur en humidité de 50% (poids/volume), *Serratia marcescens* a produit une activité enzymatique de 79,84 U/g (Venil & Lakshmanaperumalsamy, 2009).

Cependant, certains désavantages sont également rencontrés. Il peut y avoir un développement important de chaleur, ce qui peut affecter négativement le processus en inhibant la croissance du micro-organisme. De plus, la contamination bactérienne peut être un problème dans la fermentation en milieu solide (Bhargav et al., 2008; Lonsane, 1985). Lorsque l'échelle de production est augmentée, les problématiques de montée en échelle sont complexes et peu de réacteurs à gros volumes sont disponibles. L'estimation de la croissance et la difficulté de contrôler le niveau d'humidité du substrat peuvent également poser des défis à la fermentation en milieu solide (Lonsane, 1985), de même que la lenteur du processus

(Singh Nee' Nigam & Pandey, 2009) et sa modélisation (Durand, 1998). Ces limitations doivent être prises en compte et gérées efficacement pour optimiser le processus et exploiter pleinement les avantages de la fermentation en milieu solide.

Dans le contexte du marc de café, cette méthode permet de valoriser efficacement ce résidu, en transformant les composés organiques présents en une matière riche en éléments nutritifs disponibles pour leur assimilation (Navya P N et al., 2012; Ravindran et al., 2019; Regalado et al., 2000; Yilmazer et al., 2021).

4.3. Développement d'une fermentation solide

Le développement d'un bioprocédé de fermentation en milieu solide implique plusieurs éléments essentiels. Tout d'abord, il nécessite le choix d'un micro-organisme compatible avec le substrat sélectionné, suivi de l'optimisation des paramètres physico-chimiques et biochimiques du procédé, ainsi que de l'isolement et de la purification du produit final (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). La matrice solide utilisée pour la fermentation doit être poreuse, capable d'adsorber ou de contenir les nutriments essentiels aux micro-organismes tels que les sources de carbone, d'azote et les sels minéraux (Pandey, 2002). Elle peut être composée de différents matériaux :

- Matériaux organiques naturels tels que les coproduits agricoles ou de l'agro-industrie (sons, pailles, pulpes, drèches, marcs), qui servent à la fois de support solide et de substrat pour la culture microbienne (Gangadharan et al., 2006).
- Matériaux minéraux tels que les granulés d'argile, la perlite, la pouzzolane, qui sont utilisés uniquement comme supports de culture et doivent être imbibés de solutions nutritives pour la croissance des micro-organismes (Hama et al., 2007).
- Matériaux synthétiques de type mousse de polyuréthane, également utilisés comme supports de culture imbibés de solutions nutritives (K.-J. Wu et al., 2007).

Les matériaux organiques issus de coproduits agricoles et agro-industriels ont l'avantage de concentrer le produit recherché dans le milieu, ce qui nécessite généralement moins d'étapes de purification. Par exemple, les cocktails d'enzymes utilisés dans les procédés amidonniers pour la production de sirops de glucose peuvent être partiellement purifiés et

directement employés dans un autre développement industriel (Duchiron & Legin-Copinet, 2019).

4.4. Les champignons filamenteux

Les bactéries, levures et champignons peuvent se développer sur des substrats solides et sont utilisés dans des procédés de fermentation en milieu solide. Les bactéries sont principalement impliquées dans le compostage, l'ensilage et les procédés alimentaires, tandis que les levures sont utilisées pour la production d'éthanol et dans l'alimentation animale ou humaine. Cependant, les champignons filamenteux sont les micro-organismes les plus couramment utilisés dans la fermentation en milieu solide en raison de leurs propriétés physiologiques, enzymologiques et biochimiques adaptées à ce type de culture. Ils sont considérés comme bien adaptés à ce type d'environnement, étant proches de leur habitat naturel (Bhargav et al., 2008; Duchiron & Legin-Copinet, 2019). Les procédés de fermentation en milieu solide peuvent également utiliser des cocultures de champignons pour améliorer la production d'enzymes cellulolytiques, comme dans le cas de la coculture d'*Aspergillus ellipticus* et d'*Aspergillus fumigatus*, qui a montré une augmentation de la production d'enzymes par rapport au même procédé avec les deux souches cultivées séparément (Gupte & Madamwar, 1997). Même si des bactéries peuvent être utilisées pour la fermentation en milieu solide, il est choisi ici de ne s'intéresser qu'aux champignons filamenteux.

4.4.1. Les champignons filamenteux et leur croissance en fermentation solide

Les champignons sont des organismes eucaryotes, non chlorophylliens. On a répertorié plus de 100 000 espèces, présentant une grande diversité morphologique, allant des levures, constituées de cellules individuelles, aux structures complexes de carpophores tels que les cèpes et les champignons communs. Leur métabolisme et leur mode de vie varient considérablement, pouvant être saprophytes, pathogènes ou symbiotiques (Raimbault, 1979). En général, les champignons possèdent des capacités cataboliques élevées et sont polyphages, capables de se nourrir aussi bien de sucres simples que de composés beaucoup plus complexes tels que les lipides, les protéines, l'amidon, la cellulose, voire même la lignine. Ils se caractérisent également par leur mode de vie aérobie, dépendant de l'oxygène pour leurs processus vitaux (Raimbault, 1979).

Environ 98% des espèces de champignons décrites appartiennent au clade Dikarya, qui comprend les Ascomycota et les Basidiomycota (James et al., 2006).

4.4.1.1. Les ascomycètes

Ascomycota est le plus grand phylum de champignons, produisant des ascospores dans des asci lors de la reproduction sexuée ou asexuée (Figure 17). Il est divisé en trois sous-phyla : *Taphrinomycotina*, *Saccharomycotina* et *Pezizomycotina*. *Taphrinomycotina* est le plus ancien clade, avec des espèces à croissance de type levure et filamenteuse. *Saccharomycotina* comprend les "vraies levures" comme *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. *Pezizomycotina* est le plus grand sous-phylum, comprenant la majorité des champignons filamenteux produisant des corps fructifères pour la libération des spores (James et al., 2006). Les espèces les plus connus vont être notamment *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp. (Steudler et al., 2019).

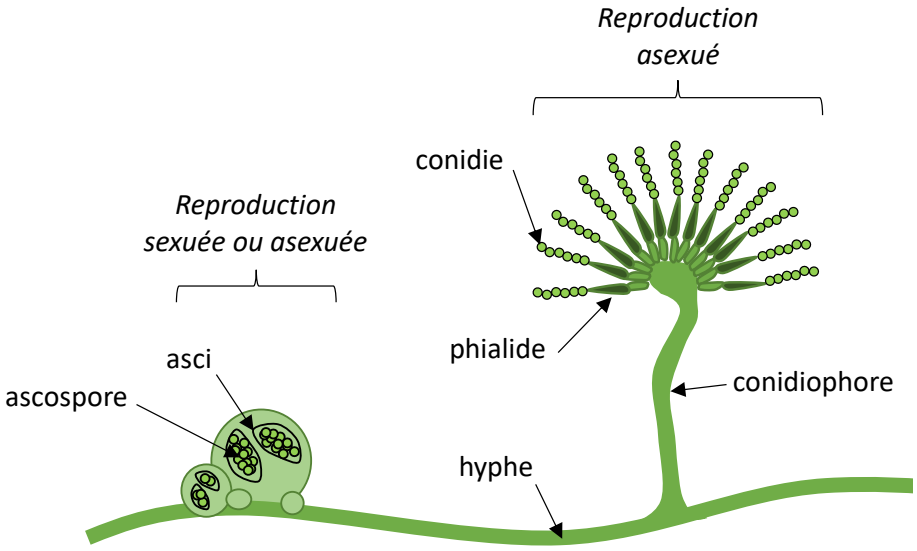

Figure 17. Formation des spores chez les Ascomycètes

4.4.1.2. Les basidiomycètes

Le phylum *Basidiomycota* comprend environ 30 000 espèces de rouilles, de charbons, de levures et de champignons à lames (Figure 18). La plupart d'entre eux produisent des basidiospores. Les relations phylogénétiques entre les trois sous-phyla de *Basidiomycota* sont

incertaines. Le sous-phylum *Pucciniomycotina* est principalement caractérisé par les rouilles (7000 espèces), pathogènes des plantes terrestres. Le sous-phylum *Ustilaginomycotina* comprend 1500 espèces de vrais champignons charbons et de levures, responsables d'infections chez les plantes à fleurs. *Agaricomycotina* regroupe près des deux tiers des basidiomycètes connus, incluant la grande majorité des champignons à lames (James et al., 2006). Les espèces les plus connus sont notamment *Pleurotus* sp., *Trametes* sp., *Phanerochaete* sp. (Steudler et al., 2019).

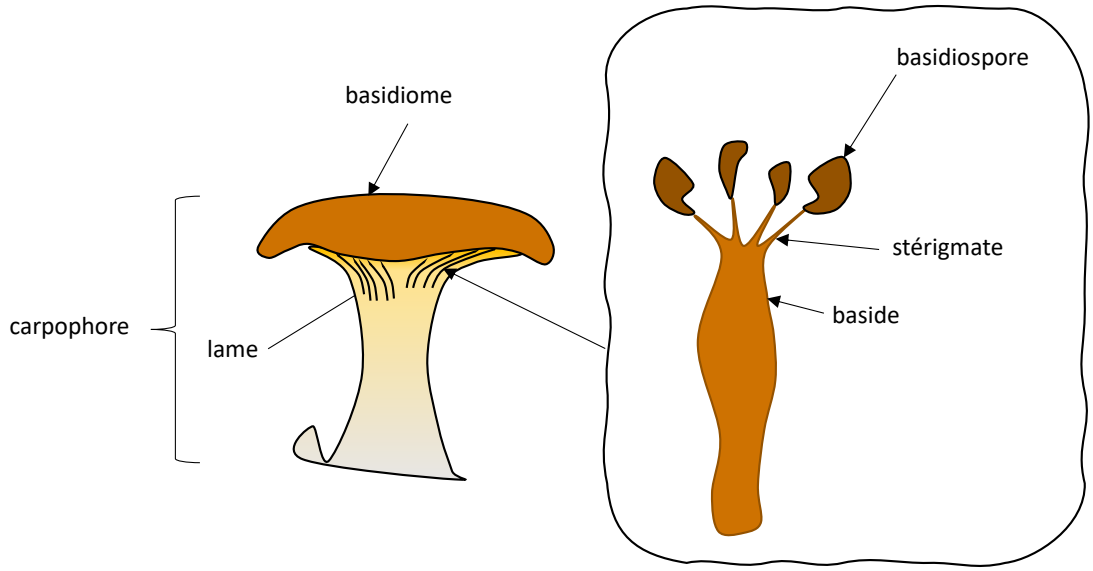

Figure 18. Formation des spores chez les Basidiomycètes

Chacun de ces groupes a des caractéristiques uniques et occupe des niches écologiques différentes. Ils jouent des rôles importants dans les écosystèmes, allant de la décomposition de la matière organique à la symbiose avec les plantes pour former des mycorhizes (Blackwell et al., 2006).

4.4.2. La croissance des champignons en fermentation solide

La croissance d'un champignon filamenteux se produit par l'extension et la ramification de filaments appelés "hyphes", formant le mycélium (Figure 16). Ces hyphes pénètrent la plupart des substrats solides à la recherche d'eau, d'ions et de substances nutritives

nécessaires à leur croissance, à condition d'être toujours en aérobiose. L'accroissement des hyphes se fait principalement par les extrémités où se déroulent les réactions métaboliques essentielles à la construction de la cellule du champignon (Duchiron & Legin-Copinet, 2019).

Les champignons sécrètent des exoenzymes hydrolytiques qui aident à la progression efficace du mycélium dans le substrat. Autour des zones de sécrétion la concentration en enzymes sera élevée. En effet, certains nutriments essentiels à la survie et à la croissance de la souche ne sont pas directement disponibles. Ces échanges entre l'intérieur et l'extérieur du champignon diminuent lorsque l'on s'éloigne de l'apex (extrémité) vers les zones plus âgées du mycélium (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). Les activités métaboliques développées lors de la fermentation génèrent de la chaleur et libèrent de l'eau, tandis que le CO_2 est produit par la respiration du micro-organisme qui consomme l'O_2 provenant de l'air extérieur. Au cours de son développement, le micro-organisme peut également modifier le pH de son environnement en libérant des molécules acides ou de l'ammoniac (Heinz et al., 2003; Hölker & Lenz, 2005) (Figure 19).

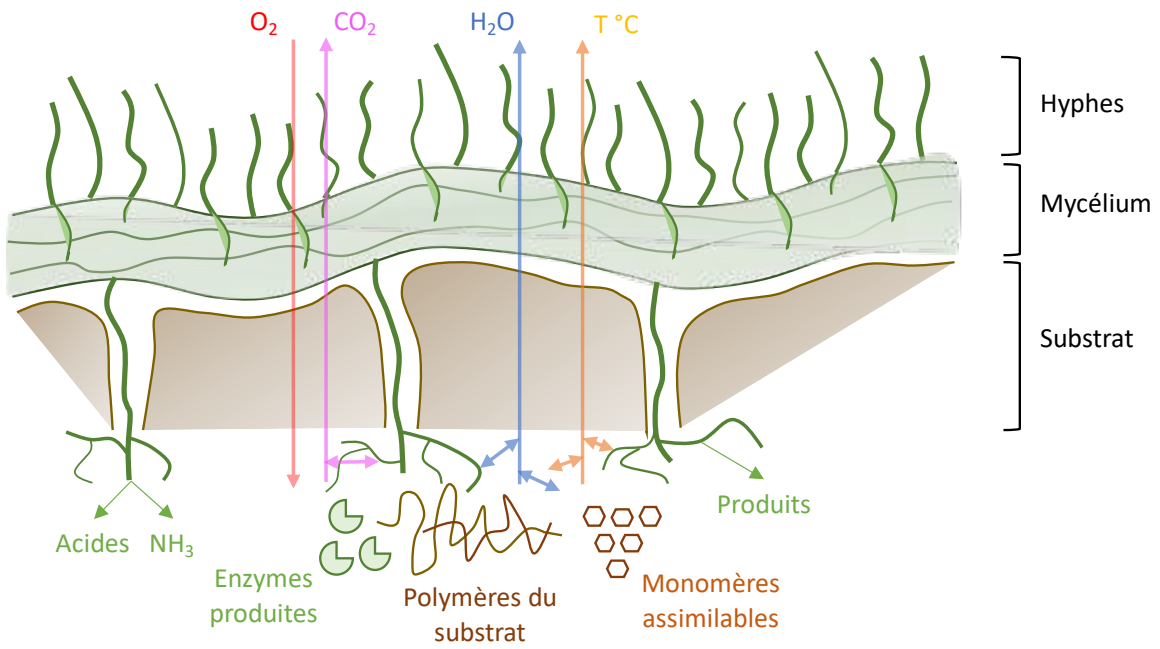

Figure 19. Réactions biologiques et physicochimiques qui apparaissent à échelle microscopique, adapté de (Hölker and Lenz, 2005)

Un autre mode de propagation bien connue est la sporulation. Les moisissures produisent des spores à maturité, qui peuvent être dispersées par les courants d'air, les humains et les animaux (Dahlberg & Etten, 1982). Ces spores, structures de reproduction invisibles à l'œil nu, jouent un rôle essentiel dans la dissémination des moisissures, constituant une étape clé de leur cycle de vie. Les dimensions de ces organes de résistance varient de 2 à 250 µm, avec la majorité entre 2 et 20 µm, leur permettant de se disperser sur de grandes distances. Les champignons produisent un nombre considérable de spores, formant une sporée qui apparaît souvent sous la forme d'une poudre colorée à la surface de la moisissure. Les spores de champignons peuvent différer considérablement en taille, en forme et en couleur d'une espèce à l'autre. Cependant, en microscopie, les spores d'une même espèce ont tendance à présenter une couleur, une dimension et une forme relativement constantes, ce qui constitue un élément important pour leur identification taxonomique (Macher & Hygienists, 1999).

4.4.3. Les paramètres physico-chimiques influents pour la croissance fongique et la production d'enzymes en fermentation solide

Les procédés de fermentation en milieu solide sont généralement plus simples à mettre en place que ceux en milieu liquide, mais ils sont aussi plus difficiles à réguler. Les substrats utilisés proviennent souvent de coproduits agricoles et agro-industriels, ce qui les rend insolubles, complexes et hétérogènes. Afin de rendre ces substrats accessibles et utilisables par les micro-organismes, des étapes de préparation et de prétraitement sont souvent nécessaires, comme la réduction de la taille des particules de substrat ou encore la complémentation en nutriments, ainsi que le chauffage ou la destruction partielle de la flore autochtone (Pandey, 2002). L'adaptation de cette étape de transformation au procédé dépend du substrat et du micro-organisme utilisé.

Les paramètres qui vont influencer une croissance et une production d'enzymes sont nombreux, on compte la température, l'humidité, l'aération, le pH, le temps, la taille des particule et l'inoculum. Une des difficultés réside dans le maintien constant de ces conditions optimales. Cela dépend de nombreux facteurs tels que l'environnement, le type d'équipement utilisé (comme les erlenmeyers ou les fermenteurs), les possibilités de prélèvement pour le suivi de la croissance et de la production, ainsi que les possibilités de régulation du dispositif.

La régulation de ces paramètres est essentielle pour assurer une fermentation réussie et obtenir les produits souhaités (Duchiron & Legin-Copinet, 2019; Thomas et al., 2013).

4.4.3.1. La nature du substrat

Les substrats sont principalement constitués de résidus des industries agricoles, alimentaires et forestières, tels que des résidus de récolte, des copeaux de bois, des épluchures de fruits et de légumes et d'autres matières premières renouvelables. Ces substrats ont une disponibilité élevée et sont peu coûteux, ce qui signifie que les coûts de production et les effets négatifs sur l'environnement (dus, par exemple, à l'élimination) sont réduits (Steudler et al., 2019).

En général, les substrats peuvent être divisés en cinq catégories et en fonction de leur composition, ils peuvent influencer la production d'une certaines classes d'enzymes si le micro-organismes est en capacité de les sécréter (Steudler et al., 2019):

1- Sucrés, comme le sorgho et la bagasse de canne à sucre, pour la production de cellulases et de xylanases (Bagewadi et al., 2018; Dias et al., 2018; B. A. Kumar et al., 2018).

2- Féculents, tels que le son de blé, adaptés aux amylases (Abdullah et al., 2018; Uzun et al., 2018).

3- Lignocellulosique, comme les pelures de fruits, la paille et la sciure de bois, convenant aux cellulases, xylanases, laccases et peroxydases (Bala & Singh, 2017; Diaz et al., 2016; Kamsani et al., 2016; Sharma et al., 2017).

4- Riches en protéines, telles que les résidus de soja, adaptées aux protéases (Biji et al., 2016; Salim et al., 2017; S. Singh & Bajaj, 2016).

5- Huileux, comme le grignon d'olive, pour la production de lipases (F. Oliveira et al., 2017).

4.4.3.2. Le type de micro-organisme, taille et âge de l'inoculum

Les champignons filamenteux sont particulièrement bien adaptés à la fermentation en milieu solide. Cependant, le choix du type de micro-organisme à utiliser dépend principalement du substrat à valoriser et du produit final souhaité (Mitchell et al., 2011).

Certains champignons filamenteux sont reconnus pour leur capacité à produire des enzymes spécifiques (Steudler et al., 2019). Les ascomycètes en général et plus précisément le genre *Fusarium* sont utilisés pour produire des lipases et pectinases (Azabou et al., 2016), les basidiomycètes sont privilégiés pour la production de laccases ou peroxydases (Schmidt & Czeschlik, 2006). Dans certains cas, l'utilisation de cocultures de micro-organismes peut également présenter des avantages pour la production de plusieurs enzymes comme les cellulases et les beta-glucosidase avec *Aspergillus niger* et *Trichoderma reseei* sur des résidus agricoles (Dhillon et al., 2011).

L'inoculation du milieu de culture se fait généralement à partir d'une suspension de spores, car elles ont une meilleure capacité de conservation par rapport au mycélium (S. K. Singh, 2017) et permet d'avoir une bonne reproductibilité.

La quantité optimale d'inoculum varie en fonction des conditions spécifiques. Par exemple, pour la production d'enzymes, un taux d'ensemencement de 10^7 à 10^8 spores par gramme de substrat sec s'est avéré plus approprié pour la production de xylanase par *Aspergillus* sur son de blé dans des conditions d'essai spécifiques (Gawande & Kamat, 1999). Cependant, une quantité excessive d'inoculum peut inhiber la synthèse des métabolites en raison de l'épuisement rapide des nutriments après la germination des spores (Sutter, 2017). Une autre étude menée par (Park Y. et al., 2002) donne une fourchette plus basse de 10^4 à 10^6 spores par gramme de substrat sec pour une production de xylanase par une autre souche d'*Aspergillus* sur paille de riz.

De plus, l'âge et l'état physiologique des spores ont également un impact significatif sur le développement des souches lors du processus de fermentation en milieu solide (Ebune et al., 1995). En effet, (Shivanna & Venkateswaran, 2014) ont relaté, que le taux de production d'enzymes (phytases) augmentait progressivement jusqu'à six jours de vie pour l'inoculation de spores d'*Aspergillus niger* sur son de blé, puis diminuait lorsque des inoculums plus anciens étaient utilisés.

4.4.3.3. L'humidité et l'activité de l'eau

Les champignons filamenteux ont besoin d'environnements humides pour leur croissance. La quantité d'eau disponible dans le substrat et l'air environnant joue un rôle essentiel dans

leur développement. Un niveau d'humidité optimal doit être maintenu pendant la fermentation, car des variations peuvent entraîner des effets néfastes sur le métabolisme cellulaire et la croissance du micro-organisme (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). L'eau est essentielle pour la croissance cellulaire, les réactions métaboliques, les activités enzymatiques, le transport des éléments nutritifs, des métabolites et des gaz au cours de la fermentation solide (Gervais & Molin, 2003). La teneur en eau optimale varie en fonction du substrat utilisé, mais elle est généralement comprise entre 40% et 70% pour les champignons filamenteux (Singhania et al., 2009). Les substrats utilisés en FMS sont insolubles dans l'eau, mais doivent absorber l'eau pour être utilisés par les micro-organismes. Un taux d'humidité excessif peut entraîner des problèmes de compaction et altérer la structure des particules solides, limitant ainsi les transferts d'oxygène et de chaleur (Krishna, 2005; Raghavarao et al., 2003). Plusieurs études ont montré que l'humidification du substrat était un paramètre important pour la production d'enzymes diverses (Ahirwar et al., 2016; Navya P N et al., 2012; Navya & Pushpa, 2013; Park Y. et al., 2002). D'après (Navya P N et al., 2012), sur une gamme d'humidité du substrat (cosses de café) allant de 40% à 80%, les meilleurs résultats pour la production par *Rhizopus stolonifer* de β-glucosidase ont été atteint autour des 53%.

Plutôt que de se baser sur la teneur en eau, les besoins en eau des micro-organismes sont définis en termes d'activité de l'eau (a_w), qui représente la disponibilité en eau dans le substrat solide (Scott, 1953). C'est un paramètre thermodynamique défini en relation avec le potentiel chimique de l'eau.

$$a_w = \frac{HR}{100} = \frac{p}{p_0}$$

Elle peut être définie comme le rapport de la pression partielle de vapeur d'eau dans le substrat (p) sur la pression partielle de vapeur de l'eau pure (p_0) à la même température. Elle est corrélée également à l'humidité relative (HR) (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). Les valeurs de l'activité de l'eau sont comprises entre 0 et 1. Les valeurs d'a_w optimales peuvent différer selon les phases de croissance du micro-organisme mais doivent généralement être supérieur à 0,6 (Roussos et al., 1997).

Une étude menée par (Molin et al., 1992) a comparé la croissance de *Trichoderma viride* et *Rhizopus oligosporus* dans un milieu solide à différentes valeurs d'activité de l'eau. Elle

propose un modèle reliant les taux de croissance radiale et des hyphes en fonction de la direction de la croissance apicale. La production de spores fongiques est également influencée par l'activité de l'eau. Par exemple, *P. citrinum* et *P. roqueforti*, arrêtent la sporulation à une activité de l'eau de 0,91, tandis que *P. camemberti* et *P. nalgiovense* ne sporulent plus à une a_w de 0,87 et *P. nordicum* n'a jamais cessé de produire des spores, même à la plus faible a_w de 0,83 (Camardo Leggieri et al., 2018). Concernant la production d'enzymes, dans un milieu de culture solide de *T. viride*, la biosynthèse de polygalactouronase, de D-xylanase et de b-galactosidase est affectée par l'activité de l'eau du substrat. Il a été constaté que la production maximale de polygalactouronase et de D-xylanase se produit à une a_w de 0,99. Cependant, la formation de b-galactosidase était optimale entre une a_w de 0,96 et 0,98 (Grajek & Gervais, 1987).

4.4.3.4. Le temps

Les cinétiques de croissance microbienne jouent un rôle important dans les procédés en FMS. Dans des conditions appropriées, les champignons commencent à croître en étendant leurs pointes d'hyphes (Ingold, 2012). Le développement d'une matrice de mycélium dense et progressive, a lieu ensuite jusqu'à ce que la surface du substrat soit presque entièrement colonisée par le mycélium (Montoya et al., 2012). Pendant la phase de colonisation de la croissance fongique, des enzymes extracellulaires sont produites pour dégrader le substrat lignocellulosique en petites molécules solubles qui peuvent être utilisées comme nutriments pour la croissance (Lim et al., 2011; Montoya et al., 2012).

Les premiers signes de croissance fongique ont été observés dès le deuxième jour de la fermentation en milieu solide dans la plupart des études portant sur la production de cellulases. Après 7 à 11 jours, le champignon cultivé peut avoir complètement colonisé le substrat, selon la quantité de substrat utilisée (Elisashvili et al., 2009; Kumaran et al., 1997). Enfin, à la dernière étape de la croissance fongique, les corps fructifères des champignons peuvent s'être développés (Montoya et al., 2012).

Concernant la production de xylanase sur de la paille de riz par *Aspergillus niger*, (Park Y. et al., 2002) ont obtenu un pic d'activité entre 4 et 6 jours de fermentation, suivi d'une diminution de celle-ci. Pour autre exemple, le champignon *Phanerochaete chrysosporium* a été cultivé sur des coques de soja en tant que substrat lignocellulosique, dans des conditions

de fermentation sur une durée optimale de 6 jours pour produire les enzymes CMCase et FPase (Jha et al., 1995).

4.4.3.5. La température

La régulation de la température est un défi majeur lors des fermentations en milieu solide (FMS), car elle est étroitement liée aux activités métaboliques du micro-organisme en développement (Bhargav et al., 2008). Lorsque le champignon filamenteux se propage dans le substrat, il génère de la chaleur par son métabolisme respiratoire, entraînant une augmentation de la température pouvant atteindre 20°C au-dessus de la température d'incubation (Raghavarao et al., 2003). Cette élévation de température peut dégrader les produits sécrétés dans le milieu et interrompre la phase de croissance et de nutrition, au profit de la phase reproductive de la moisissure (Aidoo et al., 1982; Lonsane, 1985). Cependant, cette phase de reproduction met fin aux activités métaboliques recherchées, sauf si le produit recherché est précisément les conidies (spores issus de la reproduction asexuée), comme dans les produits de lutte biologique en agriculture (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). La faible conductivité thermique des substrats végétaux et l'absence d'eau libre dans le milieu de culture favorisent l'accumulation de chaleur, créant des gradients thermiques dans le substrat au fil du temps (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). Lorsqu'on travaille avec une fine couche de substrat, la chaleur se dissipe plus facilement dans l'air, mais lorsque l'épaisseur du milieu augmente (système "en couche profonde"), il est nécessaire d'intervenir pour réduire l'accumulation de chaleur, en réalisant un brassage doux du milieu ou en faisant passer un flux d'air forcé, humidifié et refroidi à travers la couche de milieu (Mitchell et al., 2011; Raghavarao et al., 2003; Sargantanis et al., 1993).

La croissance fongique et la production de métabolites secondaires en FMS sont fortement influencées par la température et les processus de transfert de chaleur dans le lit de substrat (Raghavarao et al., 2003). Néanmoins, la température optimale pour la croissance fongique peut différer de celle requise pour la formation des produits (Yoon et al., 2014). Par exemple, *Pcynoporus sanguineus* atteint une croissance optimale à 37°C, mais 28°C est plus favorable pour la production de cellulases par ce champignon (Quiroz-Castañeda et al., 2009).

La température est un paramètre dépendant du champignon qui influence la production de cellulases, xylanases, lignine peroxydases, manganèse peroxydases ou encore laccases. Par

exemple, pour ces activités le champignon à pourriture blanche *P. chrysosporium* est normalement cultivé à 37°C (Huang et al., 2010; Shrestha et al., 2008; Zeng et al., 2010), tandis que *L. edodes* est cultivé à une température beaucoup plus basse (25-27°C) pour produire de la cellulase de manière optimale via la FMS (Elisashvili et al., 2008; Philippoussis et al., 2011).

4.4.3.6. L'aération et les transferts gazeux

En fermentation en milieu solide, la conductivité et le transfert de chaleur entre les substrats végétaux et l'air sont des défis importants. L'aération devient donc un paramètre essentiel, surtout lorsqu'il s'agit d'une culture fongique, car ces micro-organismes aérobies ont besoin d'un apport continu en oxygène pour coloniser le substrat (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). Le développement fongique peut également se produire à l'intérieur, entre les particules de substrat, si l'air présent contient suffisamment d'oxygène. Ainsi, l'aération joue deux rôles majeurs (Chahal, 1983; Tabak & Cooke, 1968). Elle assure d'une part, l'approvisionnement en oxygène pour le métabolisme aérobie, et d'autre part, l'élimination des produits métaboliques tels que le CO_2, la chaleur, la vapeur d'eau et les composés volatils (Lonsane, 1985). La régulation de l'aération doit prendre en compte le développement mycélien en surface ainsi qu'à l'intérieur du substrat. Lorsque le champignon filamenteux se développe entre les particules du substrat, il produit de l'eau et consomme partiellement le substrat, ce qui entraîne des modifications dans la structure des particules formant la couche de substrat (Ghildyal et al., 1992). Cela peut entraîner des changements de porosité et de tassement dans la matrice, créant ainsi des "chemins préférentiels" pour le passage de l'air (Duchiron & Legin-Copinet, 2019).

En ce qui concerne son influence sur la production d'enzymes, (Milagres et al., 2004) ont étudié la production de xylanase par *Thermoascus aurantiacus* à partir de bagasse de canne à sucre dans un fermenteur de croissance aéré. Après 10 jours de fermentation à l'état solide, les résultats ont montré que les débits d'air ont eu un effet significatif sur l'activité enzymatique.

4.4.3.7. Le pH

Au cours des fermentations en milieu solide, les activités métaboliques des micro-organismes engendrent des fluctuations de pH dans le milieu de culture, résultant en des variations d'acidité ou d'alcalinité. Lorsque le substrat n'est pas soumis à une agitation ou à

une homogénéisation pendant la fermentation, la maîtrise du pH devient délicate (Chen, 2013). Heureusement, les champignons filamenteux, adaptés aux conditions en milieu solide, manifestent une tolérance à un large éventail de pH, s'étendant de 2,0 à 9,0, avec une plage optimale entre 3,0 et 6,0 (Krishna, 2005). Un atout supplémentaire réside dans leur préférence pour un environnement acide, car cela retarde la croissance des bactéries, tandis que les moisissures prospèrent dans de telles conditions, diminuant ainsi le risque de contaminations bactériennes indésirables (Duchiron & Legin-Copinet, 2019).

L'influence du pH sur la production de xylanase par *Aspergillus tubingensis* a été étudiée en ajustant le pH initial du milieu (milieu MS) de 3 à 9. La production maximale de xylanase a été obtenue à un pH initial de 6. La production de l'enzyme a diminué dans les plages acides et fortement alcalines (Pandya & Gupte, 2012). En général, les xylanases dérivées de souches fongiques devraient être utilisées dans la plage de pH de 4 à 6 (Bajpai, 1997). En règle générale, un pH initial d'environ 5 est préféré pour la production de cellulases par la plupart des champignons (Cen & Xia, 1999; Deswal et al., 2011; Levin et al., 2008). Il convient de noter que la plupart des substrats lignocellulosiques ont des propriétés tampon qui permettent de minimiser les variations de pH pendant la FMS (Cen & Xia, 1999).

4.5. Les dispositifs de fermentation solide

Comme décrit précédemment, plusieurs paramètres rentrent en jeu dans la mise au point d'une fermentation solide. Les outils et dispositifs existants permettent de contrôler et optimiser certains d'entre eux (Chen, 2013; Duchiron & Legin-Copinet, 2019; Durand, 1998)

À l'échelle du laboratoire, l'utilisation de l'Erlenmeyer à col large est souvent adoptée, étant donné qu'il favorise une aération efficace en raison de la quantité substantielle de substrat qu'il peut contenir (Duchiron & Legin-Copinet, 2019; Singh Nee' Nigam & Pandey, 2009). D'autres types d'équipement plus sophistiqués comme les réacteurs à lit fixe ou les réacteurs à colonne représentent une alternative qui permet de réguler l'oxygénation et l'humidification grâce à un flux d'air humide ou sec et l'apport ou non de liquide (Figure 20A) (Durand, 2003; Krishna, 2005). Néanmoins, pour accroître la capacité au-delà du litre, d'autres équipements sont nécessaires. Le réacteur à tambour (pouvant être équipé de pales rotatives ou de cannes) constitue une option offrant un mélange homogène du substrat et une

oxygénation notable (Figure 20B). Cependant, ces systèmes présentent certaines limites. D'une part, leur taille est intrinsèquement restreinte à environ 2 m^3 en raison de leur conception (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). D'autre part, malgré leur avantage indéniable en matière de mélange, ils peuvent altérer la structure de la matrice solide et endommager les hyphes formés par le champignon (Lonsane, 1985; Stuart et al., 1999).

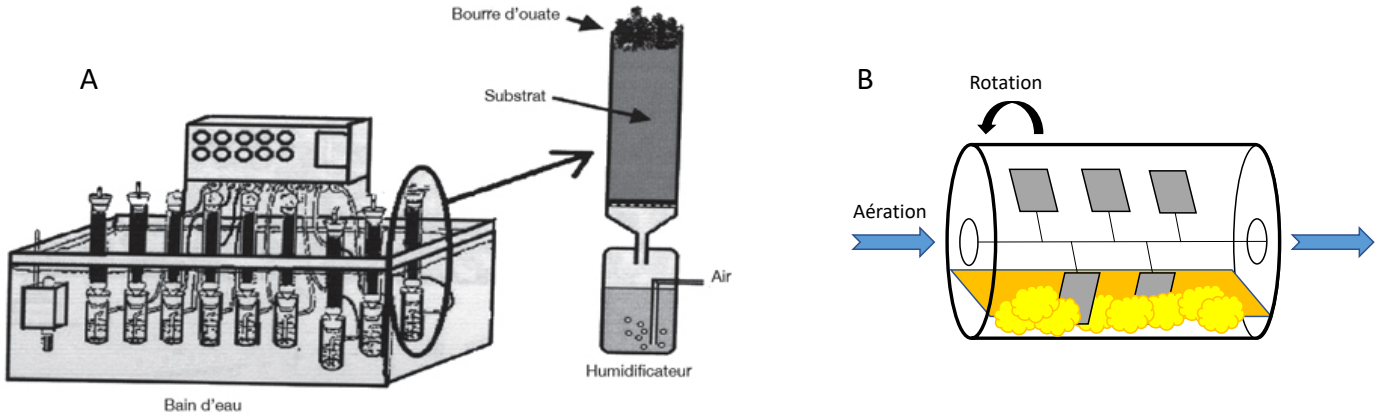

Figure 20. A : Schéma du bioréacteur à colonne breveté d'ORSTOM, tiré de (Durand, 2003) ; B : Réacteur à tambour avec pales d'agitation

Généralement, lorsqu'on envisage de passer de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote, voire industrielle, pour la mise en œuvre du procédé, une difficulté majeure se présente sous la forme d'une génération significative de chaleur et de l'hétérogénéité inhérente au milieu solide (Singh Nee' Nigam & Pandey, 2009). Le substrat solide finit par subir un tassement et une compaction, engendrant la formation de chemins préférentiels qui constituent les seuls itinéraires encore accessibles à l'air. Tous ces phénomènes ont un impact sur le transfert de chaleur et de masse (Duchiron & Legin-Copinet, 2019; Durand, 2003). Pour tenter de surmonter ces défis de transfert, un type de réacteurs a été exploré : le réacteur à plateau (ou couche mince) de type Koji. Le réacteur à plateau s'inspire des fermentations traditionnelles en milieu solide, telles que le Koji, en utilisant des plateaux perforés dans lesquels un substrat organique humidifié est disposé en une fine couche, puis inoculé avec des micro-organismes (Roussos et al., 1997) (Figure 21). Ces plateaux sont incubés à une température spécifique et

dans un environnement humide pendant plusieurs jours. Ce système offre l'avantage de sa simplicité, nécessitant peu d'interventions humaines pendant la fermentation (Krishna, 2005). Cependant, il présente l'inconvénient d'une utilisation peu efficace du substrat, principalement en surface, par les micro-organismes (Thomas et al., 2013). Ce type de réacteur a trouvé plusieurs applications, dont l'enrichissement en protéines de coproduits agro-industriels, la production d'enzymes et de biopesticides (Duchiron & Legin-Copinet, 2019).

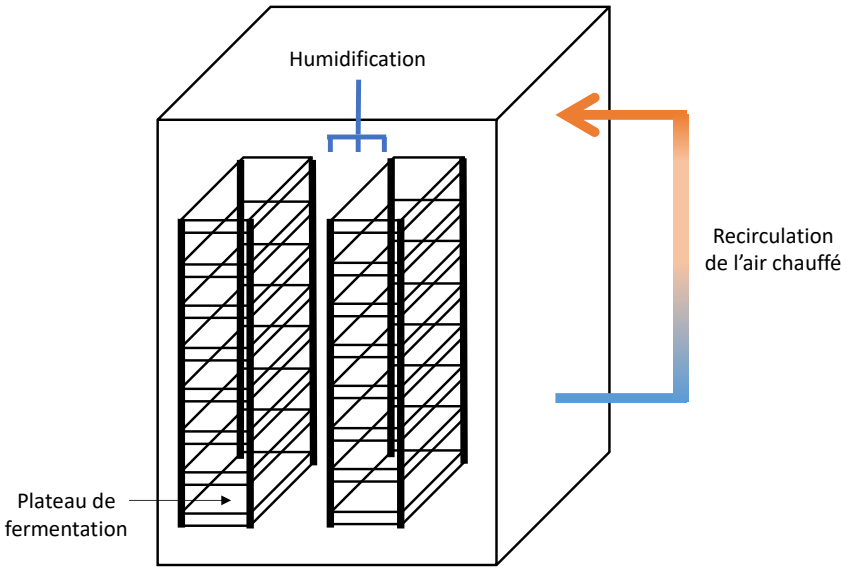

Figure 21. Réacteur de type Koji

4.6. Les enzymes produites par fermentation solide sur marc de café

La fermentation en état solide peut être utilisée pour diverses applications allant de la production de métabolites secondaires, d'acides organiques, de spores, d'arômes (esters volatils), d'acides gras ou encore d'enzymes diverses (Bhargav et al., 2008). Nous allons à présent nous plonger plus spécifiquement dans l'étude de la production d'enzymes, qui a été l'un des objets centraux de cette thèse.

4.6.1. Généralité sur les enzymes produites par fermentation solide

Historiquement, les premières productions d'enzymes étaient réalisées par fermentation solide, y compris en Europe et aux États-Unis, en cultivant des souches fongiques productrices sur des plateaux. Ces méthodes ont été largement utilisées jusqu'aux années 1950, mais ont été progressivement remplacées par des cultures en milieu liquide, sauf en Extrême-Orient où le procédé a été développé et automatisé (Duchiron & Legin-Copinet, 2019). Toutefois, au cours des récentes années, diverses enzymes variées ainsi que leur production respectueuse de l'environnement par fermentation en milieu solide ont fait l'objet d'études. Elles peuvent être grossièrement classées en deux groupes principaux (Steudler et al., 2019) :

1- Les enzymes hydrolytiques, telles que les amylases, les pectinases et les protéases.

2- Les enzymes lignocellulolytiques, telles que les cellulases, les xylanases, les laccases et diverses peroxydases.

D'autres enzymes, telles que les phytases ou les tannases, ont également été étudiées par certains groupes de recherche (Arora et al., 2017; Buddhiwant et al., 2016; C. Wu et al., 2018).

4.6.2. La récupération des enzymes

Il est important de noter que les produits obtenus peuvent rester piégés dans la matrice solide, ce qui nécessite la mise en place d'un procédé d'extraction en fin de fermentation (Figure 22). Tous ces phénomènes doivent être pris en considération, car ils peuvent influencer la performance et les coûts du procédé de fermentation en milieu solide (Hölker & Lenz, 2005). Les principaux paramètres jouant un rôle dans cette extraction vont être le temps, le ratio liquide-solide, l'agitation, le tampon de récupération et la température (Díaz et al., 2007; Ikasari & Mitchell, 1996; Marín et al., 2019; Zhang & Sang, 2015). En effet, comme pour l'extraction solide-liquide des polyphénols développée en partie 3.2 de cette étude bibliographique, on retrouve globalement les mêmes aspects techniques. Concernant le tampon de récupération, celui-ci va dépendre du type d'enzyme que l'on souhaite extraire (Heck Jx et al., 2005). Généralement, l'eau déionisée est préconisée car elle a une constante diélectrique relativement élevée, ce qui peut réduire la force d'interaction entre les enzymes et les substrats (Zhang & Sang, 2015). Le volume de solvant a joué un rôle important lors de l'extraction des enzymes, car un volume de solvant trop faible ne pouvait pas pénétrer

suffisamment les substrats fermentés et un volume trop élevé pouvait diluer les extraits. Pendant l'extraction des enzymes, les conditions d'agitation présentent certains avantages par rapport aux conditions stationnaires, tels qu'une distribution rapide et uniforme des substrats fermentés dans la phase continue du solvant et une réduction de la polarisation de concentration et du temps d'extraction (Chandra et al., 2010). Le temps d'extraction est également un facteur important, car un temps d'extraction plus court peut entraîner une imprégnation incomplète des substrats par le solvant, tandis qu'un temps plus long peut entraîner une perte d'activité enzymatique (Zhang & Sang, 2015).

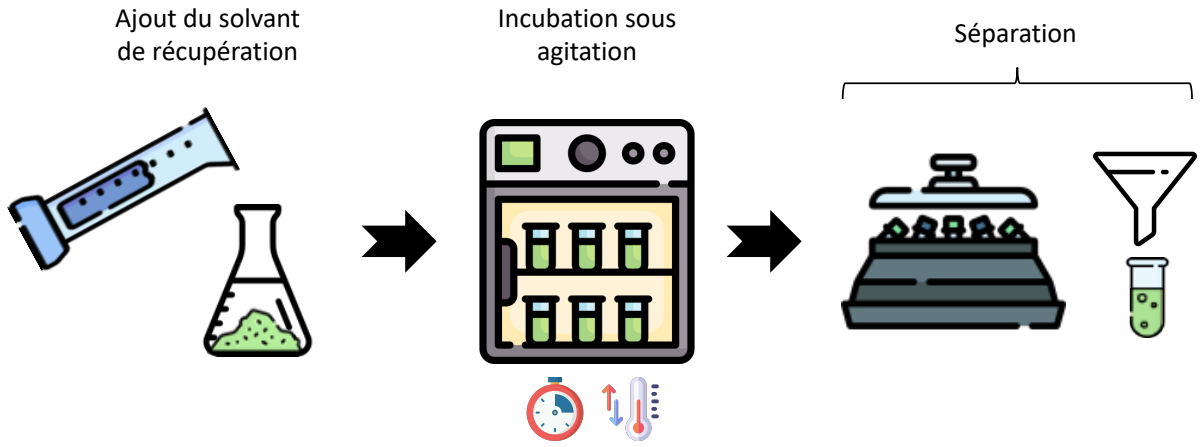

Figure 22. Schéma du procédé de récupération des enzymes extracellulaires après fermentation solide à l'échelle laboratoire

4.6.3. Les enzymes produites par fermentation solide sur le marc de café et leurs applications

Le développement et la production d'enzymes pour les applications industrielles représentent un marché mondial dont la valeur oscillait entre 5 000 millions et 5 500 millions de dollars en 2016. Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans divers secteurs industriels, avec des applications majeures dans les domaines de l'agroalimentaires (produits laitiers, boulangerie, jus de fruits, bière, vin) ainsi que dans d'autres domaines tels que les détergents, la production de biocarburants, la nutrition animale, les textiles, le cuir, l'industrie papetière, la cosmétique ou encore le milieu pharmacologique. Les applications en nutrition humaine et

animale représentent environ 55% à 60% du marché mondial des enzymes (Guerrand, 2017). Les carbohydrases, les protéases et les lipases sont les principales classes enzymatiques utilisées dans les applications industrielles. Le segment des carbohydrases représente près de 50% du marché mondial des enzymes industrielles, atteignant 70% dans le domaine de l'alimentation et des boissons. Les protéases représentent entre 25% et 30% du marché global, suivies des lipases qui détiennent moins de 10% de part de marché. D'autres catégories d'enzymes comprennent les oxydases (comme la glucose oxydase), la phytase et la transglutaminase, qui sont généralement associées à des applications et des marchés spécifiques. Les carbohydrases constituent une catégorie très vaste d'enzymes, comprenant des enzymes telles que l'amylase, la cellulase, la pectinase, les hémicellulases et diverses autres enzymes (Guerrand, 2018).

Le marc de café est un substrat de choix quand il s'agit de la production d'enzymes par diverses souches de champignons filamenteux (Montoya et al., 2012). Étant naturellement colonisé par plusieurs micro-organismes de par sa nature humide obtenu en fin d'extraction de la célèbre boisson chaude et aussi de par sa composition en sucres, protéines, lipides et autres composés disponibles (Esquivel & Jiménez, 2012). Le Tableau 8 regroupe les différentes classes d'enzymes produites par divers champignons sur le marc de café avec les conditions de cultures associées. On remarque que la majorité des enzymes produites sur ce substrat sont des glycose hydrolases et qu'*Aspergillus* est le genre le plus rependu.

Tableau 8. Différentes enzymes produites en fermentation solide sur du marc de café par des champignons filamenteux et les conditions associées à leur production

Références	Types d'enzymes	Champignons	Conditions de culture
(França et al., 2022)	Lipase	*Aspergillus flavus* *Aspergillus fumigatus* *Aspergillus foetidus* *Paecillomyces variotii* *Mucor hiemalis*	Humidité : 60% Durée : 6 jours Température : 28°C pH : 6 Inoculum : 10^7 s/g

(Murthy et al., 2009)	α-amylase	*Neurospora crassa*	Humidité : 66% Durée : 5 jours Température : 29°C pH : 4,6 Inoculum : $5x10^6$ s/g
(El-Batal et al., 2015)	Laccase	*Pleurotus ostreatus*	Humidité : 66% Durée : 7 jours Température : 29°C Inoculum : $3,2x10^6$ s/g
(Favaro et al., 2020)	β-mannanase β-glucosidase	*Aspergillus niger*	Humidité : 50% Durée : 5 jours Température : 30°C pH : 5,5 Inoculum : 10^7 s/g
(Yilmazer et al., 2021)	β-mannanase recombinante	*Aspergillus fumigatus* exprimé dans *Aspergillus sojae*	Humidité : 75% Durée : 7 jours Température : 30°C pH : 5
(Regalado et al., 2000)	β-mannanase	*Aspergillus niger* *Aspergillus oryzae*	Humidité : 55% Durée : 2,5 et 5 jours Température : 30°C pH : 5,4 Inoculum : 10^6 s/g
(Rocha et al., 2021)	Protéase	*Aspergillus sydowii*	Humidité : 60% Durée : 3 jours Température : 30°C
(Mansor et al., 2019)	Tannase	*Aspergillus niger*	Humidité : 50% Durée : 12 jours Température : 32°C Inoculum : $3,3x10^6$ s/g
(Murthy & Naidu, 2012a)	Xylanase	*Penicillium sp*	Humidité : 50% Durée : 5 jours Température : 27°C pH : 5
(Ravindran et al., 2019)	Xylanase	*Aspergillus niger*	Humidité : 70% Durée : 5 jours Température : 30°C Inoculum : $6,5x10^6$ s/g

NB : s/g = spores/gramme

4.6.3.1. Les lipases

Les lipases, (acyl-hydrolases de triacylglycérol, EC 3.1.1.3) sont une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des triglycérides à longue chaîne. Leurs caractéristiques les plus remarquables comprennent leur large spécificité de substrat, leur grande stabilité, y compris dans les solvants organiques, ainsi que leur capacité à convertir de nombreux substrats avec une stéréosélectivité et une énantiosélectivité élevées (Choudhury, 2015).

Même si elles représentent moins de 10% du marché mondial des enzymes. Elles jouent néanmoins un rôle crucial dans de nombreux segments industriels tels que les détergents en tant qu'agents pour éliminer les graisses (Cherif et al., 2011), la production d'huiles et de corps gras, les produits alimentaires, les biocarburants par transestérification (dans cette réaction, des triglycérides, généralement présents dans les huiles végétales ou les graisses animales, réagissent avec un alcool, comme le méthanol ou l'éthanol, en présence d'un catalyseur pour produire du biodiesel et du glycérol comme sous-produit) (Fan et al., 2012; Shah et al., 2004) et le secteur pharmaceutique pour la décomposition des graisses présentes dans les aliments, afin qu'elles puissent être absorbées dans l'intestin (Loli et al., 2015).

Ces enzymes offrent des avantages uniques en termes de catalyse des réactions de clivage des lipides, améliorant ainsi la qualité et la stabilité des produits finaux (Guerrand, 2017).

4.6.3.2. Les amylases

Les α-amylases (EC 3.2.1.1) sont des enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons α-1,4-glycosidiques internes dans l'amidon, produisant des produits à faible poids moléculaire tels que le glucose, le maltose et les unités de maltotriose (Gupta et al., 2003; Kandra, 2003; Rajagopalan & Krishnan, 2008). Elles sont également classées comme glycosidases et se subdivisent en α-, β-, γ- et iso-amylases (Steudler et al., 2019).

Les amylases font partie des enzymes les plus utilisées et revêtent une grande importance pour la biotechnologie, constituant une classe d'enzymes industrielles représentant environ 25% du marché mondial des enzymes (Rajagopalan & Krishnan, 2008; Reddy et al., 2003).

Les α-amylases présentent un potentiel d'application dans un grand nombre de processus industriels tels que l'industrie alimentaire (de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010), la fermentation, les textiles pour la délignification (Ahlawat et al., 2009), le papier pour rendre

la surface du papier suffisamment lisse et résistante (de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010), les détergents (deuxième type d'enzymes utilisées dans la formulation des détergents enzymatiques, et 90% de tous les détergents liquides contiennent ces enzymes) (Gupta et al., 2003; Hmidet et al., 2009; Mitidieri et al., 2006). Mais aussi, dans l'industrie pharmaceutique comme aide au traitement des troubles digestifs (Gupta et al., 2003). Dans l'industrie de la lessive et du lavage automatique de la vaisselle, les α-amylases sont utilisées pour dégrader les résidus d'aliments riches en amidon tels que les pommes de terre, les sauces, les crèmes dessert, le chocolat, etc., en dextrines et autres oligosaccharides de plus petite taille (Mukherjee et al., 2009; Olsen & Falholt, 1998).

4.6.3.3. Les laccases

La laccase est un type de polyphénol oxydase contenant du cuivre (p-diphénol oxydase, EC 1.10.3.2) qui oxyde les polyphénols, les phénols méthoxy-substitués, les diamines et une gamme considérable d'autres composés (Minussi et al., 2002). Leur remarquable spécificité de substrat leur permet également de transformer la lignine et des composés apparentés à celle-ci (Gianfreda et al., 1999). Elle peut avoir diverses applications comme la bioremédiation d'eau usées par la dégradation des composés aromatiques, y compris les phénols et les amines aromatiques, qui constituent l'une des principales classes de polluants et sont fortement réglementés dans de nombreux pays (Karam & Nicell, 1997; Yagüe et al., 2000). Elle trouve aussi une utilité dans la stabilisation des vins (Minussi et al., 2007) ou encore dans le traitement de jus de fruit pour éviter leur brunissement (Minussi et al., 2002). Dans l'industrie du textile, elle est considérée comme une solution potentielle pour le problème des effluents en raison de sa capacité à dégrader les colorants actuellement utilisés dans cette industrie (Pannu & Kapoor, 2014). Concernant le milieu pharmaceutique, les laccases sont utiles pour la synthèse de composés médicinaux complexes tels que les anesthésiques, les anti-inflammatoires, les antibiotiques, les sédatifs (Maestre-Reyna et al., 2015).

4.6.3.4. Les hémicellulases

Dans les graminées et les feuillus, le xylane est le principal composant de l'hémicellulose, tandis que dans les résineux, les fruits et les graines de plantes, l'hémicellulose est principalement présente sous forme de mannane (Scheller & Ulvskov, 2010). Parmi les

hémicellulases les plus produites pour leur capacité à dégrader les fibres de divers substrats on retrouve donc les mannanases et les xylanases (Dawood & Ma, 2020).

Concernant les mannanases, elles sont particulièrement étudiées sur les coproduit de l'industrie du café et sur le marc de café particulièrement du fait de sa composition riche en polysaccharides non solubilisés tels que les galactomannanes (Campos-Vega et al., 2015; Favaro et al., 2020). La β-mannanase (EC 3.2.1.78) est l'enzyme clé de la dégradation du mannane et fait partie de la familles des glycosyl hydrolases (Dawood & Ma, 2020). Son équivalent pour le xylane et qui fait partie de la même famille est l'endo-1,4-β-D-xylanase (EC 3.2.1.8) (Chandel & Silva, 2013).

Il existe un large éventail d'applications industrielles des β-mannanases et des xylanases dans divers domaines, purifiées ou sous forme de cocktails comme dans les aliments pour la clarification de jus (Adigüzel & Tunçer, 2016; Adiguzel et al., 2016; Zhao et al., 2020), la pâte à papier avec le blanchiment et le traitement de la fibre cellulosique (Patel & Dudhagara, 2020; Sunna & Antranikian, 1997), la production de produit de fermentation comme le bioéthanol suite à une fermentation réalisée après hydrolyse de biodéchets (Shukor et al., 2016; Taherzadeh & Karimi, 2007; Zhang & Sang, 2015), le textile, les détergents, les aliments pour animaux et les produits pharmaceutiques (Dhawan & Kaur, 2007; Motta et al., 2013).

4.6.3.5. Les protéases

Les protéases (3.4.X.X) sont des enzymes qui clivent les protéines en hydrolysant les liaisons peptidiques. Selon leur mécanisme catalytique, elles peuvent être subdivisées en deux catégories : les exoprotéases, qui clivent un petit nombre d'acides aminés à l'extrémité C- ou N-terminale, et les endoprotéases, qui clivent au milieu de la chaîne polypeptidique. Les exoprotéases peuvent être classées en di- et tripeptidyl protéases, tandis que les endoprotéases peuvent être différenciées en sérine-protéases (comme la subtilisine), cystéine-protéases (comme la papaïne), aspartate-protéases (comme la pepsine) et métallo-protéases (comme la thermolysine) (Barrett & McDonald, 1986).

Les protéases microbiennes, sont utilisées dans différents secteurs d'activité, tels que les détergents où elles représentent 30% de la production mondiale d'enzymes (Fazilat, 2016). Elles sont utiles pour éliminer les taches comprenant des protéines au même titre que les

lipases pour les taches de gras (Contesini et al., 2018). Les protéases ayant une activité élastolytiques et kératinolytiques ont suscité une attention particulière dans l'industrie du cuir (Razzaq et al., 2019). En effet les étapes de trempage et délainage peuvent être grandement faciliter avec l'utilisation de protéases (Kamini et al., 1999). Concernant leurs utilisations dans le domaine pharmaceutique, elles sont étudiées pour le traitement de maladies telles que les ulcères cutanés, le cancer, la fibrose kystique, les problèmes cardiaques, les troubles digestifs et l'inflammation (Chanalia et al., 2011).

4.6.3.6. Les tannases

Les tannases, également connues sous le nom d'hydrolase d'acyle de tanin (EC 3.1.1.20), catalysent la rupture des liaisons ester des tanins hydrolysables tels que les gallotannins, produisant de l'acide gallique et du glucose (Aguilar et al., 2007; M. Kumar et al., 2016).

Une des principales applications des tannases se trouve dans la fabrication du thé instantané. Les applications des tannases dans les produits industriels alimentaires et de boissons contribuent à éliminer les effets indésirables provoqués par les tanins comme la turbidité de la boisson au refroidissement (Boadi & Neufeld, 2001). Une autre application importante des tannases est la production d'acide gallique et de propylgallate (Kar et al., 2002). Le premier est utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la synthèse d'antibiotiques et dans l'industrie alimentaire comme substrat pour la synthèse chimique de conservateurs alimentaires tels que le pyrogallol et les gallates. D'autre part, le propylgallate est un antioxydant alimentaire très important (Sharma et al., 2017).

4.6.4. Les cocktails enzymatiques

Aujourd'hui, l'industrie des détergents est l'un des principaux demandeurs d'enzymes, représentant 7,4% du marché des enzymes d'ici 2024 (Vicaria et al., 2022). L'utilisation d'enzymes réduit l'utilisation de produits chimiques, ce qui contribue à la réduction de la pollution environnementale. En général, quatre classes d'enzymes (décrites précédemment) sont couramment utilisées dans la formulation de détergents mono-enzymatiques, double ou multi-enzymatiques. Ces enzymes sont généralement produites séparément, puis combinées pour former un cocktail enzymatique qui est défini comme une formulation d'enzymes hydrolytiques avec une concentration définie (Jørgensen & Pinelo, 2017). Elles peuvent aussi être produites par le même champignon filamenteux par exemple lors d'une même

fermentation comme la production d'enzymes multi-hydrolytiques à partir d'un mélange optimisé de résidus de marc de raisin et de son de blé en utilisant *Aspergillus niger* (Papadaki et al., 2020). Différentes entreprises proposent aujourd'hui des solutions pour l'utilisation de cocktails enzymatiques dans diverses applications. Par exemple, la société Provita commercialise un complexe enzymatique visant à améliorer la digestion des protéines, des graisses, des glucides et du lactose chez l'Homme. Alltech et Jefo sont deux entreprises spécialisées dans la formulation de cocktails enzymatiques pour optimiser l'efficacité alimentaire dans le domaine de la nutrition animale. Enfin, la compagnie Felema propose une large gamme de détergents enzymatiques complets adaptés à une variété d'applications.

4.7. Les principaux fabricants d'enzymes dans le monde

Aujourd'hui, le secteur des enzymes industrielles est largement contrôlé par les cinq grandes entreprises que sont Novozymes, DuPont, Royal DSM, AB Enzymes et BASF, qui détiennent une part d'environ 75% du marché global. D'autres acteurs majeurs dans ce domaine incluent Amano Enzymes, Biocatalysts, BioResource International Inc., Chr. Hansen Holding AS, Enzyme Development Corporation, Lesaffre, ainsi que plusieurs autres sociétés de renom (Report on Industrial Enzymes Market, 2022).

5. Conclusion et objectifs

En Europe et tout particulièrement en France, la gestion des biodéchets est en constante évolution avec la mise en place de loi contre le gaspillage, qui encourage leur valorisation. Le grain de café étant une denrée consommée à grande échelle à travers le monde, ses coproduits font l'objet d'une attention toute particulière. Le marc de café, un des principaux coproduits du café, donne lieu à de nombreuses études sur les voies possibles de sa valorisation. L'utilisation d'une cascade de valorisation permet de pouvoir valoriser efficacement un coproduit en l'épuisant de manière progressive par l'enchaînement de divers procédés. Dans le cadre de cette thèse, les deux procédés choisis pour valoriser efficacement le marc de café sont l'extraction de composés phénoliques et la fermentation solide pour la production d'enzymes. Ces deux méthodes présentent une complémentarité grâce à leurs approches distinctes : l'une se concentre sur la récupération des composés extractibles

présents dans le marc, tandis que l'autre exploite l'utilisation de champignons filamenteux pour la production d'enzymes exogènes au marc.

Objectif général de la thèse :

Comment valoriser de manière efficace le marc de café ?

Étudier la faisabilité de la cascade de valorisation, optimiser sa mise en œuvre et se pencher sur les contraintes de sa mise en place

Depuis déjà plusieurs années, de nombreuses publications scientifiques mettent en avant des procédés d'extraction permettant de valoriser diverses biomasses pour en tirer le plus de bénéfices possibles. L'extraction solide-liquide est un procédé qui a fait ses preuves et peut être réalisé de différentes manières pour extraire les composés phénoliques de plusieurs matrices végétales. Des technologies innovantes permettent aujourd'hui de pouvoir limiter l'impact écologique tout en garantissant une efficacité remarquable.

Objectifs du chapitre 1 :

- ***L'utilisation d'ultrasons améliore t'elle l'extraction des composés phénoliques du marc de café par rapport à une extraction conventionnelle ?***

1) Comparer deux méthodes d'extractions des composés phénoliques et optimiser les conditions employées.

2) Caractérisation de l'extrait obtenu après utilisation des ultrasons

Une autre forme de valorisation qui s'inspire de la nature, est l'utilisation de micro-organismes permettant la synthèse de composés à hautes valeurs ajoutées à partir de substrats variés. La fermentation solide est un procédé économique et facile à mettre en œuvre qui est largement employée pour la production de divers enzymes. Son utilisation pour la valorisation de biodéchets est en expansion. Son utilisation après une étape d'extraction permet l'utilisation d'une fraction restante importante du marc, ses fibres.

Objectifs du chapitre 2 :

- ***Le marc de café ayant subi une extraction solide-liquide permet-il la production d'enzymes variées par un procédé de fermentation solide ?***

1) Isoler, identifier et cribler les champignons natifs du marc de café pour la production d'enzymes diverses.

2) Optimiser l'extraction et les conditions de culture de *Penicillium* sp. pour la production d'un cocktail enzymatique hydrolytique.

3) Caractériser les cocktails enzymatiques.

Au-delà de la mise en œuvre de ces procédés, leur enchaînement en cascade permet un épuisement progressif, complémentaire et efficace. Cependant, la composition d'une ressource peut évoluer dans le temps de par la dégradation naturelle qu'elle peut subir. L'étude des contraintes liées à l'industrialisation telles que le stockage, est alors primordiale.

Objectifs du chapitre 3 :

- ***En quoi des contraintes industrielles comme le temps de stockage peuvent influencer le déroulement d'une valorisation ?***

1) Caractérisation des transformations du marc de café liées aux conditions de stockage

2) Comparaison de l'application de la cascade sur deux marcs ayant chacun subi un vieillissement différent

Cette thèse s'inscrit dans le contexte d'un projet d'étude qui rassemble divers acteurs universitaires et privés, ayant pour objectif de catalyser les efforts de valorisation mis en place autour du marc de café : le projet Recirculate. Ce projet permet notamment d'entrevoir une valorisation énergétique finale avec l'utilisation d'un procédé de pyrolyse. La Figure 23 offre une vue schématique de la séquence des procédés de la cascade de valorisation étudiée, des produits générés ainsi que du contexte global de la thèse.

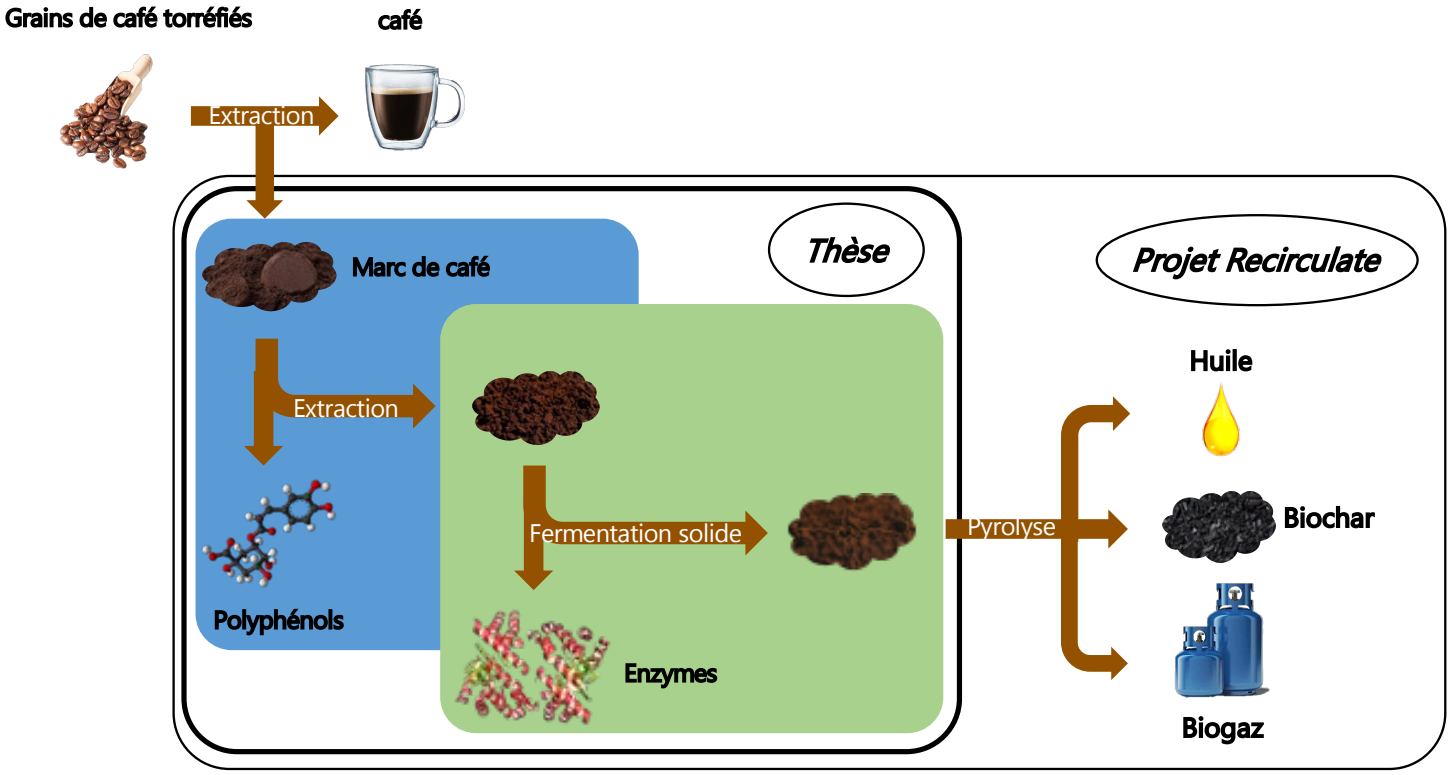

Figure 23. Schéma de la cascade de valorisation développée pendant la thèse

Chapitre 1 : L'éco-extraction des composés phénoliques antioxydants du marc de café

1. Introduction

Dans ce chapitre, plusieurs aspects de l'extraction solide-liquide des composés phénoliques antioxydants du marc de café ont été étudiés. Ce dernier provient d'une entreprise locale partenaire, Gecco, qui récupère ce biodéchet dans les restaurants et bars de la région Hauts-de-France. Ce marc de café est un mélange de différentes variétés de café (*Arabica* et *Robusta*) ayant subi des extractions (principalement par percolation). Après avoir été stocké pendant 2 à 3 mois, il a été séché avant d'être utilisé pour les études menées dans les Chapitres 1 et 2.

Une pré-étude a porté sur la granulométrie du marc de café et son influence sur l'extraction des polyphénols totaux.

L'objectif principal de ce chapitre est de pouvoir statuer sur l'efficacité des approches alternatives telles que l'extraction assistée par ultrasons pour la récupération des composés phénoliques antioxydants. Tout d'abord, d'un point de vue procédé, deux approches d'extraction ont été comparées, l'extraction assistée par ultrasons (UAE) et l'extraction conventionnelle (CE). Deux plans factoriels ont été utilisés pour étudier l'effet des paramètres opératoires sur les performances des procédés UAE et CE, qui ont été évalués et comparés sur la récupération totale des polyphénols totaux, l'activité antioxydante des extraits obtenus et la consommation d'énergie des équipements.

Après avoir identifié les conditions optimales, les extraits obtenus ont été caractérisés en termes de composition et d'activité biologique. L'utilisation de la chromatographie liquide haute performance (HPLC) nous a permis d'obtenir un aperçu de la composition en composés phénoliques et en caféine. Cependant, comme décrit dans la partie 1.1.2 de l'étude bibliographique, un nombre considérable de composés différents sont présents dans le marc de café et peuvent être co-extraits comme les sucres et les protéines, qui ont aussi été dosés dans les extraits. Pour finir, l'activité biologique des extraits a été étudiée sur 4 souches bactériennes (*Kocuria varians*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli K12* et *Listeria innocua*).

2. Étude préliminaire : impact de la granulométrie du marc de café sur l'extraction des composés phénoliques

Dans le but d'approfondir notre compréhension des phénomènes mis en jeux lors de l'extraction solide-liquide des polyphénols du marc de café, une étude sur la taille des particules a été réalisée. L'étude bibliographique a montré qu'une granulométrie plus fine du marc de café peut permettre une extraction plus efficace des biomolécules, notamment des composés phénoliques (partie 3.2.7). Cette étude préliminaire vise à estimer l'intérêt que pourrait avoir un pré-traitement de broyage dans le cas du marc de café étudié.

2.1. Matériel et méthode

Deux formes de marc ont été étudiées : le marc de Gecco brut et le marc de Gecco broyé (Figure 1). Pour cela, 200 g de chaque marc de café sec ont été introduits dans une colonne de tamis vibrants (Retsch, AS200) pendant 10 min. Les vibrations ont ainsi permis le passage du marc de café à travers les différents tamis, séparant ainsi les particules en fonction de leur taille. Une fois le tamisage terminé, les différentes fractions ont été collectées puis pesées afin d'évaluer la distribution des tailles de particules (Figure 24).

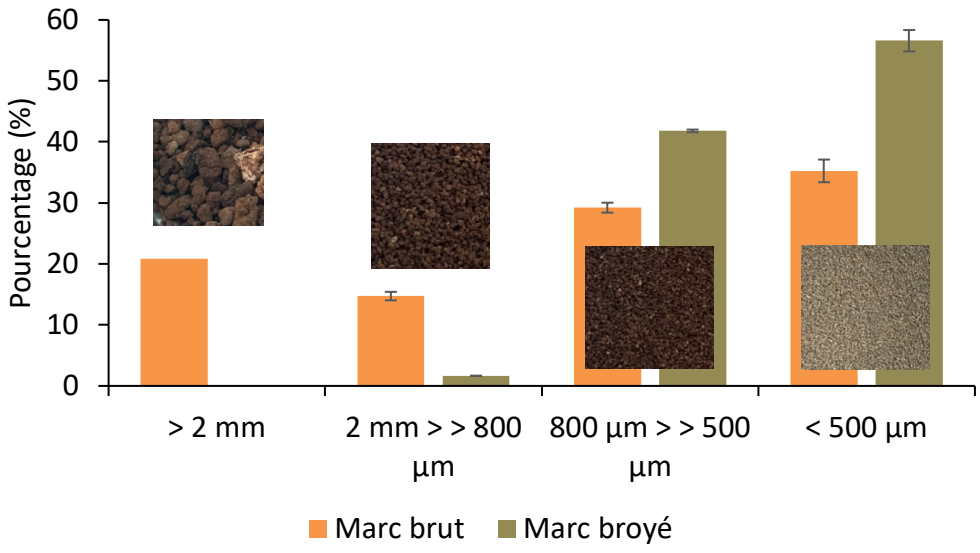

Figure 24. Disparité des tailles de grains en pourcentage des marcs de café brut et broyé

2.2. Résultats de l'étude préliminaire

Les résultats montrent que le marc brut affiche une distribution équilibrée de grains de diverses tailles, avec environ 35% de sa masse sous forme de particules mesurant plus de 800 µm. En revanche, le marc broyé présente une proportion inférieure à 2% de sa masse dans cette plage de taille.

Après une extraction par macération réalisée dans un volume de 50 mL avec un mélange méthanol/eau/acide formique (75 : 23 : 2 ; v/v) sur une durée de 24h à 20°C, avec un ratio liquide-solide de 20 mL/g MS, le marc broyé a permis d'atteindre 12,3 mg GAE/g MS extraits contre 10,8 mg GAE/g MS pour le marc brut. Ceci permet de confirmer qu'un prétraitement permet d'obtenir de meilleurs rendements en favorisant un contact et une diffusion plus importante entre la matrice végétale et le solvant. Ces résultats sont en accord avec la partie 3.2.7 de l'étude bibliographique. En effet, (Pinelo et al., 2007) ont réussi à extraire l'acide chlorogénique (5-CQA) du marc de café à hauteur de 25,5% à partir des particules de 0,25 mm, contre 16,5% pour les particules de 2 mm.

Cependant, l'écart constaté dans notre étude étant de l'ordre des 14%, l'intérêt de rajouter une étape de broyage, n'a pas été choisi pour la suite de l'étude. En effet, dans l'optique de pouvoir réaliser une cascade de valorisation industrialisable, le nombre d'étapes de transformation doit être pris en compte au même titre que la performance et l'impact environnemental avec par exemple la consommation d'eau ou d'électricité.

3. Publication : Comparaison de l'efficacité de l'extraction des polyphénols antioxydants à partir de marc de café en utilisant un équipement d'extraction assistée par ultrasons innovant par rapport à une méthode conventionnelle.

Les résultats de l'étude se présentent sous la forme d'un article de recherche accepté au sein du journal Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, Volume 188, June 2023, 109358

Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method

Maxime Beaudor, Peggy Vauchel, Delphine Pradal, Abdulhadi Aljawish and Vincent Phalip

Keywords
Ultrasound-assisted extraction; polyphenols; spent coffee grounds; optimization; surface response methodology

Abstract
Two extraction approaches were compared, ultrasound-assisted extraction (UAE) and conventional extraction (CE), for the recovery of natural antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds (SCG), which could be used as cosmetics additives or nutritional supplements. Two factorial designs were used to investigate the effect of the varied process parameters on performances of UAE and CE processes, which were evaluated and compared regarding total polyphenols recovery, antioxidant activity of the obtained extracts and energy consumption. Polyphenols recovery was influenced mostly by ethanol content in the solvent, then ultrasound power for UAE and heating temperature for CE. Optimal operating conditions were identified as 400 W ultrasound power, 50% (v/v) ethanol in the solvent and 40 mL/g dm (dry matter) liquid to solid ratio for UAE, and about 50°C heating temperature and 50% (v/v) ethanol in the solvent for CE. Under these optimal conditions for each process, more than 83% and 64% of available polyphenols in SCG were recovered with UAE and CE, respectively. Ultrasound assistance thus allowed about 33% enhancement of polyphenols recovery, while dividing energy consumption by more than 2. Hence, UAE process was demonstrated to be an efficient and sustainable method to recover antioxidant polyphenols from spent coffee grounds.

1. Introduction

The valorization of by-products from the agri-food sector represents a major challenge of our century. Circular economy is one of the ways to limit the impact of human consumption on the environment and thus reduce food and bioresources waste. Food waste recovery is a key part of the circular economy and aims to deplete a by-product, also defined as a biowaste (often treated as waste), using processes with a low energy impact.[1,2] With around 7 million tons generated per year, spent coffee grounds represent

an important source of by-products. Indeed, coffee is widely consumed throughout the world, with an annual consumption estimated at about 10 million of tons by the International Coffee Organization.[3] This biowaste is undervalued, since its applications are limited to direct use as compost, as substrate for the production of edible mushrooms, or as pellets.[4–6] Many by-products, like SCG, are still rich in high value molecules including polyphenols. These biomolecules exhibit antioxidant activities enabling a variety of applications in cosmetics, medicine, pharmacology or agri-food fields.[7] The main polyphenols reported to be present in spent coffee grounds are chlorogenic acid and its derivatives such as caffeoylquinic acid, *p*-coumaroylquinic acid or feruloylquinic acid.[8,9]

In pharmacology, these compounds have been studied for their potential activity against human chronic degenerative diseases, cancer and cardiovascular disease.[10] They can also be used as a chemopreventive agent to treat neurodegenerative disorders.[11] In food industry, natural polyphenols are used to replace synthetic antioxidants such as butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole (BHA), and *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), which have been reported to cause health risks.[12]

To propose sustainable valorization of by-products, extraction of high added value molecules is studied using innovative processes, such as ultrasound-assisted extraction (UAE). These technologies are commonly considered as green processes since good extraction yields were obtained with less residence time and energy consumption. They also permit the reduction of solvent quantities and favour the use of GRAS solvents.[1,13–18]

This work aims to propose a sustainable valorization of polyphenols from SCG using UAE, as it is recognized as an efficient eco-process in several similar applications.[19,20] More specifically, the objective of this work was to compare UAE to a conventional extraction (CE) in order to understand the impact of US assistance and evaluate added value of UAE regarding extraction process performances. The originality of this work lies in comparing UAE and CE processes in optimized operating conditions, which is necessary to perform a relevant comparison. In previous studies published on UAE of polyphenols from SCG[21-23], UAE performances were generally compared to Soxhlet, maceration or even conventional solid-liquid extractions (with heated solvent), but not considered in optimized operating conditions. To date, very few comparative studies of UAE and CE have been conducted using the same raw material. In the study published by Caballero-Galvan and al.[22], UAE was performed at only one fixed US power (750 W) and CE at only one low temperature (25°C). Another recent study published by

Solomakou and al.[23] proposed UAE and CE processes comparison, US power applied were however quite low (about 235 W/L maximum). Then, in these studies, UAE were performed using sonoprobe systems in quite low volumes and/or US power, and above all, energy consumption of processes were not considered in the comparison, while it appears as a key point in the objective of proposing a sustainable process.

In the present study, energy consumption was included in optimization and comparison criteria of UAE and CE, as well as polyphenols recovery, antioxidant activity of the obtained extracts, and solvent temperature. Hence, CE were performed with heated solvent at similar temperatures than those observed with US application, enabling comparison of UAE and CE on the same temperature range. Then, the US equipment used in this study was not a plunging sonoprobe or US bath but a cylindrical contactor with radial external transducers, enabling to work with higher volumes and US power (about 700 mL and 570 W/L, respectively) than in previous published studies.[22,23] This innovative equipment permits to apprehend more easily a potential process scale-up and has already been used to compare the performance of extractions from other sources with CE.[1,24]

It was chosen to carry out optimization of UAE and CE using experimental designs methodology. Indeed, many factors can influence bioactive compounds' recovery efficiency in solid-liquid extraction: type of solvent, liquid to solid ratio, temperature, ultrasound power of UAE, extraction time, particle size.[1,25-27] Experimental design was used to identify the most influential factors and optimal operating conditions, while limiting experimental runs.[28] Preliminary studies were carried out to characterize SCG solid source and to define relevant ranges of variation for some parameters, before performing designs of experiments.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Ethanol was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium carbonate was purchased from Prolabo (Paris, France). The Folin-Ciocalteu's phenol reagent was obtained from EMD Milipore Corporation (Billerica, MA, USA). DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhdrazyl), Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) and potassium persulfate were obtained from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) was purchased from Alfa Aesar (Ward Hill, MA,

USA). All chemicals were analytical grade, with purities greater than 99%, except for ABTS (98%). Aqueous solutions were prepared with distilled water.

2.2. Spent coffee grounds

Spent coffee grounds were provided by a local waste collection company, Gecco (Avelin, France). This company collects a mix of spent coffee grounds (SCG) from restaurants and bars in the North of France. The batch of SCG used for the present work had been stored on Gecco site in open air barrels for approximately 1-6 months. To prevent microbial spoilage during storage at laboratory, SCG were dried in an electric forced-air food dehydrator (Food Dehydrator, Excalibur) at 40°C for 12 hours. Dried SCG were then placed in glass containers and stored in the dark at room temperature until use.

2.3. Extraction procedure

Equipment used to carry out conventional extractions (CE) and ultrasound-assisted extractions (UAE) were schematically presented in Figure 1. All extractions were carried out in batch mode and performed for a duration of 90 min with a stirring at 160 rpm (allowed a sufficient suspension and homogenisation of the solid in the liquid) in solvent volume fixed at 700 mL. All assays started at ambient temperature. 2 mL samples were collected every 5 minutes for the first 30 minutes and then every 30 minutes until the end of the 90 min. The samples were centrifugated for 60 seconds at 8500 g, filtered on a 0.45 µm sterile cellulose nitrate filter and stored at 4°C until analysis. All samples were collected in duplicate for each experiment. For each sampling time, electricity consumption was measured with a power consumption controller (Otio, CC 5000) to which all electrical appliances used for extraction were connected. The temperature was measured with a thermocouple (TCDIRECT, Type K) and a portable data logger (GRAPHTEC, GL800).

Preliminary tests (section 3.1.2.) were performed in 100 mL narrow-necked Erlenmeyer flasks with a working volume of 50 mL. The agitation was set at 150 rpm and maintained with an incubator (INFORST HT, Multitron strandard) for 20 hours at room temperature (RT).

2.3.1. Ultrasound assisted extraction process

For UAE, a 0.9 L innovative stainless-steel pipe with a 22 kHz frequency generator (SINAPTEC, Ultrasonic Lab750) was used. This extraction system uses sonotrodes in

its wall which will spread ultrasonic waves over the whole pipe. The radial ultrasound emission allows an excellent control of the cavitation homogenization. A mechanical stirrer (IKA, RW 20 DZM) and a 3-blade impeller (IKA, R1382) were used for agitation. Ultrasound assistance provoked a progressive increase in temperature. To prevent evaporation and heating issues, an operating limit was set: when 70°C were reached, ultrasounds were stopped until temperature dropped below 68°C, and then were restarted (US in discontinuous mode between 68 and 70°C). The volume of 700 mL allows to have a power of 571 ± 0.4 W/L applied to the extraction volume.

2.3.2. Conventional extraction process

For conventional extraction (CE), a 1 L Pyrex flat-bottomed glass jacketed reactor was used, connected to a thermostatically controlled bath to regulate temperature (Fisherbrand, Isotemp 5150 H7). A mechanical stirrer (IKA, EUROSTAR 60) and a 4-blade impeller (IKA, R1342) were used for stirring. In the same way as UAE, the temperature will not exceed 70°C.

2.4. Analytical measurements

2.4.1. Characterization of SCG

Moisture content of SCG was measured by a moisture analyzer (PRECISA, XM60). Evaluation of the initial phenolics content of SCG was performed according to the procedure described by Zuorro & Lavecchia[29] with some modifications. Briefly, a four-stage extraction procedure was performed.

The extraction was conducted at 70°C in 200 mL magnetically stirred flasks containing 1 g of dry material (dm) and different volumes of 50% (v/v) ethanol in water solvent: 100, 50, 35 and 30 mL were used in the first, second, third and fourth stage, respectively. The contact time was set to 1 h in each stage. At the end of each extraction, the suspension was centrifugated for 10 min at 4800 g and filtered on a 0.45 µm cellulose nitrate filter. The solid phase was recovered for re-extraction and the liquid phase was stored at 4°C until phenolics content and antioxidant activity assays, which were performed according to procedures described in section 2.4.2. The total amount of phenolics and antioxidant activity were determined as the sum of values obtained in the four stages.

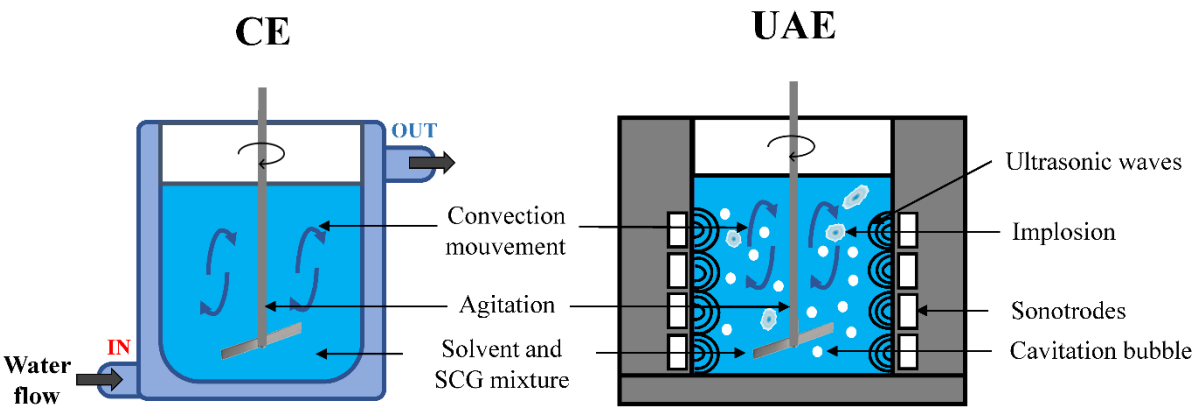

Figure 1. Schematic representation of equipment used for conventional extractions (CE) and ultrasound-assisted extractions (UAE) experiments

2.4.2. Total polyphenols content (TPC) and antioxidant activity (AA) characterization of extracts

TPC and AA characterization of the extracts were performed according to Folin-Ciocalteu and DPPH methods, respectively, using high-throughput microplate procedures. Assays were carried out on a microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Multiskan spectrum) using spectrophotometric detection and flat bottom 96-well microtiter plates.[30]

Folin-Ciocalteu microplate assays were performed according to the procedure described by Boizot & Charpentier[31] with some modifications. Briefly, a 20% (w/v) sodium carbonate solution was prepared. Folin-Ciocalteu's phenol reagent was diluted with water at a ratio of 1:5 (v/v). Aqueous standard solutions of gallic acid (0-400 mg/L) were daily prepared by dilution from a 400 mg/L stock solution. A calibration curve relating to this concentration range of gallic acid was established for each plate (equation: $y = 0,055x + 0,0663$; $R^2 = 0,9996$). 20 µL of extraction sample or gallic acid standard solution, 120 µL of water and 30 µL of Folin-Ciocalteu reagent solution (1:5, v/v) were placed in each well and mixed. After that, 30 µL of 20% (w/v) sodium carbonate solution was added. All experiments were performed in triplicate at 45 ± 1°C. The absorbance at 765 nm of the blue complex formed was read after 8 min which was determined as the optimal time to get the maximal absorbance from the extracts. The reagent blank was set by the addition of 20 µL of water instead of standard solution or sample. The total phenolic content was expressed in gallic acid equivalent (mg of GAE/g dm) using the gallic acid calibration curve.

DPPH microplate assays were performed according to the procedure described by Ng & Owusu-Apenten[32] with some modifications. Briefly, a daily solution of DPPH at 0.04 g/L (optical density about 0.8 ± 0.05 at 515 nm) was prepared in ethanol and placed in the dark until use. Standard solutions of Trolox (0–1000 µM) were daily prepared by dilution with ethanol from a 1000 µM stock solution. A calibration curve relating this concentration range of Trolox was established for each plate (equation: y = -0,0006x + 0,8579; R^2 = 0,9986). 10 µL of extraction sample or Trolox standard solution and 190 µL of DPPH solution were added in each well and mixed. All experiments were performed in triplicate at room temperature (25 ± 1°C). The absorbance at 515 nm of the purple complex formed was read after 6 minutes. The reagent blank was set by the addition of 10 µL of ethanol instead of standard solution or sample. The total antioxidant activity was expressed in Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) (µmol Trolox/g dm) using the Trolox calibration curve.

2.5. Experimental designs

Two different face-centered central composite designs were used, the first for UAE and the second for CE. These two experimental designs include a full factorial design 2^k, where 2^k experiments were required to cover all possible combinations of factor levels.[33,34] For UAE experimental design, 3 factors (k = 3) and 2 levels were defined. Process variables were the ultrasound power (P, W), the liquid to solid ratio (R, mL of solvent/g of dm SCG) and the ethanol content in the solvent (E, %, v/v). For CE experimental design, 2 factors (k = 2) and 2 levels were defined. Process variables were the temperature (T, °C) and the ethanol content in the solvent (E, %, v/v). Liquid to solid ratio was fixed at 40 mL/g dm. Real and coded values of low and high levels for each process variable were given in Table 1 for the UAE design, and in Table 2 for the CE design. Axial points (α) for both experimental designs were fixed to 1. Experimental errors were estimated thanks to central point repetition: 3 times for UAE design and 2 times for CE design. The 17 assays of the UAE design and the 10 assays of the CE design are fully detailed in Tables 3 and 4, respectively (in section 3.2.2.).

For both UAE and CE experimental designs, process responses were total polyphenols content in the extract (TPC, mg GAE/g dm), antioxidant activity of the extract (AA, µmol Trolox/g dm), energy consumption (EC, Wh) and solvent temperature (ST, °C). Modelling and statistical analysis were performed with Design-expert V13 software (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) and SigmaPlot V12 software (Systat Sofware, San

Jose, CA, USA). Each response was modelled using multiple regression according to a second-order polynomial function:

$$Y = b_0 + \Sigma_i b_i X_i + \Sigma_i b_{ii} X_i^2 + \Sigma_{ij} b_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Y is the matrix of the answers, b_0 the constant value, b_i the coefficient effect of the factor X_i, b_{ij} represents the coefficient of interaction between factor X_i and factor X_j, and ε is the experimental error. Coefficients b_0, b_i, b_{ii} and b_{ij} are determined by matrix algebra according to the relation:

$$b = (X^t.X)^{-1}X^t.Y$$

X is the experiment matrix in coded variables and X^t is the transposed experiment matrix. Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the statistical significance of independent variables. If p-value was less than 0.05 then the variables were considered significant.

Table 1. Level values for each process parameter of the UAE experimental design

Real values			Coded values		
US power, P W	Liquid to solid ratio, R mL/g dm	Ethanol content in the solvent, E %, v/v	X_1	X_2	X_3
50	20	0	-1	-1	-1
225	30	25	0	0	0
400	40	50	+1	+1	+1

Table 2. Level values for each process parameter of the CE experimental design

Real values		Coded values	
Temperature, T °C	Ethanol content in the solvent, E %, v/v	X_1	X_2
20	0	-1	-1
45	25	0	0
70	50	+1	+1

Using multilinear regression analysis (MLR), it was possible to perform a multivariate data analysis. Quadratic regression models were chosen so as to keep an adjusted R^2 value of at least 0.9.

3. Results and Discussion

In order to propose a sustainable valorization of polyphenols from SCG, UAE was studied and compared with CE performed with heated solvent at similar temperatures than those observed with UAE, namely up to about 70°C at maximal US power of 400 W for the equipment used in this work.

Preliminary studies were carried out to characterize SCG solid source and to define relevant ranges of variation for some parameters (percentage of ethanol in the solvent and the liquid-solid ratio), before performing UAE and CE experimental designs.

3.1. Preliminary studies

3.1.1. Characterization of spent coffee grounds (SCG)

The initial dry matter content of SCG was 34 ± 0.5% (w/w) and this value reached 96 ± 0.5% (w/w) after the dehydration treatment. Total polyphenols content of SCG was evaluated at 14.1 ± 1.2 mg GAE/g dm (successive extractions were performed to exhaust SCG as described in section 2). This value is in the low range compared to those generally found in other published studies on SCG, which are in the range 17-35 mg GAE/g dm.[29,35,36] This may be due to the storage conditions and duration until receipt and drying, and to the nature of the mix (total polyphenols content varies in function of *Arabica*/*Robusta* ratio in the mix).[37,38] The antioxidant activity of the obtained extract

was evaluated at 51.0 ± 4.2 µmol Trolox/g dm. Few published studies were performed in conditions comparable to this work and obtained values in the range 38-82 µmol Trolox/g dm, which is in accordance with the antioxidant activity obtained in the present work.[39,40]

3.1.2. Pre-studies on two extraction parameters: ethanol content in the solvent (E) and liquid to solid ratio (R)

Many parameters could influence a solid-liquid extraction process efficiency (better final yields and/or faster diffusion of molecules), among which solid characteristics (nature, moisture content, shape, granulometry, etc.), solvent nature, liquid to solid ratio, agitation, temperature, pressure, specific assistance (ultrasounds, microwaves, pulsed electric fields, etc.).

Concerning SCG biowaste, it was chosen to not study particle size influence, and to use it as it was when recovered from the waste collection company. Indeed, in the perspective of a potential large scale sustainable valorization of SCG, avoiding a supplementary pre-treatment appeared suitable. The use of non-toxic solvents was favoured. To extract polyphenols from a plant matrix, a polar solvent such as ethanol, methanol or acetone must be used.[41] Here, ethanol was chosen for its low toxicity. In addition, for a big scale application, ethanol is a bio-solvent that can be generated by the alcoholic fermentation of several sugar or starch containing feedstocks, with recycling possibilities, thus suitable for the development of a sustainable process. Preliminary assays of polyphenols recovery from SCG were performed with different water-ethanol mixtures as solvent, so as to define relevant ranges of variation for the further extraction studies (design of experiments). Results presented in Figure 2A show that polyphenols content in the extract was higher with pure water than with pure ethanol. The highest polyphenols concentration (9.5 mg GAE/g dm, corresponding to about 67% of extractible polyphenols in SCG) was reached for ethanol content in the solvent in the range 40-60% (v/v) (results in this range were not significantly different according to Tukey's test; $p > 0.05$). These results were in accordance with data generally observed in the literature. Ethanol content in water modifies the solubilisation of the polyphenols in the mixture by affecting the polarity and polyphenolic compounds generally have higher affinities with ethanol-water mixtures, than with pure water or pure ethanol.[42]

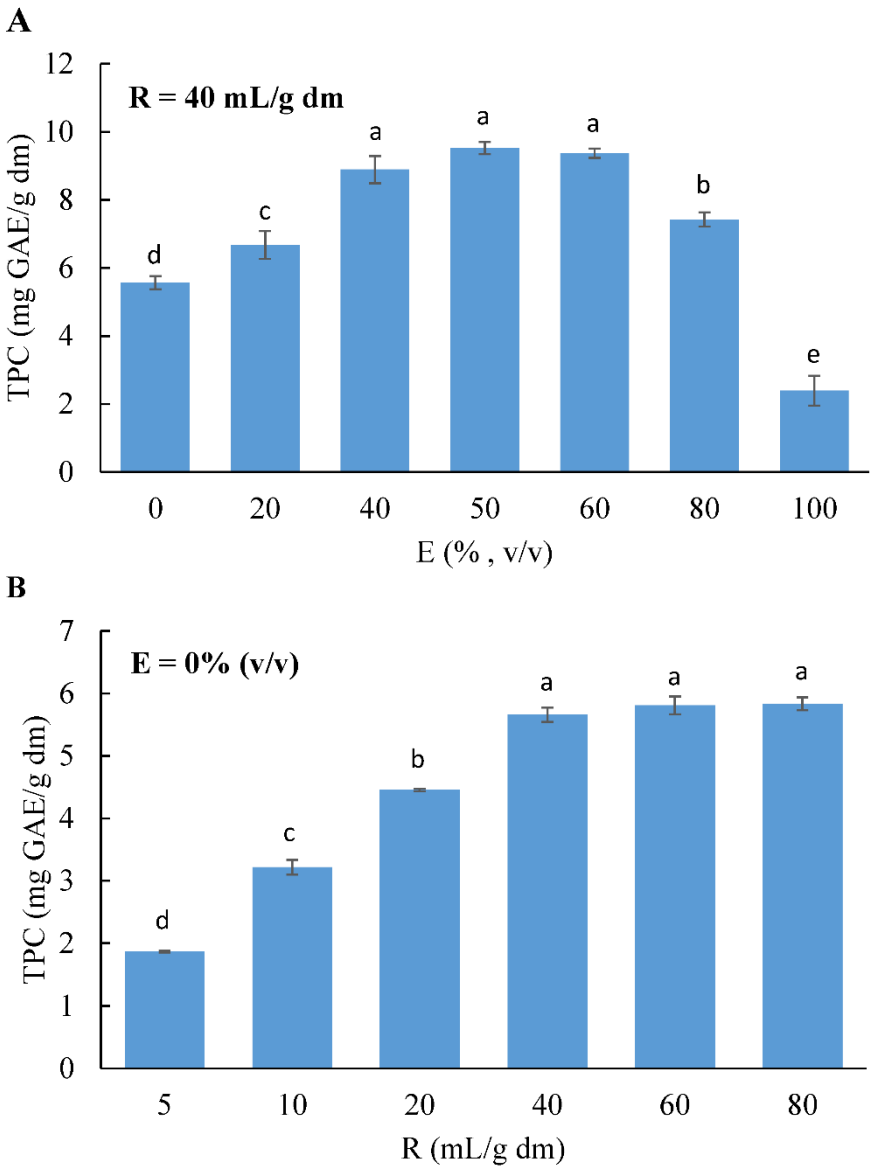

Figure 2. TPC of the extract as a function of ethanol content in the solvent E (A) and liquid to solid ratio R (B). Results lacking a common letter (a-d) are significantly different at the 0.05% level (Tukey's test)

The range 0-50% (v/v) of ethanol content in ethanol-water mixtures was retained for the further studies using design of experiments. This choice allows to see if is possible to obtain good yields while trying to minimize the percentage of ethanol and make the process as green and economic as possible.

Liquid to solid ratio is an important influencing parameter on extraction efficiency. Solvent volume must be sufficient to permit a good suspension of solid phase in the liquid phase and to favour mass transfer, but not excessive to avoid solvent overconsumption and obtaining diluted extracts. Hence, preliminary assays were

performed at different liquid to solid ratios, in the range 5-80 mL of solvent/g dm of SCG (with water as solvent). TPC in the obtained extracts are shown in Figure 2B. Ratios under 20 mL/g dm appeared clearly as too low regarding extraction performance. Maximal TPC of almost 6 mg GAE/g dm was obtained for ratios above 40 mL/g dm (results for 40, 60 and 80 mL/g dm were not significantly different according to Tukey's test; $p > 0.05$). Similar trends were previously observed for studies on polyphenols extraction from SCG with similar liquid to solid ratio range using a polar solvent (methanol-water mixture).[43] In a concern of economic process, it was chosen not to exceed 40 mL/g dm. The retained range of variation for the further studies (design of experiments) was 20-40 mL/g dm.

3.2. Comparison of ultrasound-assisted extraction (UAE) and conventional extraction (CE) for polyphenols recovery from SCG

Process duration is a key point while studying sustainable processes. The objective is to find the right balance to obtain a high extraction yield while controlling energy consumption. To define the most relevant process duration for further UAE and CE experimental designs, it was decided to study extraction kinetics.

3.2.1. Kinetics studies

For kinetics studies, all extractions were carried out during 90 min at fixed liquid to solid ratio of 40 mL/g dm, in order to obtain maximal TPC (as seen in section 3.1.2.). For all other process parameters, assays were performed at extreme conditions of the experimental designs: 0 and 50% (v/v) ethanol content in the solvent for both UAE and CE, 50 and 400 W US power for UAE, 20 and 70°C for CE. The obtained results are presented in Figure 3A for UAE and Figure 3B for CE. It appeared that process duration, presence of ethanol in the solvent, US application (for UAE) and heating (for CE) enabled to enhance polyphenols extraction. Under low conditions (■: 0% (v/v); 50 W for UAE, 20°C for CE), a limit plateau was reached at about 4 mg of GAE/g dm for both UAE and CE. The use of a 50% (v/v) ethanolic solvent enabled to almost double polyphenols recovery, reaching around 8 mg of GAE/g dm for both UAE and CE (■: 50% (v/v), 50 W for UAE, 20°C for CE). In fact, addition of ethanol in the solvent increases the solubility of phenolic compounds significantly, as seen in section 3.1.2. Then applying in addition maximal US power for UAE or maximal heating for CE (○: 50% (v/v), 400 W for UAE, 70°C for CE), enabled to attain the higher TPC yields: about 12.0 mg GAE/g dm for UAE and about 10.3 mg GAE/g dm for CE (at 90 min of

extraction). This corresponded to about 3 and 2,4 times increase compared to low conditions, and to about 85% and 73% of available TPC in the source, respectively for UAE and CE.

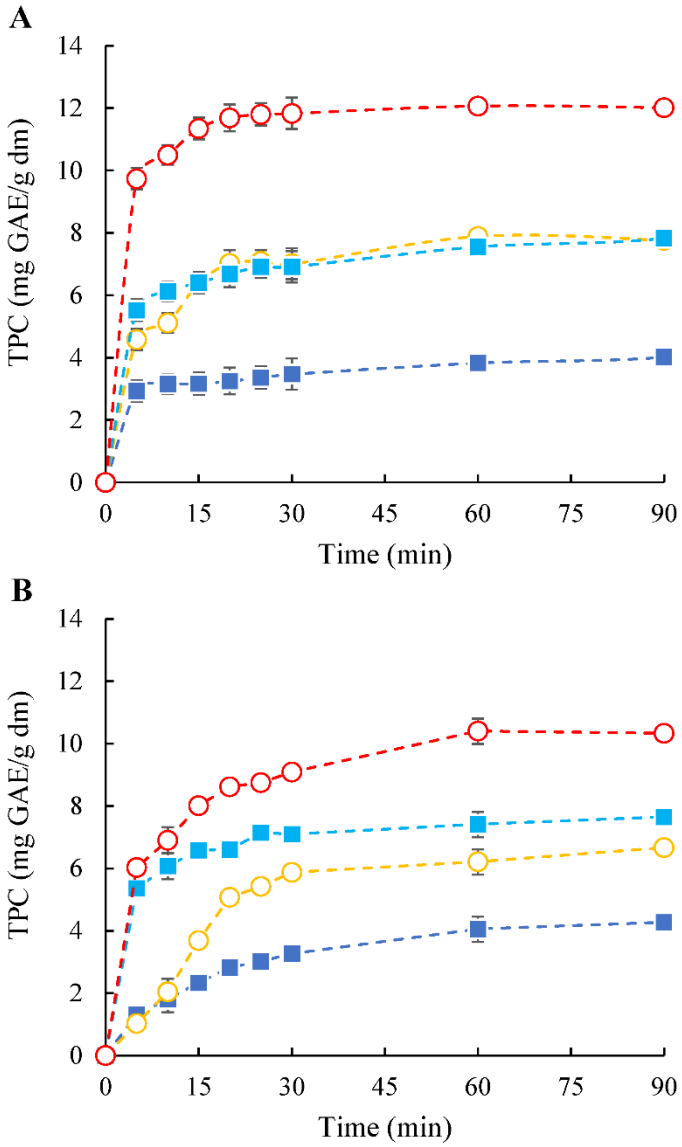

Figure 3. Kinetics of TPC during UAE (A) and CE (B) for different operating conditions. In red circles (○): 50% (v/v), 400 W for UAE, 70°C for CE; in yellow circles (○): 0% (v/v), 400 W for UAE, 70°C for CE; in light blue squares (■): 50% (v/v), 50 W for UAE, 20°C for CE; in dark blue squares (■): 0 vol%, 50 W for UAE, 20°C for CE

Regarding kinetics considerations, maximal TPC (extraction plateau) was generally reached faster with UAE than with CE. High amounts of polyphenols were recovered in the first 5 minutes of extraction in the case of UAE. In high conditions, maximal TPC was reached in about 20-30 min for UAE, whereas it took about 60 min for CE. Indeed,

US application permitted a faster heating of the solvent mixture than for CE. Ultrasounds provoke cavitation phenomena in the medium, namely the formation of bubbles which undergo compression and decompression. The repeated deformation of these bubbles lead to their explosion when the surface tension force can no longer maintain them. This leads to an increasement of the temperature and a degradation of the solid matrix, which can make the wanted extractables more accessible.[18,44,45] The raise of temperature contributes to the diffusion of molecules in the medium by lowering the viscosity and increasing the solubility. A high-power level allows higher and faster temperature raise, but it can lead to degrading part of the extractables in some cases, in particular for thermosensitive molecules.[46] With the experimental conditions used in the present study, no degradation of polyphenols was observed.

About 85% of the maximal TPC yield was reached after 30 min of extraction for all tested conditions, which might correspond to the progressive stagnation of polyphenols diffusion. Recovering the small part of polyphenols remaining in the source, involved a much longer process duration and greater consumption of energy. Moreover, at 30 min of extraction, solvent temperature was stabilized, both for UAE or CE. Hence, it was decided to fix process duration at 30 min for further studies with experimental designs.

3.2.2. Optimization and comparison of UAE and CE

Optimization and comparison studies of UAE and CE for polyphenols recovery from SCG were performed using two designs of experiments as described in section 2.5. The objective was to compare UAE and CE performances in terms of polyphenols recovery, antioxidant activity and energy consumption. Results obtained after modelling and statistical analysis of both experimental designs are presented in Tables 3 and 4 (observed and model response for each assay), Figure 4 (surface responses and 2D graphs) and Table 5 (model coefficients values and ANOVA results). Surface responses and 2D graphs for UAE and CE are presented side by side on Figure 4 to facilitate the comparison between the two processes. Three responses are presented, polyphenols recovery (TPC), energy consumption (EC) and solvent temperature (ST), in function of varied process parameters, at 30 min of extraction. To avoid overloading of the figure with duplicate information, it was chosen not to present antioxidant activity (AA) surface response, as results were very similar to TPC. In fact, a strong concordance between TPC and AA results was observed for all assays of both UAE and CE experimental designs (at 30 min of extraction, determination coefficients R^2 were about 0.74 and 0.80 for experimental and model results, respectively). AA results are however provided in

Tables 3 and 4. All R^2 and adjusted R^2 values were greater or equal to 0.90, and even close to 1 in majority (Table 5), indicating that observed and model results were in good accordance and there was no overestimation of the model due to the number of variables.

Table 3. Responses observed and predicted by the model at 30 min of extraction for the 17 assays of UAE experimental design

Assay n°	*Varied parameters (coded values)*			*TPC mg GAE/g dm*		*AA µmol Trolox/g dm*		*EC Wh*		*ST °C*	
	P	*R*	*E*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*
1	-1	-1	-1	2.81	3.29	2.85	3.38	60	62	32.6	31.8
2	-1	1	-1	3.47	3.34	3.80	1.73	60	57	31.8	30.6
3	1	-1	-1	5.11	4.54	10.24	9.73	180	177	72.9	72.4
4	1	1	-1	7.01	7.39	15.29	16.80	170	172	72.6	72.9
5	-1	-1	1	6.37	6.04	22.17	20.53	60	58	32.5	32.5
6	-1	1	1	6.91	7,54	30.46	30.84	60	63	29.8	30.2
7	1	-1	1	6.94	7.12	22.91	24.86	160	163	70.0	71.1
8	1	1	1	11.83	11.42	44.57	43.90	170	168	70.3	71
9	0	0	0	5.49	6.22	15.84	16.26	150	150	63.2	63.8
10	0	0	0	6.45	6.22	16.45	16.26	150	150	63.9	63.8
11	0	0	0	6.24	6.22	17.51	16.26	150	150	65.1	63.8
12	0	-1	0	5.12	5.35	15.66	15.32	150	150	65.2	65.7
13	0	1	0	8.00	7.53	23.17	24.01	150	150	65.2	65
14	-1	0	0	5.01	4.36	5.01	7.81	60	60	26.2	28.2
15	1	0	0	6.51	6.93	19.81	17.52	170	170	70.5	68.9
16	0	0	-1	5.15	4.99	7.57	8.11	150	152	63.4	65.6
17	0	0	1	8.45	8.37	30.27	30.23	150	148	66.6	64.8
	Std. Dev.			0.15	0.65	0.75	2.08	0	2.93	0.85	1.76

Table 4. Responses observed and predicted by the model at 30 min of extraction for the 10 assays of CE experimental design

Assay n°	*Varied parameters (coded values)*		*TPC mg GAE/g dm*		*AA µmol Trolox/g dm*		*EC Wh*		*ST °C*	
	T	*E*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*
1	-1	-1	3.27	3.35	12.28	14.01	0	0	20.7	20.4
2	-1	1	7.10	7.12	34.98	34.43	0	0	20.5	20.5
3	1	-1	5.87	5.54	20.36	21.96	600	607	67.4	67.6
4	1	1	9.08	8.79	39.69	39.01	630	635	67.5	67.4
5	0	0	7.16	6.73	20.44	22.75	360	365	44.8	45.0
6	0	0	6.92	6.73	22.95	22.75	360	365	44.9	45.0
7	-1	0	5.00	5.00	21.91	20.72	0	0	20.5	20.2
8	1	0	6.35	6.98	27.91	26.98	640	627	67.3	67.3
9	0	-1	4.79	5.13	20.22	16.89	360	353	45.8	45.3
10	0	1	8.41	8.69	34.40	35.62	370	367	45.0	45.2
Std. Dev.			0.17	0.5	1.77	2.58	0	9.9	0.07	0.39

The most predictable responses were the energy consumption and the solvent temperature. Indeed, the main independent variable on which they depend is the ultrasound power for UAE and the water bath temperature for CE. 2D representations for both of these responses were more appropriate. For TPC, R^2 and adjusted R^2 values were lower than for the other answers, but still good enough to provide a good fit of experimental data by the model. Predicted R^2 values, indicate that the model may lack precision on the predictions over the studied domain but the values remain acceptable to conclude on trends.[47]

Experimental design for UAE study was performed at first. Liquid to solid ratio (R) and ethanol content in the solvent (E) were varied in the ranges 20-40 mL/g dm and 0-50% (v/v), respectively, as established in pre-studies (section 3.1.2). US power (P) was varied up to 400 W (maximum power supplied by the US equipment).

Statistical analysis of the data (Table 5) revealed a significant influence of these three independent variables (p-value < 0.05) for TPC response. US power (P) and ethanol content in the solvent (E) were the most significantly influential parameters, as observed on surface responses (Figure 4) and confirmed by model coefficient values and associated p-values ($b_1 = 1.28$, $b_3 = 1.69$, p-values both under 0.001). Liquid to solid ratio (R) influence was significant but less strong ($b_2 = 1.09$, p-value under 0.01). Among interactions and quadratic terms, the only one significantly influent was the interaction between P and R ($b_{12} = 0.69$, p-value of about 0.01).

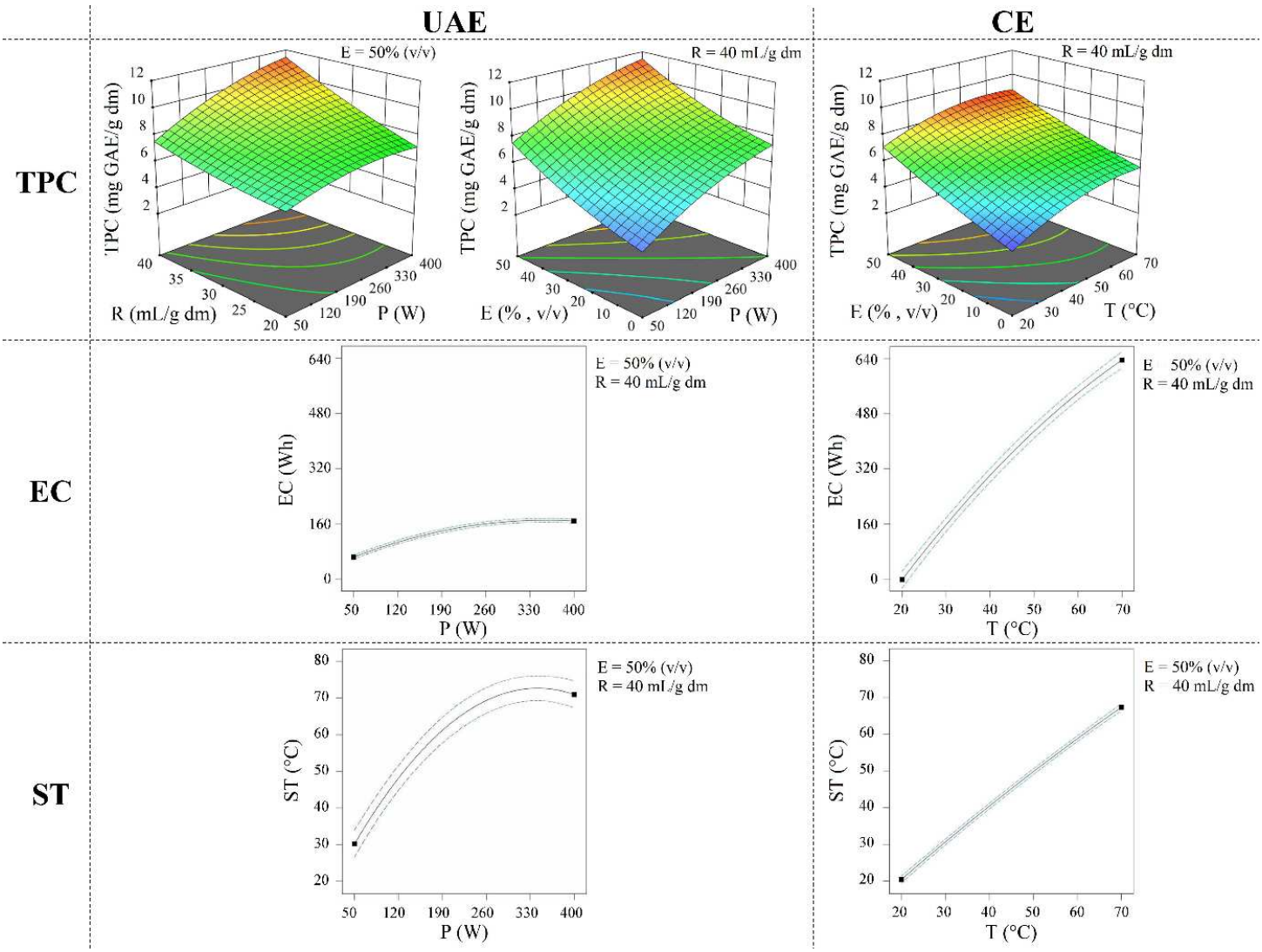

Figure 4. TPC, EC and ST responses for UAE and CE at 30 min of extraction in function of varied process parameters: liquid to solid ratio (R), US power (P) and ethanol content in the solvent (E) for UAE; temperature (T) and ethanol content in the solvent (E) for CE

Observing TPC surface responses for UAE (Figure 4), the effects of P and E parameters were in accordance to those obtained in pre-studies (section 3.2.A): increasing US power and ethanol content in the solvent allowed higher polyphenols recovery, with a factor of up to 3 between low and high conditions. Concerning liquid to solid ratio (R), its effect was more marked at high US power: when rising R from 20 to 40 mL/g dm, TPC recovery was enhanced by a factor of about 1.6 at P = 400 W, whereas it was limited to about 1,2 at P = 50 W. TPC yield was enhanced all along R variation range (no plateau), so that no optimal value under 40 mL/g dm can be found for R.

Table 5. Model coefficients and ANOVA results for both UAE and CE experimental designs

	TPC UAE		TPC CE		EC UAE		EC CE		ST UAE		ST CE	
	value	*p-value*	*value*	*p-value*	*value*	*p-value*	*value*	*p-value*	*value*	*p-value*	*value*	*p-value*
b_0	6.22		6.73		150.00		362.50		64.66		45.01	
b_1	1.28	<0.0010	0.99	<0.0100	55.00	<0.0001	311.67	<0.0001	20.34	<0.0001	23.52	<0.0001
b_2	1.09	<0.0100	1.78	<0.001	0.00	1.0000	6.67	0.1742	-0.35	0.5493	-0.050	0.7681
b_3	1.69	<0.0001	-	-	-2.00	0.0676	-	-	-0.41	0.4851	-	-
b_{12}	0.69	0.0108	-0.15	0.5700	0.00	1.0000	7.50	0.2041	0.44	0.5046	-0.080	0.7188
b_{13}	-0.04	0.8594	-	-	-2.50	0.0464	-	-	-0.39	0.5531	-	-
b_{23}	0.36	0.1582	-	-	2.50	0.0464	-	-	-0.16	0.8014	-	-
b_{11}	-0.57	0,1905	-0.74	0.0890	-35.00	<0.0001	-50.00	<0.0100	-13.74	<0.0001	-1.2800	<0.0100
b_{22}	0.22	0.5842	0.19	0.6030	0.00	1.0000	-5.00	0.4833	1.59	0.1838	0.2514	0.4326
b_{33}	0.46	0.2770	-	-	0.00	1.0000	-	-	1.59	0.2385	-	-
R^2	0.9559		0.9627		0.9983		0.9993		0.9956		0.9998	
Adj. R^2	0.8992		0.9160		0,9961		0.9985		0,9900		0.9996	
Pred. R^2	0.4146		0.7056		0.9643		0.9939		0.9648		0.9983	

Finally, it clearly appeared that optimal conditions to maximize polyphenols recovery with UAE process were maximal values for the three varied parameters: P at 400 W, E at 50% (v/v), and R at 40 mL/g dm. As expected, and confirmed in Figure 4 and Table 5, energy consumption (EC) and solvent temperature (ST) responses strongly depend on applied US power (P) (b_1 and b_{11} coefficients values were predominant). It can be observed on Figure 4 that EC increased with US power until about 300 W, and then stabilized at about 160 Wh while US power kept increasing up to 400 W. This was due to security constraints for the US equipment: temperature should not exceed 70°C to prevent damaging of the US sonotrodes. Hence, once the limit temperature of 70°C was attained, sonication was applied in discontinuous mode. This allowed to maintain solvent temperature at about 70°C and to generate cavitation in the mixture by intermittence until the end of extraction.

Then, the second design of experiment was performed for CE, fixing the upper value of heating temperature at 70°C to get similar temperatures in the solvent than those observed with US application at maximal power of 400 W. For TPC response, statistical analysis of the data (Table 5) revealed a significant influence of the two independent varied parameters (p-values < 0.01), the most influent being temperature (b_2 = 1.78), followed by ethanol content in the solvent (b_1 = 0.99). Interaction and quadratic terms were not significant. For EC and ST responses, only temperature was significantly influent (only b_1 and b_{11} coefficients were highly significant), just as for UAE.

Comparing UAE and CE results, the quick overall observation of 3D and the 2D graphs on Figure 4 indicates that tendencies were similar concerning parameters influence, and

that CE led to less efficient polyphenols recovery and much higher energy consumption compared to UAE, when temperatures exceeded 30°C. Temperature for CE and ultrasonic power for UAE had the same positive effect on TPC (Figure 4), both at low or high ethanol content in the solvent. But for CE, this trend began to stagnate from about 50°C heating temperature even if the solvent temperature continues to increase. This stagnation was not found for UAE: even if the maximum solvent temperature of about 70°C was already reached at a power of about 300 W, TPC kept on increasing until 400 W. So, it appeared that even if the temperature is a key parameter, when using ultrasound, other mechanisms such as cavitation bubbles explosions can lead to an improvement of the extraction.[48-50] The cavitation phenomena may have allowed the disintegration of the SCG agglomerates, allowing the increase of the solid-solvent contact surface and therefore the accessibility to polyphenols.[51]

For extractions carried out at low temperature for CE (20°C) and low US power for UAE (50 W), the two studied processes showed similar efficiencies regarding polyphenols recovery (whatever ethanol content in the solvent in the range 0-50%, v/v). Low level for US power was 50 W, which implied a slight solvent temperature raise to about 30°C (at 30 minutes of extraction). This did not significantly make a difference on polyphenols recovery compared to CE performed at 20°C. This implied however a difference on energy consumption between the two processes: about 60 Wh for UAE at 50 W, against 0 Wh for CE at 20°C. For extractions carried out at high temperature for CE (70°C) and high US power for UAE (400 W), polyphenols recovery results were different: UAE allowed to recover about 1.3 times more polyphenols than CE (whatever the ethanol content in the solvent in the range 0-50%, v/v). Then, a huge difference was observed in terms of energy consumption: about 170 Wh for UAE at 400 W, against about 640 Wh for CE at 70°C, corresponding to a 3.7 factor difference between the processes. Energy consumption and solvent temperature increased over the whole heating temperature range for CE, whereas they stagnated over about 300 W of US power for UAE. In fact, the 70°C were attained more rapidly for UAE than CE, and then US were applied in discontinuous mode as explained above (just to maintain 70°C), which enabled to limit energy consumption at the end of the extraction. Benefits of UAE in terms of energy savings were previously reported in few articles on other types of biosources.[1,49]

Finally, comparing UAE and CE results, ethanol content in the solvent was the most influencing parameter on polyphenols recovery whether for UAE or CE, followed by US power for UAE or heating temperature for CE. Liquid to solid ratio parameter was included in UAE study to possibly detect an optimal value under 40 mL/g dm, but it

appeared that best polyphenols recoveries required a 40 mL/g dm ratio. For CE, gains in polyphenols recovery were quite limited beyond 50°C of heating temperature, so it appeared not useful to heat at 70°C, which would generate useless energy consumption. Hence, optimal operating conditions for CE in the studied domain were 50% (v/v) ethanol content in the solvent and about 50°C heating temperature (for R = 40 mL/g dm), enabling to recover almost 9 mg GAE/g dm TPC (about 64% of extractable polyphenols), consuming about 360 Wh of energy.

For UAE, maximal polyphenols recovery of almost 12 mg GAE/g dm was attained (about 85% of extractable polyphenols) with 50% (v/v) ethanol content in the solvent, US power at 400 W and liquid to solid ratio at 40 mL/g dm, requiring about 170 Wh energy consumption. Hence, the use of ultrasounds allowed about 33% enhancement of polyphenols recovery and more than 50% energy savings compared to optimal conventional extraction in the studied domain. This might be explained by US technology advantages regarding heating of extraction mixture efficiency (compared to conventional extraction equipment with double jacket and water bath), and cavitation phenomena provoking destructuration of solid matter and thus facilitating access to extractables.[44,45]

4. Conclusions

Ultrasound-assisted extraction was demonstrated to be an efficient method to recover polyphenols from spent coffee grounds compared to conventional extraction process, both in terms of extraction yield and energy consumption. Preliminary studies and experimental designs enabled to define to most influential parameters and the optimal operating conditions for ultrasound-assisted extraction (UAE) and conventional extraction (CE) processes. Polyphenols recovery efficiency was influenced mostly by ethanol content in the solvent (polarity of the solvent), then US power in the case of UAE and heating temperature in the case of CE. Comparing UAE and CE, each one at optimized operating conditions in the studied domain, US application allowed about 33% enhancement of polyphenols recovery and more than 50% energy savings. Benefits of ultrasounds application might be explained by efficient heating of the medium (compared to CE) and cavitation phenomena facilitating access to polyphenols in spent coffee grounds (degradation of the solid matrix). These biowastes are widely available and their use is still too little promoted with solutions on an industrial scale. Produced extracts exhibited antioxidant activity that could be of interest for application in cosmetic, food and pharmaceutical areas. Large scale production of antioxidant extracts

using UAE technology however implies dealing with scaling-up issues that might arise with US technology. Then, even after extraction of polyphenols, spent coffee grounds remain rich in many other compounds such as sugars, which could also be valorized in the framework of a biorefinery approach.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thanks GECCO company for the kind providing of spent coffee grounds. This work was financed by French Region Hauts-de-France, I-SITE ULNE program and GECCO company.

References

1 D. Pradal, P. Vauchel, S. Decossin, P. Dhulster and K. Dimitrov, *Ultrason. Sonochem.*, 2016, **32**, 137–146.
2 B. Renaud, in Le Déméter 2019, IRIS éditions, 2019, pp. 277–296.
3 International Coffee Organization - Coffee market report September 2022 (2021/22), https://www.ico.org/Market-Report-21-22-e.asp, (accessed October 10, 2022).
4 K. Liu and G. W. Price, Bioresour. Technol., 2011, 102, 7966–7974.
5 M. Mansour, J. M. Savoie, L. Chavant and R. Lebsir, Sci Technol Dev, 2013, 2, 102–116.
6 M. Jeguirim, B. Khiari and L. Limousy, in Char and Carbon Materials Derived from Biomass, Elsevier, 2019, pp. 1–38.
7 I. Mourtzinos and A. Goula, in Polyphenols in Plants, Elsevier, 2019, pp. 23–44.
8 A. Farah and C. M. Donangelo, Braz. J. Plant Physiol., 2006, 18, 23–36.
9 S. Angeloni, F. K. Nzekoue, L. Navarini, G. Sagratini, E. Torregiani, S. Vittori and G. Caprioli, J. Mass Spectrom., DOI:10.1002/jms.4519.
10 A. Scalbert, C. Manach, C. Morand, C. Rémésy and L. Jiménez, Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 2005, 45, 287–306.
11 C.-H. Jeong, H. R. Jeong, G. N. Choi, D.-O. Kim, U. Lee and H. J. Heo, Chin. Med., 2011, 6, 25.
12 A. M. Samarin, H. Poorazarang, N. Hematyar and A. Elhamirad, World Appl. Sci. J., 2012, 18, 191–195.
13 C. P. Passos and M. A. Coimbra, Carbohydr. Polym., 2013, 94, 626–633.
14 M. V. P. Rocha, L. J. B. L. de Matos, L. P. de Lima, P. M. da S. Figueiredo, I. L. Lucena, F. A. N. Fernandes and L. R. B. Gonçalves, Bioresour. Technol., 2014, 167, 343–348.

15 A. Michail, P. Sigala, S. Grigorakis and D. P. Makris, Chem. Eng. Commun., 2016, 203, 407–413.
16 M. Pettinato, A. A. Casazza, P. F. Ferrari, D. Palombo and P. Perego, Food Bioprod. Process., 2019, 114, 31–42.
17 A. Vandeponseele, M. Draye, C. Piot and G. Chatel, Green Chem., 2020, 22, 8544–8571.
18 K. Dimitrov, D. Pradal, P. Vauchel, A.-S. Fabiano-Tixier and F. Chemat, in Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes, eds. M. E. Pintado, J. M. A. Saraiva and E. M. da C. Alexandre, Academic Press, 2022, pp. 201–223.
19 G. Chatel, Ultrason. Sonochem., 2018, 40, 117–122.
20 C. S. Dzah, Y. Duan, H. Zhang, C. Wen, J. Zhang, G. Chen and H. Ma, Food Biosci., 2020, 35, 100547.
21 N. A. Al-Dhabi, K. Ponmurugan and P. Maran Jeganathan, Ultrason. Sonochem., 2017, 34, 206–213.
22 A. S. Caballero-Galván, D. L. Restrepo-Serna, M. Ortiz-Sánchez and C. A. Cardona-Alzate, Waste Biomass Valorization, 2018, 9, 2381–2389.
23 N. Solomakou, A. Loukri, P. Tsafrakidou, A.-M. Michaelidou, I. Mourtzinos and A. M. Goula, Sustain. Chem. Pharm., 2022, 25, 100592.
24 R. A. Carciochi, V. Dieu, P. Vauchel, D. Pradal and K. Dimitrov, Food Bioprod. Process., 2021, 127, 266–275.
25 M. Virot, V. Tomao, C. Le Bourvellec, C. M. C. G. Renard and F. Chemat, Ultrason. Sonochem., 2010, 17, 1066–1074.
26 D. Pingret, A.-S. Fabiano-Tixier, C. L. Bourvellec, C. M. G. C. Renard and F. Chemat, J. Food Eng., 2012, 111, 73–81.
27 S. R. Shirsath, S. S. Sable, S. G. Gaikwad, S. H. Sonawane, D. R. Saini and P. R. Gogate, Ultrason. Sonochem., 2017, 38, 437–445.
28 M. Bigan and B. Mutel, Appl. Surf. Sci., 2018, 453, 423–435.
29 A. Zuorro and R. Lavecchia, J. Clean. Prod., 2012, 34, 49–56.
30 G. Granados-Guzman, R. Salazar-Aranda, M. Garza-Tapia, R. Castro-Rios and N. Waksman de Torres, Curr. Anal. Chem., 2017, 13, 499–507.
31 N. Boizot and J.-P. Charpentier, 2006, 79–82.
32 H. Y. Ng and R. Owusu-Apenten, , DOI:10.13140/RG.2.1.4298.1922.
33 J. Goupy, Rev. Modul.
34 T. Rakić, I. Kasagić-Vujanović, M. Jovanović, B. Jančić-Stojanović and D. Ivanović, Anal. Lett., 2014, 47, 1334–1347.
35 A. Panusa, A. Zuorro, R. Lavecchia, G. Marrosu and R. Petrucci, J. Agric. Food Chem., 2013, 61, 4162–4168.
36 T. Conde and S. I. Mussatto, Prep. Biochem. Biotechnol., 2016, 46, 406–409.
37 I. Hečimović, A. Belščak-Cvitanović, D. Horžić and D. Komes, Food Chem., 2011, 129, 991–1000.
38 M. Deng, Y. Deng, L. Dong, Y. Ma, L. Liu, F. Huang, Z. Wei, Y. Zhang, M. Zhang and R. Zhang, Molecules, 2018, 23, 2276.

39 F. Acevedo, M. Rubilar, E. Scheuermann, B. Cancino, E. Uquiche, M. Garcés, K. Inostroza and C. Shene, J Biobased Mater Bioenergy, 2013, 9.

40 J. Bravo, C. Monente, I. Juániz, M. P. De Peña and C. Cid, Food Res. Int., 2013, 50, 610–616.

41 P. S. Murthy and M. M. Naidu, Food Bioprocess Technol., 2012, 5, 897–903.

42 M. Naczk and F. Shahidi, J. Pharm. Biomed. Anal., 2006, 41, 1523–1542.

43 S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins and J. A. Teixeira, Sep. Purif. Technol., 2011, 83, 173–179.

44 F. Chemat, Zill-e-Huma and M. K. Khan, Ultrason. Sonochem., 2011, 18, 813–835.

45 F. Chemat, N. Rombaut, A.-G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.-S. Fabiano-Tixier and M. Abert-Vian, Ultrason. Sonochem., 2017, 34, 540–560.

46 A. Antony and M. Farid, Appl. Sci., 2022, 12, 2107.

47 L. Wu, L. Li, S. Chen, L. Wang and X. Lin, Sep. Purif. Technol., 2020, 247, 117014.

48 A. Ali, X. Y. Lim, C. H. Chong, S. H. Mah and B. L. Chua, LWT, 2018, 89, 681–688.

49 Y. Picó, TrAC Trends Anal. Chem., 2013, 43, 84–99.

50 K. Vilkhu, R. Mawson, L. Simons and D. Bates, Innov. Food Sci. Emerg. Technol., 2008, 9, 161–169.

51 I. Savic Gajic, I. Savic, I. Boskov, S. Žerajić, I. Markovic and D. Gajic, Antioxidants, 2019, 8, 248.

4. Annexes : études complémentaires sur l'activité antioxydante des extraits

4.1. Étude de l'activité antioxydante

Des analyses complémentaires ont été effectuées sur les extraits obtenus en utilisant la méthode d'extraction assistée par ultrasons. L'objectif étant de pouvoir confirmer avec l'utilisation de deux autres tests d'activité antioxydante les tendances observées pour l'extraction des polyphénols totaux dans les gammes de variations des trois paramètres étudiés dans l'article de ce chapitre. Pour rappel les trois paramètres étudiés sont, le ratio liquide-solide, la puissance des ultrasons et le pourcentage d'éthanol dans le solvant. Les deux tests ayant été comparés sont le test au DPPH et à l'ABTS. Ces deux dosages de l'activité antioxydantes sont les plus faciles à mettre en place quand un nombre considérable d'échantillons est à traiter et leur reproductibilité est supérieure par rapport aux autres tests (ORAC, FRAP, SOD) décrits succinctement dans la partie 1.2.2.7 de la bibliographie (Dudonné et al., 2009). Dans un deuxième temps, il sera possible de statuer sur l'utilisation préférentielle d'un test par rapport à un autre dans le cadre des extractions à partir du marc de café.

4.1.1. Matériel et méthode

Les dosages en microplaques avec l'ABTS ont été réalisés selon la procédure décrite par (Noury, 2016) avec quelques modifications. En résumé, une solution quotidienne d'ABTS (densité optique d'environ 0,7 ± 0,05 à 734 nm) a été préparée en mélangeant 7 mM d'ABTS et 2,45 mM de persulfate de potassium dans 10 mL d'eau. La solution mère a ensuite été diluée dans un rapport de 1:9 (v/v) avec 90 mL d'eau et a été incubée pendant au moins 12 heures à l'abri de la lumière. Des solutions standards de Trolox (0-1000 µM) ont été préparées quotidiennement par dilution dans de l'éthanol à partir d'une solution mère de 1000 µM. Une courbe d'étalonnage reliant cette plage de concentrations de Trolox a été établie pour chaque plaque. L'équation de la courbe d'étalonnage était : $y = -0,0007x + 0,7319$; $R^2 = 0,9940$.

Dans chaque puit, 10 µL d'échantillon d'extraction ou de solution standard de Trolox et 190 µL de solution d'ABTS ont été ajoutés puis mélangés. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat à température ambiante (25 ± 1°C) à l'abri de la lumière. La densité

optique du complexe violet formé a été lue à 734 nm après 5 minutes. Le blanc a été défini en ajoutant 10 µL d'éthanol au lieu de solution standard ou d'échantillon. L'activité antioxydante totale a été exprimée en équivalent de capacité antioxydante de Trolox (TEAC) (µmol de Trolox/g de matière sèche) en utilisant la courbe d'étalonnage de Trolox.

4.1.2. Résultats sur la comparaison des dosages

Il a été mis en évidence une relation plus étroite entre l'activité antioxydante due aux composés phénoliques du marc, mesurée par la méthode ABTS, et la quantité totale de polyphénols mesurée à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu (R^2 = 0,8875), plutôt que celle mesurée par la méthode DPPH (R^2 = 0,8414) (Figure 25). De plus, la gamme couverte par le dosage à l'ABTS est plus importante que celle au DPPH, offrant hypothétiquement une meilleure précision sur les valeurs obtenues.

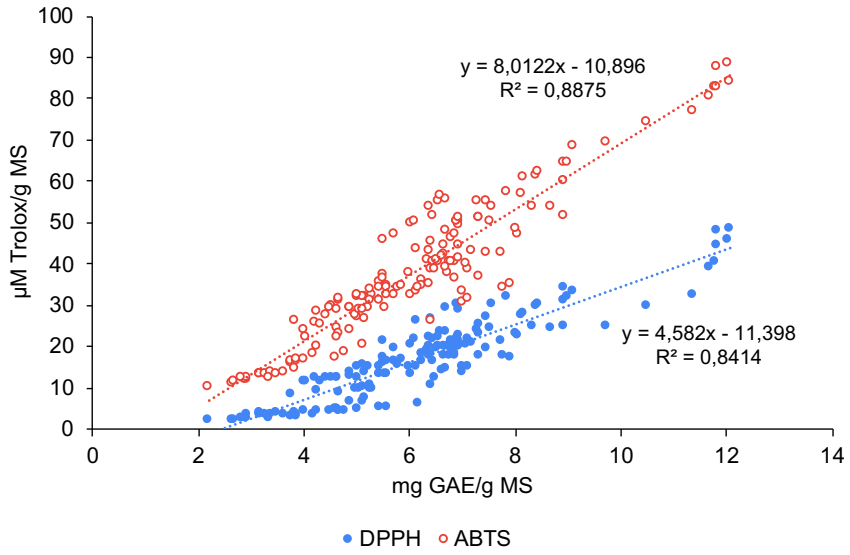

Figure 25. Corrélation entre les polyphénols totaux des extraits obtenus après extraction UAE et leur capacité antioxydante mesurée par la méthode DPPH et ABTS (n = 306)

Concernant le marc de café, différentes études ont pu montrer qu'en fonction des composés présents (comme l'acide caféique par exemple), il est possible d'influencer une différence de valeur entre les deux dosages en ayant comme antioxydants de références le Trolox (C. Andrade et al., 2022; Nenadis & Tsimidou, 2010; Shang et al., 2017). Une étude a démontré que le dosage ABTS a été « meilleur » par rapport au dosage DPPH lorsqu'il est

appliqué à une variété d'aliments d'origine végétale contenant des composés antioxydants hydrophiles, lipophiles et hautement pigmentés comme le marc de café (Floegel et al., 2011).

Pour les échantillons obtenus lors des extractions assistées par ultrasons à 30 minutes de l'article de ce chapitre, une analyse par méthodologie des surfaces réponses a été appliquée à partir des résultats du dosage de l'activité antioxydante par l'ABTS (AA ABTS) (Tableau 9 et 10).

Tableau 9. Activité antioxydante observée et prédite par le modèle à 30 minutes d'extraction pour les 17 essais du plan expérimental menée sur l'UAE

Assay n°	*Paramètre (valeur codée)*			*AA ABTS µmol Trolox/g dm*	
	P	*R*	*E*	*observée*	*prédite*
1	-1	-1	-1	12,49	9,13
2	-1	1	-1	13,47	19,03
3	1	-1	-1	29,11	24,06
4	1	1	-1	33,23	33,97
5	-1	-1	1	53,86	46,25
6	-1	1	1	50,35	56,15
7	1	-1	1	51,25	61,18
8	1	1	1	82,67	71,09
9	0	0	0	36,50	40,11
10	0	0	0	40,47	40,11
11	0	0	0	34,89	40,11
12	0	-1	0	32,19	35,16
13	0	1	0	48,70	45,06
14	-1	0	0	32,52	32,64
15	1	0	0	41,08	47,57
16	0	0	-1	26,64	21,55
17	0	0	1	62,41	58,67
	Std. Dev.			2,87	5,48

NB : Std. Dev. = écart-type

Tableau 10. Résultats de l'ANOVA pour le plan expérimental mené sur l'UAE

	AA ABTS UAE	
	Valeur	*p-value*
b_0	38,73	
b_1	7,47	0,0035
b_2	4,95	0,0245
b_3	18,56	< 0,0001
b_{12}	4,76	0,0438
b_{13}	-0,8336	0,6801
b_{23}	2,85	0,1851
b_{11}	-3,01	0,3991
b_{22}	0,6364	0,8547
b_{33}	4,72	0,2019
R^2	0,9560	
Adj. R^2	0,8995	
Pred. R^2	0,2653	

NB : Adj. R^2 = R^2 ajusté ; Pred.R^2 = R^2 prédit

Pour l'AA ABTS, les valeurs de R^2 et de R^2 ajusté indiquent un bon ajustement du modèle aux données expérimentales. Les valeurs de R^2 prédites indiquent que le modèle peut manquer de précision dans les prédictions sur le domaine étudié, mais les valeurs restent acceptables pour conclure sur les tendances. L'analyse statistique des données (Tableau 10) a révélé une influence significative des trois variables indépendantes (*p-value* < 0,05) pour la réponse AA ABTS. La teneur en éthanol dans le solvant (E) est le paramètre le plus influent de manière significative, comme observé sur les surfaces réponses (Figure 26) et confirmé par la valeur du coefficient du modèle et la valeur p associée (b_3 = 18,56, *p*-value inférieur à 0,001). L'influence de la puissance des ultrasons (P) ainsi que du rapport liquide-solide (R) sont significatives mais beaucoup moins importantes (b_1 = 7,47 et b_2 = 4,95, *p-values* < 0,05). Parmi les termes d'interactions et les termes quadratiques, le seul significativement influent est l'interaction entre P et R (b_{12} = 4,76, *p-value* < 0,05).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus pour le test DPPH. La concordance entre les résultats obtenus avec les tests DPPH et ABTS, ainsi qu'avec les concentrations en polyphénols totaux (test de Folin-Ciocalteu), sont observables sur la Figure 26. En effet, les surfaces réponses mettent en évidence une forte similarité dans les tendances des modélisations sur des plages de variations similaires. Ces correspondances (qui se

caractérisent par des surfaces réponses quasi superposables) se manifestent de manière significative entre le dosage des TPC et l'activité antioxydante mesurée avec l'ABTS. On observe également des similitudes notables avec le dosage réalisé au DPPH. Ces corrélations ont déjà été observées à plusieurs reprises sur différentes sources de composés phénoliques (Dudonné et al., 2009; Samaniego Sánchez et al., 2007; Thaipong et al., 2006).

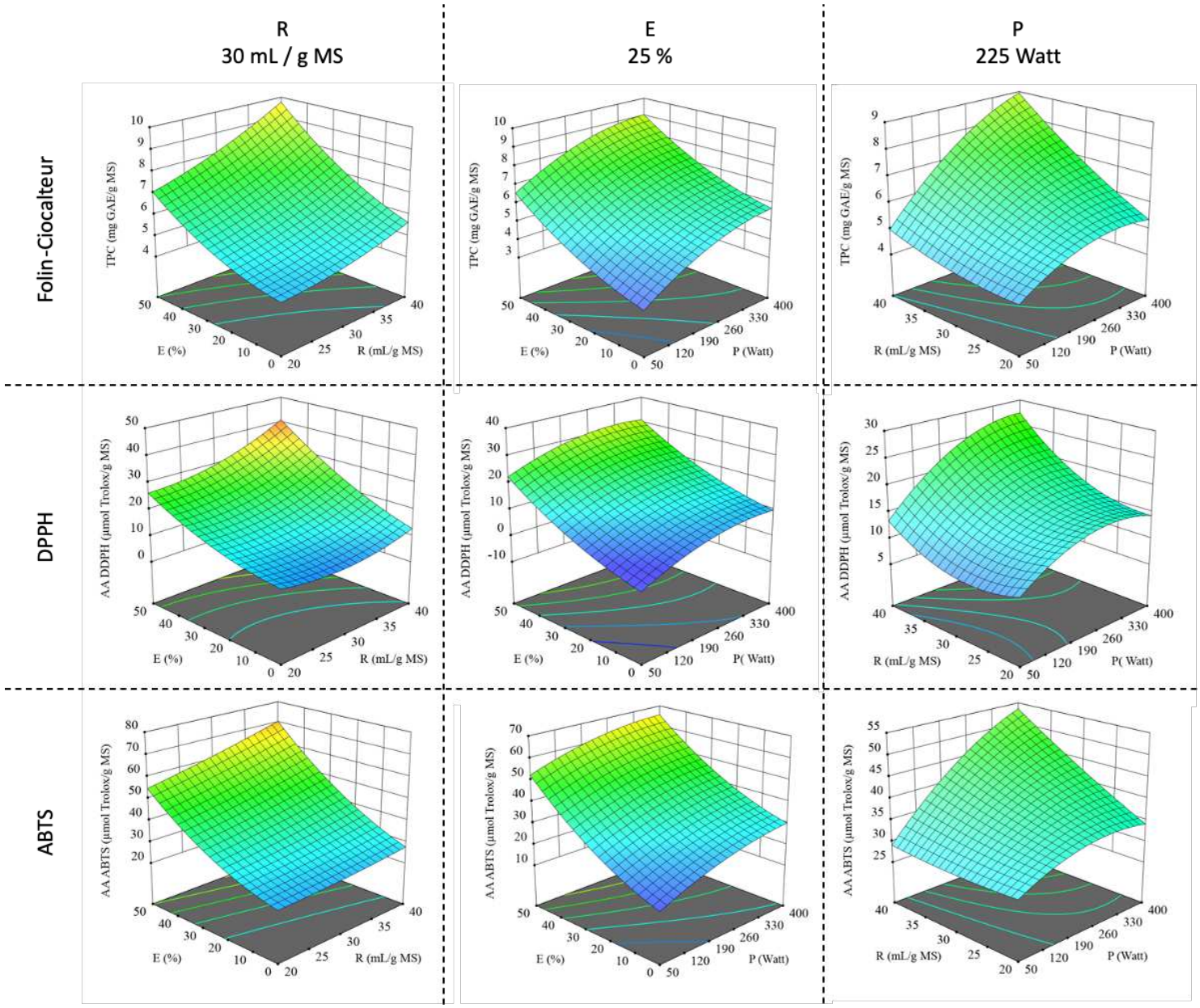

Figure 26. Surfaces réponses des différents dosages réalisés après extraction assistée par ultrasons à 30 minutes. R = ratio liquide-solide, E = % éthanol dans l'eau, P = puissance des ultrasons

En analysant globalement les résultats des trois dosages, on constate que la puissance a un effet très important lorsque le ratio liquide-solide est élevé, mais cela n'est pas le cas pour des ratios faibles. De manière analogue, le ratio liquide-solide aura une influence plus prononcée lorsque les valeurs de puissance seront plus élevées.

En ce qui concerne l'éthanol, une augmentation de sa présence dans le solvant entraîne une augmentation de l'activité antioxydante (pour les deux dosages) ainsi que des TPC dans l'extrait. Cette variation reste constante, que ce soit pour des ratios liquide-solide élevés ou faibles, ou pour différentes puissances appliquées dans la plage étudiée.
On remarque également une différence significative dans les valeurs de TEAC obtenues avec les deux dosages ABTS et DPPH. Cette différence peut être du simple au double, alors que la gamme de Trolox utilisée comme standard est identique. Des résultats similaires ont déjà été observés sur des extractions de composés phénoliques du marc de café par (Bravo et al., 2013) avec 140,3 µmol Trolox/g et 82,4 µmol Trolox/g respectivement pour l'ABTS et le DPPH.

Les résultats obtenus à partir du dosage de l'activité antioxydante par l'ABTS soutiennent les conditions optimales d'extraction déjà énoncées dans l'article de de chapitre concernant les polyphénols totaux extraits.

5. Complément d'étude : évaluation de l'extrait obtenu après optimisation

L'extraction assistée par ultrasons ayant permis d'extraire significativement plus de polyphénols que l'extraction conventionnelle, la suite de l'étude des extraits obtenus a été menée sur ces derniers. De manière plus précise il n'a été retenu que l'évaluation de l'extrait produit en conditions optimisées en UAE (solvant 50% éthanol dans eau, ratio liquide-solide de 40 mL/g MS et une puissance des ultrasons de 400 W). Ces études concernent le dosage de la caféine ainsi que des tests de bioactivités.

5.1. La composition en caféine des extraits

Une première analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur l'extrait obtenu par extraction assistée par ultrasons dans des conditions optimales, a permis d'identifier et de quantifier la caféine résiduelle du marc. En effet, la caféine est l'un des

composés majoritaires pouvant être co-extrait lors d'une extraction éthanolique (S. Angeloni et al., 2020). Cette dernière est incorporée dans de nombreux produits alimentaires du quotidien comme les sodas et les boissons énergisantes (McCusker et al., 2006) ou encore dans l'industrie cosmétique en tant qu'ingrédient actif de certaines crèmes amincissantes (Byun et al., 2015).

5.1.1. Matériels et méthodes

Les dosages chromatographiques ont été réalisés à l'aide d'un système Ultimate 3000RS équipé d'une pompe LPG-3400RS, d'un échantillonneur automatique WPS-3000TRS et d'un détecteur à diode DAD-3000RS (Thermo Fisher Scientific). La séparation chromatographique a été réalisée sur une colonne Uptisphere Strategy PHC4 (3 µm, 150 × 3 mm, Interchim) à 45°C avec 0,1% (v/v) d'acide formique dans l'acétonitrile (B) et 0,1% (v/v) d'acide formique dans l'eau (A) en tant que phases mobiles à un débit de 1 $mL.min^{-1}$. L'élution par gradient s'est déroulée comme suit : isocratique à 2% de B pendant 1 minute ; linéaire de 2% à 32% de B en 23 minutes ; linéaire de 32% à 85% de B en 1 minute ; isocratique à 85% de B pendant 2 minutes ; linéaire de 85% à 2% de B en 1 minute ; et isocratique à 2% de B pendant 4 minutes. Le volume d'injection était de 5 µL. La détection a été effectuée entre 200 et 400 nm, avec une longueur d'onde spécifique réglée à 273 nm pour la caféine. Un étalon de caféine (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour la quantification. La courbe d'étalonnage a été établie sur une plage de 0,5 à 200 mg/L.

5.1.2. Résultats

Les extraits obtenus après l'application des ultrasons contiennent de la caféine avec une concentration extraite de 4,7 mg/g (Tableau 11). Cette valeur est supérieure à celle rapportée par (S. Angeloni et al., 2020), qui ont employés une assistance par ultrasons mais à température ambiante, avec d'autres solvants (mélanges eau-méthanol) et des temps de 120 minutes. Malgré cette différence, la concentration obtenue semble cohérente. En effet, d'autres études menées sur des extractions conventionnelles (C. Andrade et al., 2022; Głowacka et al., 2019) permettent de mettre en évidence que les valeurs obtenues sont variables (entre 1,9 et 13,19 mg/g) (Tableau 3). Ces variations peuvent s'expliquer en fonction de la provenance du café, de la manière dont le café a été extrait ou encore du degré de torréfaction du café.

Tableau 11. Comparaison de la caféine résiduelle extraite (valeur en mg/g MS)

Source	Type d'extraction	Type ou origine	Caféine
Thèse	UAE	Extrait filtré	4,74
(C. Andrade et al., 2022)	CE	Guatemala	3,92
		Brasil	1,94
		Éthiopie	1,99
(Głowacka et al., 2019)	CE	Colombie light drip	2,94
		Nicaragua light drip	6,23
		Nicaragua dark drip	6,48
		Nicaragua dark filtred	13,19
(S. Angeloni et al., 2020)	UAE	Mix 100% *Arabica*	1,27

NB : UAE = extraction assistée par ultrasons, CE = extraction conventionnelle

5.2. L'activité antimicrobienne des extraits

Afin de compléter la caractérisation des extraits et d'évaluer leur activité, des tests antimicrobiens ont été conduits sur diverses souches. En effet, les polyphénols présents dans le marc de café ont déjà été reconnus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Bajko et al., 2016; Manso et al., 2021) mettant en évidence leur potentiel d'application dans divers secteurs industriels, tels que l'agroalimentaire ou la santé.

Les tests antimicrobiens ont été menés sur différentes souches bactériennes, en utilisant les extraits obtenus après extraction assistée par ultrasons (UAE) selon les conditions optimales décrites section 2 de ce chapitre (puissance de 400 watts, teneur en éthanol de 50%, et rapport liquide-solide de 1/40).

5.2.1. Matériels et méthodes

Lors de cette étude quatre souches que l'on retrouve communément dans les études de bioactivité à partir de composés phénoliques ont été sélectionnées : *Kocuria varians* (pathogène), *Listeria monocytogenes* (pathogène), *Escherichia coli K12* et *Listeria innocua* (Tableau 12). Pour chacune d'entre elle, une pré-culture liquide est initiée dans un milieu approprié pour favoriser sa croissance sur une période de 24 heures (toutes les souches testées ont été cultivées dans un milieu Muller Hinton). Des géloses du même milieu ont été coulées afin de pouvoir y étaler la solution de pré-culture. Des puits ont ensuite été formés

afin de pouvoir y déposer 70 µL d'extraits phénoliques obtenus. Un temps de repos de 1h à 4°C a permis la diffusion des extraits sans évaporation des extraits. L'incubation a été menée sur 48h avec une vérification à 24h dans une étuve à 37°C. Les conditions aérobies et/ou anaérobies ont été respectées en fonction des souches étudiées. Le témoin positif consiste en une solution de chloramphénicol à 100 mg/L tandis que le témoin négatif correspond au solvant de solubilisation des extraits secs.

Tableau 12. Différentes souches testées pour les tests antimicrobiens

Souches	Gram	Conditions
Kocuria varians	Gram +	Aérobie
Listeria monocytogenes	Gram +	Aéro-anaérobie facultative
Escherichia coli K12	Gram -	Aéro-anaerobie facultative
Listeria innocua	Gram +	Anaérobie facultative

Les extraits ont été filtrés sur une membrane (polyéthersulfone) PES à 0,45 µm afin de les rendre stériles. Ces derniers contiennent une proportion importante d'éthanol aux propriétés cytotoxiques, ce qui a nécessité une évaporation et une solubilisation dans un solvant bioactivement neutre. Un volume de 15 mL de ces extraits a été concentrés à l'aide d'un évaporateur centrifuge (concentrateurs centrifuges miVac, Gene Vac, Ipswich, UK) pendant 3 h à 30°C. Les extraits séchés ont ensuite été solubilisés dans une solution aqueuse de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10%. Le choix du solvant de solubilisation s'est effectué à l'aide d'une étude préliminaire sur la solubilisation des composés phénoliques (Figure 27). Pour cela, les solvants suivants ont été testés : de l'eau déminéralisée, de l'éthanol (5 et 10%) et du DMSO (2, 5 et 10%). Il en est ressorti que le DMSO à 10% permettait une meilleure solubilisation des TPC (71,9%) avec un écart significatif par rapport aux autres solvants testés. L'étude de la solubilisation des extraits secs dans des solvants contenant une concentration plus élevée de DMSO ou d'éthanol n'a pas été effectuée en raison de la cytotoxicité que pourraient avoir ces solutions envers les souches cibles. Dans la littérature, l'utilisation d'une solution aqueuse de DMSO, pour la solubilisation d'extraits phénoliques séchés obtenus à partir de marc de café dans le but de pratiquer des tests d'activités antimicrobiennes a déjà été réalisée par (Díaz-Hernández et al., 2022).

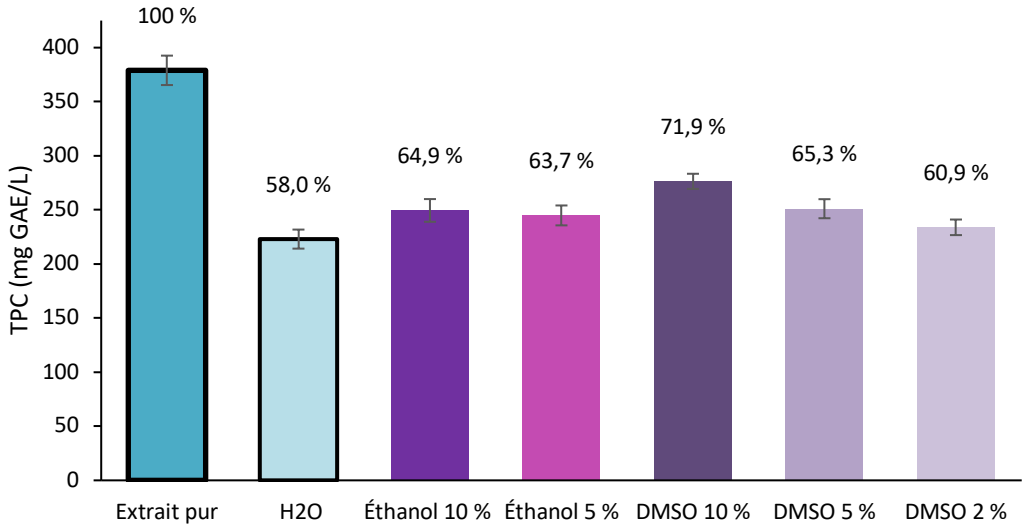

Figure 27. Récupération des polyphénols totaux après solubilisation des résidus séchés dans différents solvants

5.2.2. Résultats et discussion

Les concentrations en polyphénols totaux des extraits concentrés sont données dans le Tableau 13.

Tableau 13. Concentration des extraits après filtration et solubilisation dans le solvant

Extraits concentrés	TPC (mg GAE/L)
Brut	379,18 ± 13,6
x1	276,4 ± 7,0
x2	573,98 ± 8,8
x3	860,98 ± 7,2
x6	1721,95 ± 9,9

NB : x = coefficient de concentration

Les tests concernant l'activité antimicrobienne ne se sont pas révélés être concluants sur les souches étudiées avec les extraits plus ou moins concentrés (Figure 28).

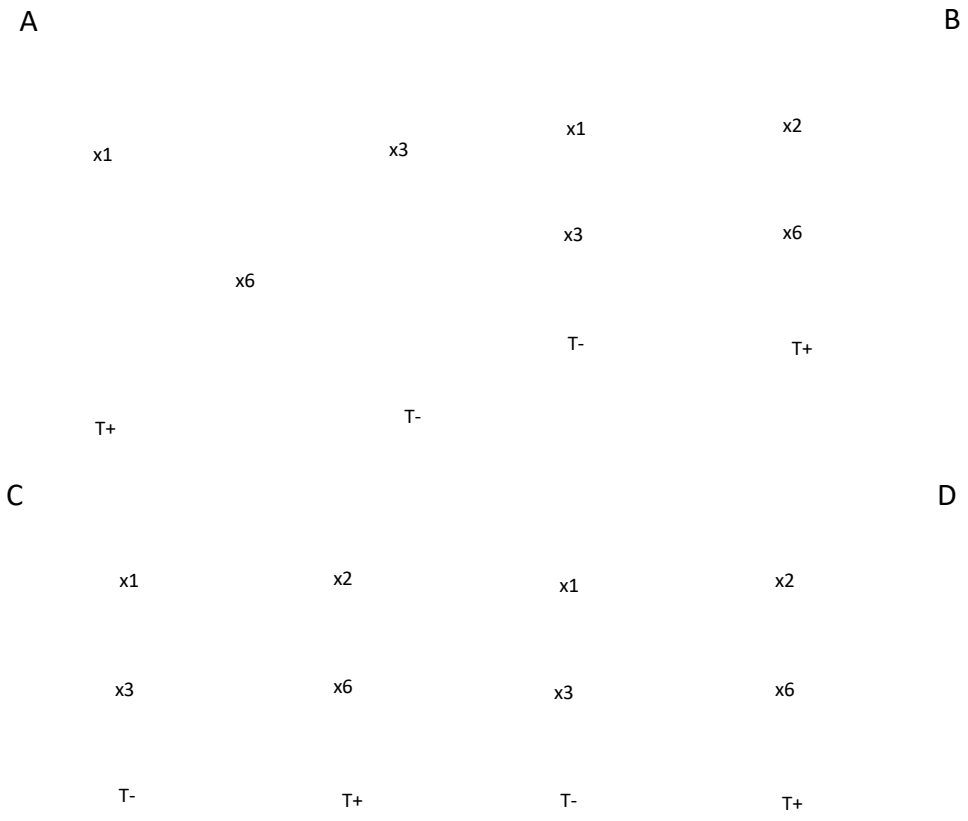

Figure 28. Tests antimicrobiens à différentes concentrations ;
A : *L .monocytogenes* ; B : *K .varians* ; C : *E .coli* ; D : *L .innocua*

En effet, aucun halo d'inhibition n'a été observé sur les géloses hormis autour des témoins positifs (T+). Une concentration en extraits multipliée par 6 n'a pas donné de résultats probants. On remarque néanmoins que la diffusion des composants colorés bruns du marc a eu lieu, ce qui indique bien que les extraits ont pénétré la gélose.

Dans la littérature, les extractions brutes des composés phénoliques du marc de café ont déjà été rapportées comme inhibitrice de certaines souches bactériennes (García-Roldán et al., 2023). Cependant, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits éthanoliques de marc de café envers B. cereus, B. subtilis et E. coli sont respectivement

supérieures ou approximativement égales à 1,5 g GAE/L, 1,5 g GAE/L et 3 g GAE/L. Une autre étude propose de « booster » l'activité en utilisant la fermentation solide de *B. Clausii* sur le marc pour obtenir des extraits plus actifs. Cependant, là aussi, les concentrations inhibitrices minimales semblent élevées (30 mg GAE/mL pour *L. monocytogenes*) (Rochín-Medina et al., 2018). Il est donc assez compliqué de pouvoir obtenir des résultats visibles d'activités antimicrobiennes à partir d'extraits bruts en ayant des rapports d'extraction de 1 g/40 mL de solvant. L'une des options afin d'évaluer les extraits obtenus après extraction aux ultrasons pourrait être l'optimisation de la méthode de séchage (lyophilisation) (Monente et al., 2015), en concentrant plus les extraits et en élargissant la gamme de souches cibles.

6. Conclusion

Ce chapitre a permis d'évaluer et d'optimiser les conditions d'extraction de deux procédés pour la récupération des composés phénoliques du marc de café fourni par l'entreprise Gecco.

Les conditions de fonctionnement optimales ont été identifiées comme étant une puissance d'ultrasons de 400 W, une teneur en éthanol de 50% (v/v) dans le solvant et un rapport liquide-solide de 40 mL/g de matière sèche pour l'extraction assistée par ultrasons. Pour l'extraction conventionnelle, une température d'environ 50°C, une teneur en éthanol de 50% (v/v) dans le solvant et un rapport liquide-solide de 40 mL/g de matière sèche se sont avérés être le plus efficace. En appliquant ces conditions optimales pour chaque procédé, plus de 83% et 64% des polyphénols disponibles dans le SCG ont été récupérés avec l'UAE et la CE, respectivement. L'assistance par ultrasons a ainsi permis d'augmenter la récupération des polyphénols d'environ 33%, tout en divisant la consommation d'énergie par plus de deux.

Dans un second temps, une caractérisation partielle des extraits obtenus dans les conditions optimales d'extraction assistée par ultrasons a été menée. À l'aide de dosages colorimétriques, la composition des extraits en sucres (20%) et protéines (3,2%) a pu être déterminée. Puis, grâce à la chromatographie liquide haute performance (HPLC), il a été possible d'obtenir la concentration d'un composé résiduel majeur du marc de café, la caféine qui a été extraite à hauteur de 4,7 mg/g. Des tests d'activités antimicrobiennes vis-à-vis de quatre souches pathogènes (*L .monocytogenes*, *K .varians*, *E .coli*, *L .innocua*) n'ont pas permis

de conclure sur un effet des extraits avec les concentrations employées (au maximum 1,7 g GAE/L).

Le marc de café épuisé en ces différents composés n'en reste pas moins une matière encore riche en fibres et protéines non extractibles qui composent sa structure. La récupération de la fraction solide, soumise précédemment à l'extraction assistée par ultrasons, peut ainsi être mise à profit dans une deuxième étape de valorisation : la fermentation solide, abordée dans le chapitre 2. En effet, la déstructuration par l'application d'ultrasons sur le marc permet d'obtenir un substrat propice à une colonisation fongique par la réduction des particules de ce dernier (Pandey, 2002) (Figure 29). On observe une réduction significative d'environ 50% des grosses particules (> 2 mm), qui laisse place à une augmentation de 45% des particules plus fines (< 500 µm).

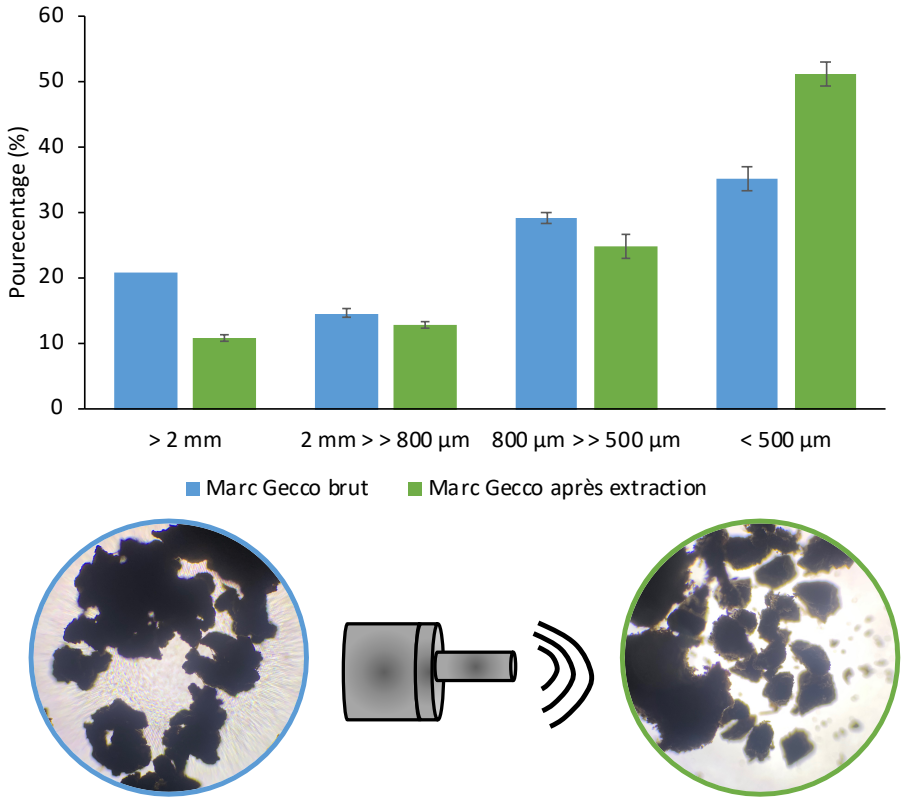

Figure 29. Répartition de la taille des grains avant et après UAE. Observation au microscope (x200)

Chapitre 2 : La fermentation solide sur marc de café appauvri issu de l'extraction de polyphénols pour la production d'enzymes

1. Introduction

Après une extraction optimisée par assistance ultrasons des composés phénoliques du marc de café fourni par la société Gecco, nous avons procédé à un séchage en vue de sa conservation jusqu'à son utilisation prochaine. Dans le but de valoriser les composés non-extractibles du marc, nous avons ensuite mis en place une fermentation solide, visant à produire un cocktail enzymatique à usage industriel. Cette séquence de deux procédés complémentaires permet d'exploiter de manière optimale le coproduit du café.

Beaucoup de champignons peuvent naturellement coloniser des substrats humides comme le marc de café. Ce dernier est un candidat de choix pour une fermentation solide en vue de la production d'un grand nombre d'enzymes, car il est très riche en fibres, protéines et autres composants. Ces composants peuvent induire la synthèse d'enzymes qui permettent aux champignons d'utiliser ces composés.

Ici, le premier objectif a été de tirer parti de la présence naturelle de ces champignons sur le marc de café humide. Pour ce faire, nous avons effectué des isolements microbiologiques par dilution et repiquage. Ensuite, une identification des souches fongiques colonisatrices a été réalisée grâce au séquençage des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) et à une analyse bio-informatique.

Toutes les souches de champignons ainsi identifiées ont ensuite été soumises à un criblage pour la production de diverses enzymes par fermentation solide, utilisant le marc de café appauvri et en particulier appauvri en polyphénols. L'objectif était de sélectionner une souche capable de maximiser l'utilisation des ressources du marc, en vue d'obtenir par extraction, un cocktail complet et riche en activités (hémi)cellulolytiques, lipolytiques et protéolytiques.

Avec la souche choisie (*Penicillium solitum*), une optimisation a ensuite été réalisée à l'aide de deux plans factoriels en vue de produire et extraire de manière efficiente une préparation enzymatique avec une activité maximale de lipase et d'hémicellulase à partir du marc de café dépourvu de polyphénols. Cette approche permet d'obtenir par le biais d'une modélisation, l'influence de divers paramètres à étudier pour obtenir des rendements de production maximaux. En fermentation solide, de nombreux paramètres peuvent influencer la croissance

d'un champignon, la production et l'extraction d'enzymes (Duchiron & Legin-Copinet, 2019; Marín et al., 2019). Les paramètres d'extraction examinés dans ce chapitre ont été le ratio liquide-solide et le temps d'extraction. Une fois ces conditions optimales définies, notre attention s'est portée sur les paramètres de la culture, notamment l'humidité du substrat, la durée de fermentation, et la taille de l'inoculum. La caractérisation des extraits obtenus après toutes ces étapes de sélection et d'optimisation a permis d'identifier le plus exhaustivement possible les protéines, et plus particulièrement les enzymes, produites dans les conditions optimales déterminées.

2. Isolement et identification des champignons du marc de café

Un grand nombre de champignons ont la capacité de coloniser des substrats humides, le marc de café, bien que n'étant pas un habitat naturel en est un. Ce dernier abrite plusieurs souches provenant de son environnement de stockage ou de l'environnement de transformation des grains de café. L'isolement et l'identification de ces champignons permettent par la suite la sélection pour la fermentation solide d'un micro-organisme en capacité de croître facilement sur ce substrat.

2.1. Matériel et méthode pour l'isolement des champignons

Un marc humide fourni par la société Gecco a été utilisé afin d'effectuer des prélèvements en surface et dans plusieurs couches plus en profondeur. De l'eau distillée stérile a ensuite été ajoutée au prélèvement dans un ratio liquide-solide de 3 mL/g de marc humide. Un mélange manuel par inversion a ensuite été réalisé afin d'obtenir un extrait contenant un maximum de micro-organismes. Une dilution de ces extraits et leur étalement sur des boîtes de milieu à base d'agar de pomme de terre, de dextrose (PDA : potato dextrose agar) et d'ampicilline (100 µg/mL) avant incubation à 25°C a permis d'obtenir des cultures de champignons qui ont ensuite été repiquées jusqu'à isolement.

Au total, 44 champignons ont été isolés et sélectionnés pour identification. Le phénotypage à 7 jours de croissance a permis de mettre en avant une prépondérance de *Penicillium*, *Fusarium* et *Trichoderma* (Figure 30). Les spores ont aussi servi à une première

identification, notamment pour *Fusarium* avec des spores en forme de fuseaux. Les différents champignons ont ensuite été replacés sur un marc humide à 50% (p/v) pendant 7 jours par ensemencement de mycélium pour confirmer leur croissance sur le marc (Figure 30).

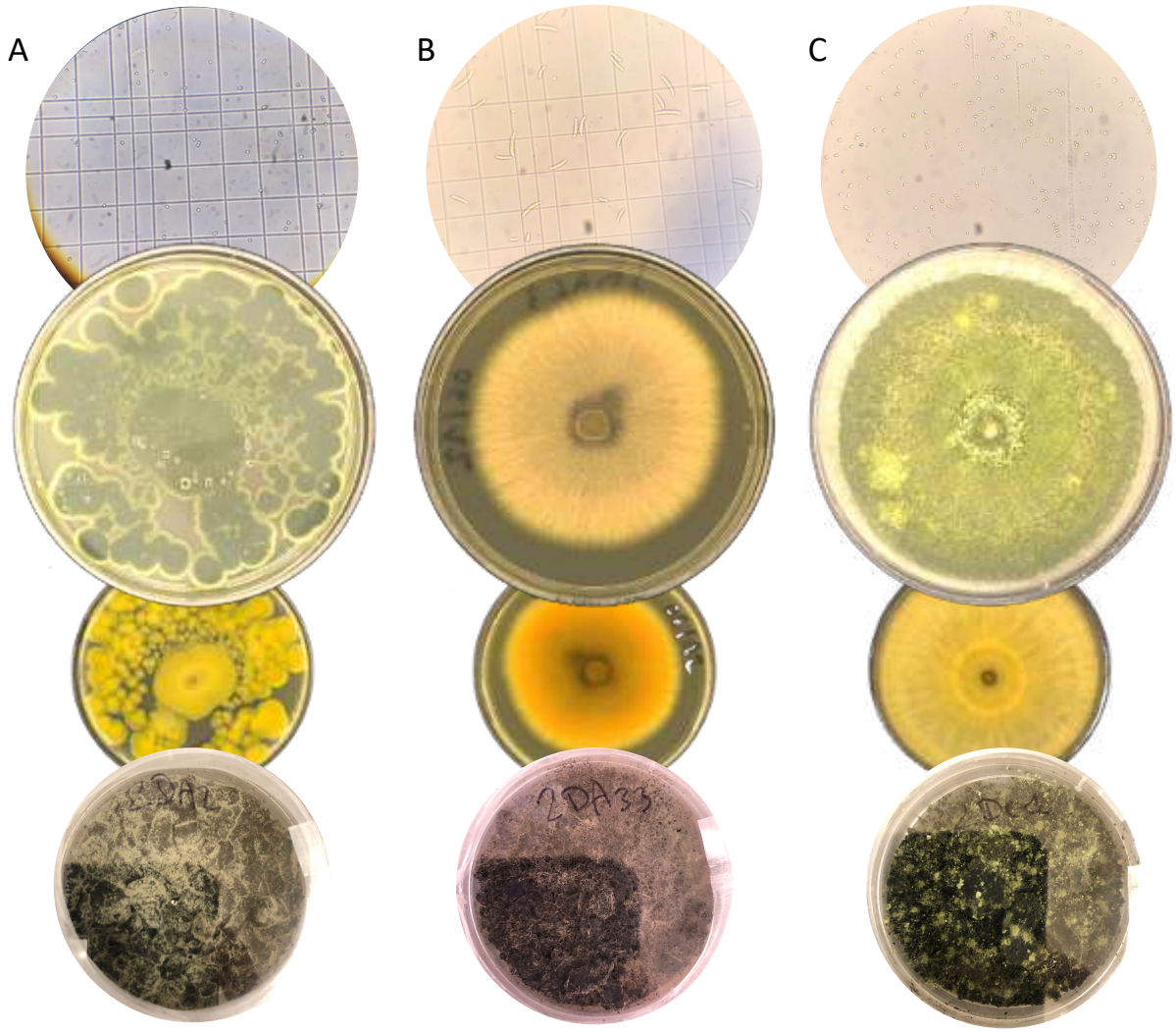

Figure 30. Exemples de champignons isolés sur PDA (de face et de dos), sur marc de café après 7 jours de croissance. Observation de leurs spores respectives au microscope (grossissement x1000). A : *Penicillium* sp., B : *Fusarium* sp., C : *Trichoderma* sp.

2.2. Identification des souches fongiques

Les identifications des souches fongiques ont été effectuées en amplifiant les séquences ITS grâce aux oligonucléotides ITS1 et ITS4 (Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990) après l'extraction d'ADN à l'aide d'un kit (Machery-Nagel, NucleoSpin Soil).

2.2.1. Extraction de l'ADN

Pour obtenir du mycélium, une culture des champignons a été réalisée en milieu liquide PDB (Potato Dextrose Broth) pendant 7 jours dans des Erlenmeyers, à une température de 25°C et avec une agitation à 120 rpm (Inforst HT, Multitron). Le mycélium a ensuite été filtré sur tissu Miracloth (Millipore) stérile avant d'être broyé. Entre 250 et 500 mg d'échantillon ont été ajoutés au tube contenant des billes de céramique d'un diamètre de 0,6 à 0,8 mm. Ensuite, une solution de lyse a été ajoutée et les cellules ont été lysées à l'aide d'un vortex horizontal pendant 5 minutes à température ambiante, garantissant une dispersion homogène. Après la lyse, une étape de précipitation des contaminants a été entreprise. Le lysat clarifié a été filtré à travers une colonne d'élimination des inhibiteurs NucleoSpin® permettant d'obtenir un échantillon purifié. Des étapes de lavage de la membrane de silice ont été soigneusement exécutées pour éliminer toutes impuretés restantes liées à l'éclatement des cellules fongiques lors de l'extraction d'ADN. Après les étapes de lavage, la membrane de silice a été séchée par centrifugation. Enfin, l'ADN a été élué en utilisant une solution à 5 mM de Tris/HCl à pH 8,5 en suivant une centrifugation à 11 000 x *g* pendant une minute à température ambiante.

Des mesures réalisées au spectrophotomètre UV-Vis (Thermo Scientific™, NanoDrop Lite Spectrophotometer) nous ont permis de déterminer la concentration en acides nucléiques (à 260 nm) et d'évaluer la pureté en utilisant le rapport 260/280 (les protéines montrant un maximum d'absorption à 280 nm).

Les concentrations en ADN obtenus sont comprises entre 11,4 et 141,7 ng/µL.

2.2.2. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Par la suite, un volume de 20 µL contenant 1 µL l'ADN du champignon isolé, 1µL de chaque amorce, 10 µL de 2x Phusion Master Mix (ADN polymérase Phusion, nucléotides, tampon de réaction optimisé avec $MgCl_2$) et 7 µL d'eau ultra pure a été soumis à une amplification PCR

(Applied Biosystems™, SimpliAmp™ Thermal Cycler). Les amorces utilisées étaient ITS1 [5' TCC-GTA-GGT-GAA-CCT-GCG-C 3'] et ITS4 [5' TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC 3'] (Eurogentec) et d'une polymérase Phusion™ High-Fidelity (New England BioLabs, Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with HF Buffer).

Les conditions de PCR ont été : une phase de 1 minute 98°C puis 35 fois une phase de dénaturation (15 secondes à 98°C), une phase hybridation (30 secondes à 60°C), une phase d'élongation (30 secondes à 72°C) et en fin de PCR une phase d'une minute à 72°C (Figure 31).

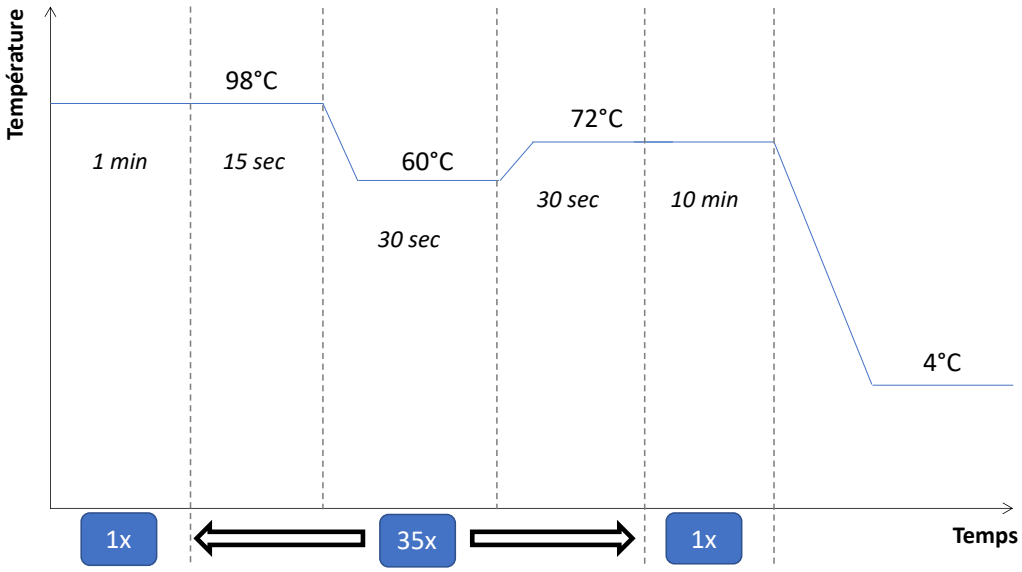

Figure 31. Cycles PCR pour l'amplification de la région ITS1 - ITS4

2.2.3. Électrophorèse

Des gels d'agarose pour les produits PCR ont été réalisés en utilisant l'électrophorèse pour confirmer l'amplification des séquences cibles. Les produits de la PCR ont été soumis à une analyse par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (p/v) sous une tension de 100V pendant une durée de 2 heures. Le gel est coloré en utilisant le colorant GelRed™ de Biotium, ajouté à raison de 5 µL pour chaque 100 mL de gel. Le marqueur de taille moléculaire *O'Gene Ruler DNA Ladder* de Thermo-Fisher est utilisé comme référence de taille. Un volume de 5 µL d'amplicons mélangés avec 2 µL de bleu de charge (Thermo-Fisher, 6xDNA loading dye).

L'observation du gel est réalisée sous une lumière ultraviolette à l'aide de l'appareil Gel Doc™ de Bio-Rad. Les gels ont permis de vérifier la taille des produits de PCR, avec une taille attendue de l'ordre de 600 paires de bases (pb) (Figure 32).

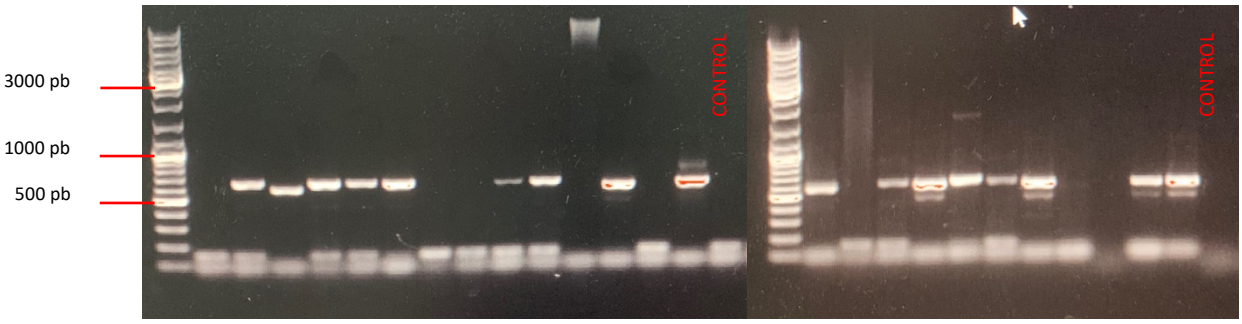

Figure 32. Exemple de gels d'électrophorèse effectués sur les produits PCR

2.2.4. Purification, séquençage et analyse

Une procédure de purification a ensuite été réalisée sur les produits de PCR obtenus à l'aide d'un kit (Machery-Nagel, PCR Clean-up) selon les instructions du fabricant. Les concentrations en ADN obtenus étaient comprises entre 32,9 et 126 ng/µL. Nous avons choisi d'envoyer en séquençage les échantillons pour lesquels nous avons obtenu des résultats concluant avec les gels d'électrophorèse soit 40 échantillons. Le séquençage a été pris en charge par l'entreprise Eurofins en fournissant les échantillons ainsi que les amorces ayant servis à l'amplification. Les données au format FASTA des séquences obtenues ont été comparées à une banque de données (NCBI : National Center for Biotechnology Information) avec l'outil BLASTn.

Finalement, des ascomycètes dont 13 isolats de *Trichoderma* ont pu être identifiés de meme que 4 *Fusarium*, *Paecelomyces*, *Pleurotus* et *Aspergillus*. Des isolats des genres *Paracremonium*, *Penicillium* et *Talaromyces* (3), et enfin *Xenoacremonium* et *Exophiala* (1) ont également été identifiés (Figure 33). De manière cohérente avec notre travail, une étude précédente avait conclu que le champignon colonisateur le plus représenté sur le marc de café était *T. atroviride* (70%), suivi de *T. citrinoviride* (29%) et d'*Aspergillus* sp. (1%) (Chilosi et al., 2020). Une autre étude menée par (Silva et al., 2008) a permis de conclure sur l'identification

de champignons filamenteux présents pendant le procédé de séchage des grains de café après le procédé humide développé en partie 1 de la bibliographie. Une majorité d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, de *Fusarium* et de *Cladosporium*, ont été identifiés représentant 42,6% du total des isolats de champignons.

L'identification par l'analyse des séquences amplifiées ITS1-ITS4 n'a pas permis l'identification au niveau de l'espèce. En effet, des scores élevés ont été obtenus à l'issu de la recherche d'alignement avec la banque NCBI pour un grand nombre d'espèces du même genre. Les séquences ITS étant très conservées dans ce cas de figure, une distinction n'est que difficilement envisageable.

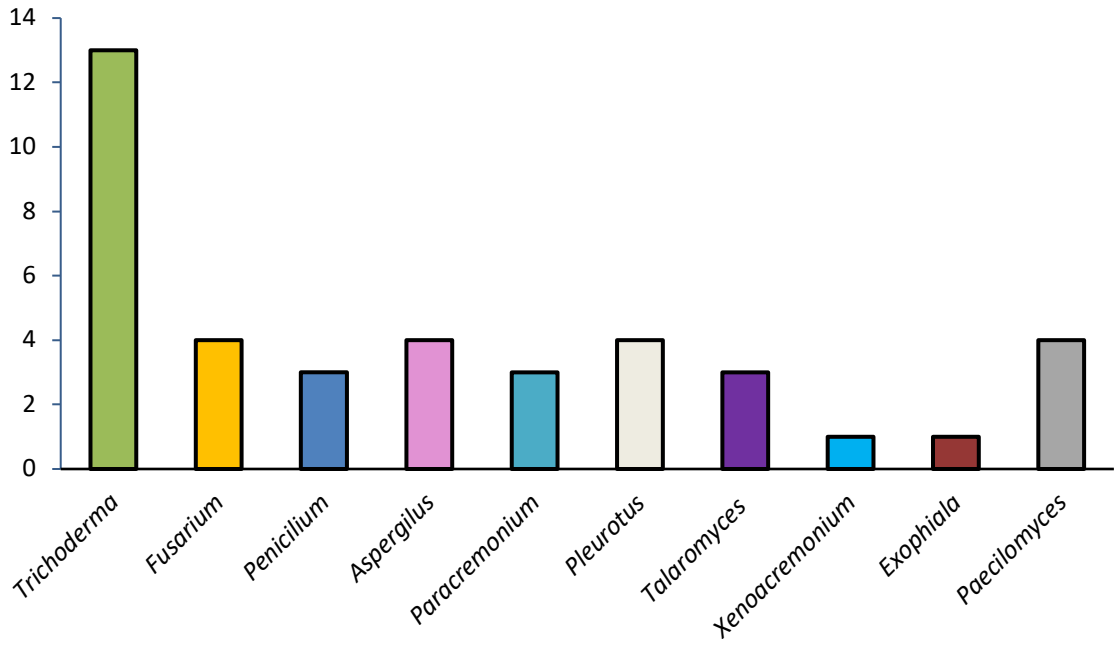

Figure 33. Nombre d'isolats de différents genres après isolement

3. Criblage des activités enzymatiques des différents isolats en croissance sur marc de café ayant subi une extraction de ses composés phénoliques

Suite à l'identification du genre des champignons isolés du marc, il n'a été choisi de garder que les champignons en capacité de sporuler afin de standardiser la mise en œuvre de l'inoculation. Un premier criblage a été effectué en considérant la capacité de produire des enzymes hydrolytiques sur du marc de café provenant du partenaire Gecco, après extraction éthanolique des composés phénoliques.

3.1. Matériel et méthode

3.1.1. La fermentation sur marc de café

Le criblage a été mené en plaques DeeplWell 24 puits (Axygen®) d'une capacité de 10 mL par puits. Les spores permettant l'inoculation des substrats solides ont été obtenues en cultivant les champignons pendant 7 jours sur un milieu PDA à 25°C. La récolte a été effectuée en utilisant de l'eau phisiologique (0,9% de NaCl) par frottement en surface et filtration à travers un tissu Miracloth (Milipore), avant d'être congelée à -20°C pour une utilisation ultérieure (avec une durée de stockage maximale de 48 heures). 0,5 g de marc de café séché après extraction éthanolique, a été placé dans chaque puits du deepwell. Par la suite, chaque puits a été humidifié avec 60% d'eau distillée, puis soumis à une stérilisation par autoclavage.

L'inoculation a été réalisée pour obtenir une concentration de 10^6 spores par gramme de matière sèche. Chaque fermentation a été réalisée en triplicat avec un témoin négatif (eau stérile) par deepwell 24 puits (Figure 34). Pour favoriser les échanges gazeux, un film stérile poreux (VWR) a été disposé sur le dessus de chaque plaque. Par la suite, ces deepwells ont été introduits dans un incubateur réglé à une température de 25°C, où ils ont été laissés en culture pendant une période de 5 jours sans agitation. L'ensemble du processus s'est déroulé dans une boîte rectangulaire de culture anaérobie (Mitsubishi Gas Chemical Company, AnaeroPak), avec un cristallisoir préalablement rempli d'eau afin d'éviter une évaporation trop importante.

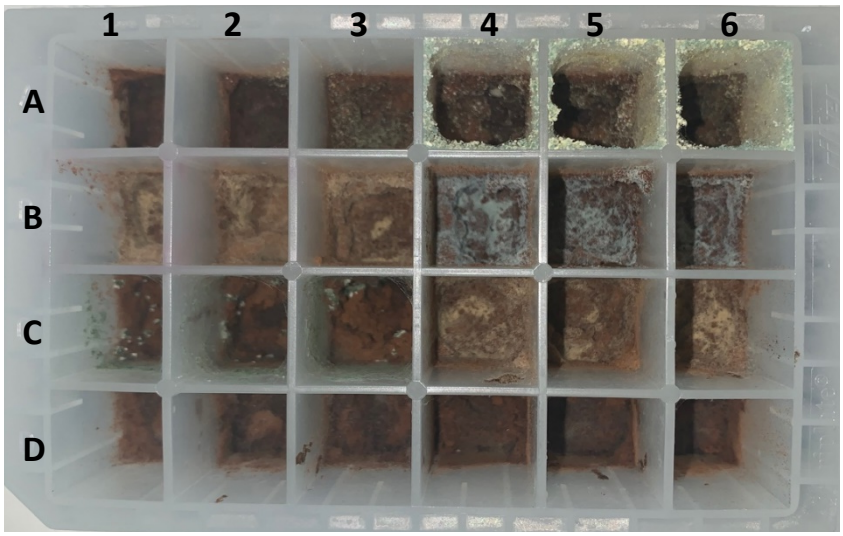

Figure 34. Fermentation en milieu solide sur marc de café appauvri après 9 jours d'incubation à 25°C. A123 : *Trichoderma* 1, A456 : *Trichoderma* 2, B123 : *Paecilomyces* 1, B456 : *Penicillium* 1, C123 : *Trichoderma* 3, C456 : *Paecilomyces* 2, D123 : *Fusarium* 1, D456 : Témoin négatif

3.1.2. L'extraction des enzymes

L'extraction des enzymes a été réalisée en ajoutant 5 mL d'eau déminéralisée par gramme de matière sous agitation à 150 rpm. Cette étape a été menée pendant 30 minutes à une température de 30°C en utilisant un MixingBlock (VWR, Thermal Shake lite). Par la suite, une centrifugation a été effectuée à 4000 x *g* pendant 10 minutes afin de séparer les phases. Les surnageants ont ensuite été filtrés à travers des filtres seringue PES d'une porosité de 0,45 µm pour éliminer les particules indésirables. Les extraits enzymatiques obtenus ont été conservés à une température de 4°C pendant une période maximale de 48 heures avant leur utilisation.

3.1.3. Les dosages d'activités

Plusieurs dosages d'activités ont été réalisés afin de pouvoir sélectionner une souche apportant une grande variété d'activités hydrolytiques et ayant la capacité de croître rapidement sur le substrat. Les activités protéolytiques mesurées comprennent l'activité mannanase, endoglucanase (CMCase), xylanase, lipase et protéase. Pour les trois premières activités de glycoside hydrolase (GH), des substrats tels que le galactomannane, la carboxyméthylcellulose et le xylane ont été utilisés. En ce qui concerne l'activité lipase et l'activité protéase, les substrats utilisés étaient respectivement le p-nitrophenyl butyrate (p-

NPB) et l'azo caséine. L'activité lipolytique a été déterminée selon la méthode de (Winkler & Stuckmann, 1979). Le protocole détaillé est fourni dans la partie 4 de ce chapitre. Une unité (U) d'activité hydrolytique de lipase a été exprimée en micromoles de 4-nitrophénol libérés par minute par hydrolyse du 4-nitrophényl butyrate. L'activité enzymatique des trois glycoside hydrolases a été évaluée par la méthode DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique), quantifiant la libération de sucres réducteurs (Miller, 1959). Le protocole détaillé est également fourni dans la partie 4 de ce chapitre. Une unité (U) d'activité de glycoside hydrolase a été quantifiée micromoles de sucres réducteurs libérés par minute dans les conditions de l'essai. L'activité protéolytique a été évaluée selon la méthode décrite par (Germano et al., 2003) avec quelques modifications. Brièvement, une solution d'azo caséine a été préparée (1% (p/v) dans un tampon citrate-phosphate 0,2 M, pH 7,2). Un volume 250 µL de cette solution a été disposé par puits d'une microplaque 96 puits avant d'y ajouter 150 µL d'échantillon pour une incubation d'une heure à 37°C. 400 µL d'une solution de trichloroacétate (10%, v/v) a été ajoutée. Une centrifugation a été réalisée avant d'ajouter 200 µL de NaOH à 1M. L'absorbance a été mesurée par rapport à un blanc contenant l'extrait enzymatique inactivé (traité à 100°C pendant 10 min) à 420 nm. Une unité d'activité enzymatique protéolytique (U) a été définie comme la quantité d'enzyme qui a provoqué une augmentation de l'absorbance de 0,01 à 420 nm en 1 heure à 37°C.

3.1.4. Précipitation des protéines

Afin de visualiser les protéines, en SDS-PAGE, les extraits ont été préparés en utilisant la méthode de précipitation au chloroforme/méthanol (Wessel & Flügge, 1984). Quatre volumes de méthanol ont été mélangés avec un volume de l'échantillon de protéines (surnageant) avant d'ajouter un volume de chloroforme. Après l'ajout de trois volumes d'eau, le mélange a été centrifugé pendant 2 minutes à 15 000 x *g*. La phase supérieure a été éliminée. Ensuite, quatre volumes de méthanol ont été ajoutés, suivis d'un mélange au vortex et d'une centrifugation pendant 2 minutes à 15 000 x *g*. Enfin, le surnageant a été éliminé et le culot a été séché pendant 15 minutes sous Sorbonne. Ces protéines précipitées vont être employées dans la section suivante (3.1.5) mais aussi dans le cadre de l'identification par (U)HPLC, section 5.1.1 de ce chapitre.

3.1.5. SDS-PAGE

Le profil protéique a été estimé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE) en utilisant la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Un gel de protéines préfabriqué Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad) a été utilisé. Les protéines précipitées ont été diluées dans un tampon Laemmli contenant du β-mercaptoéthanol et du SDS, puis chauffées à 95°C pendant 10 minutes. Un volume adapté d'échantillon, correspondant à 340 µg de protéines solubilisées, ainsi que 3 µL d'une solution de marqueurs de poids moléculaire (Bio-Rad), ont été chargés sur le gel de polyacrylamide. La migration a été réalisée pendant une heure dans un tampon de migration contenant du Tris (30,3 $g.L^{-1}$), de la glycine (144 $g.L^{-1}$) et du SDS (10 $g.L^{-1}$) à pH 8,3. La migration électrophorétique a été effectuée sous 100 V pendant les 10 premières minutes, puis sous 200 V jusqu'à la fin de la migration. Ensuite, les protéines ont été révélées avec la technologie d'imagerie Stain-Free.

3.2. Résultats

Afin de simplifier l'interprétation des résultats, nous avons adopté une désignation spécifique pour les souches identifiées, comme suit : TRI pour *Trichoderma*, FUS pour *Fusarium*, PAE pour *Paecelomyces*, PEN pour *Penicillium*, PAR pour *Paracemonium*, ASP pour *Aspergillus*, XEN pour *Xenaoacremonium*, EXA pour *Exophiala*, PLE pour *Pleurotus*, et TAL pour *Talaromyces*. Chacun de ces acronymes est associé à un numéro spécifique qui permet de distinguer les différentes souches (Figure 35). Les activités enzymatiques mesurées pourraient ne pas refléter pleinement le potentiel maximal des enzymes. Cela est dû au fait que les conditions des tests enzymatiques, telles que le pH, la température, n'ont pas été optimisées, mais sont restées constantes pour tous les échantillons.

On remarque que plusieurs souches révèlent certaines activités de façon prédominante. FUS1, FUS3, FUS4, PEN1 et ASP3 ont par exemple des activités lipases plus élevées que les autres souches (Figure 35). De fait, plusieurs espèces appartenant aux genres *Fusarium*, *Penicillium* et *Aspergillus* ont déjà fait l'objet d'études en ce qui concerne la production de lipases (Colla et al., 2015; Geoffry & Achur, 2018)(Azeredo et al., 2007; N. Li & Zong, 2010; Wijaya et al., 2020; Yuliyanti et al., 2021).

Pour l'activité protéase, TRI11, PEN1 et ASP1 ont été capables de produire des extraits enzymatiques plus actifs. La littérature confirme bien que *Penicillium*, *Trichoderma* et *Aspergillus* sont des genres étudiés sur leur production de protéases (Fazilat, 2016; Germano et al., 2003; Kredics et al., 2005; Souza et al., 2015).

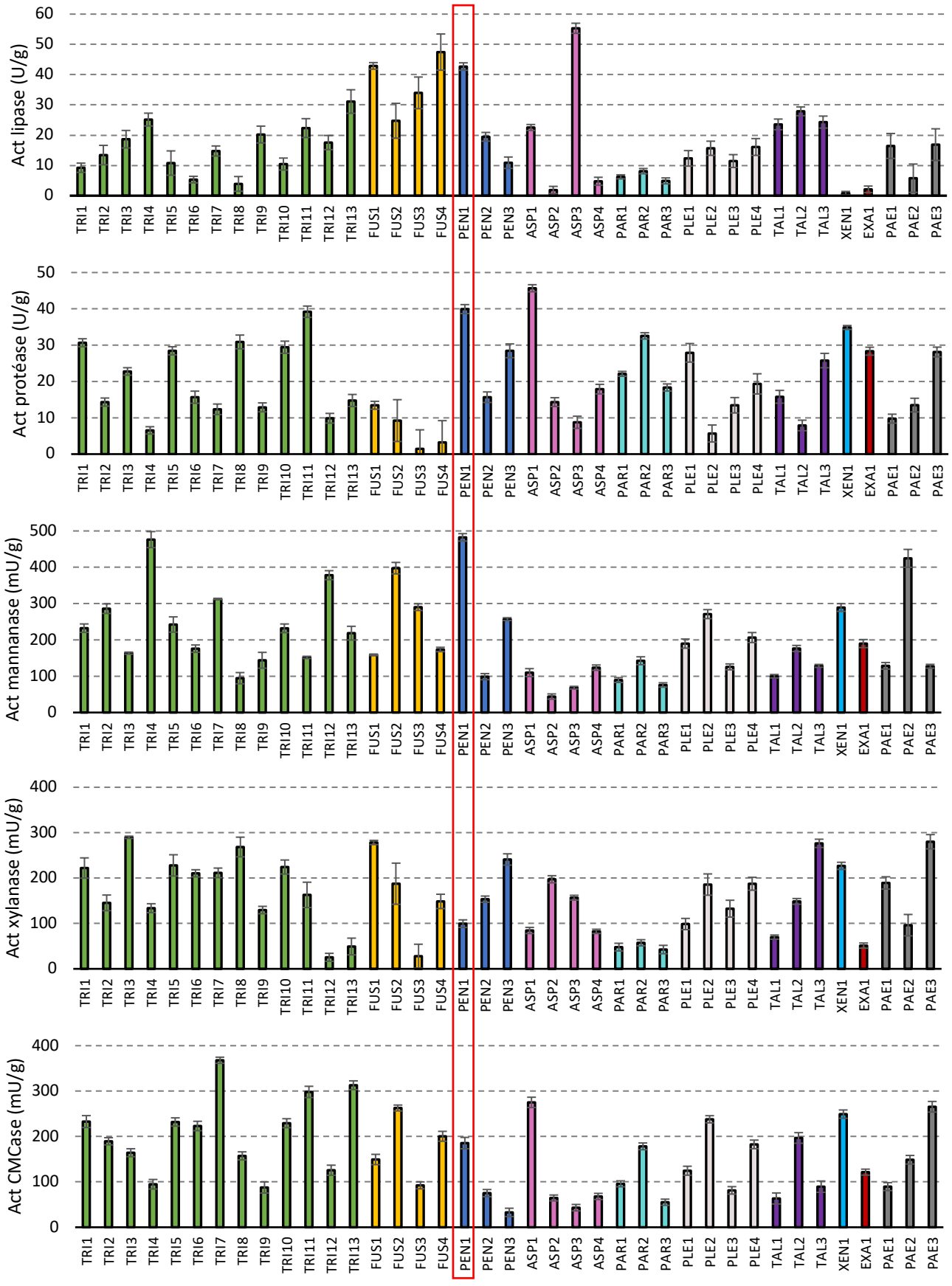

Figure 35. Résultats du criblage pour les activités protéase, lipase, mannanase, xylanase et CMCase effectué sur l'ensemble des champignons identifiés après séquençage.

En ce qui concerne les trois activités de glycoside hydrolase, il est notable que les souches du genre *Trichoderma* montrent une aptitude particulière à produire ce type d'enzymes. En effet, ce genre est couramment exploité pour la synthèse d'enzymes cellulolytiques et hémicellulolytiques (Kredics et al., 2005).

La sélection de la souche la plus pertinente pour poursuivre le travail a été faite en prenant compte la somme des trois activités glycoside hydrolase ainsi que la somme des activités lipase et protéase. Les six meilleures souches selon ces critères sont présentées dans le Tableau 14.

Tableau 14. Liste des six souches les plus prometteuses

Souches	Σ(GH) mU/g	Σ(Lip et Pro) U/g
TRI7	892,12	27,1
FUS2	847,9	33,99
PEN1	767,33	82,61
XEN1	765,24	35,74
TRI11	612,76	61,55
ASP1	469,55	68,21

NB : GH = glycoside hydrolase, Lip = lipase et Pro pour protéase

Parmi les six meilleurs couples d'activités additionnées, on retrouve deux champignons du genre *Trichoderma*, un du genre *Aspergilus*, un *Fusarium*, un *Xenoacremonium* et un *Penicillium*. Cependant, un seul champignon possède des valeurs d'activités cumulées très élevées par rapport aux autres, PEN1 avec une activité lipase de 42,67 U/g, une activité protéase de 39,94 U/g, une activité mannanase de 482,34 mU/g, une activité xylanase de 99,56 mU/g et une activité CMCase de 185,43 mU/g. Il a donc été décidé de se focaliser sur ce champignon afin de pouvoir réaliser l'optimisation des conditions de fermentation solide sur le marc de café.

De plus, une SDS-PAGE a été réalisée pour visualiser les protéines produites par les champignons sur le marc de café (Figure 36). Cette approche permet de confirmer la présence

d'enzymes responsables des activités recherchées et d'apporter quelques réponses sur les masses molaires associées.

Des similitudes sont observées entre les souches d'un même genre, comme *Trichoderma*, qui présentent tous au minimum deux bandes de protéines communes d'intensité variable de masse moléculaire (MM) apparente de 26 et 23 kDa. Cependant, pour TR7 et TR11, une bande de protéine supplémentaire MM apparente de 30 kDa est observée, absente chez TR5 et TR1. En revanche, ces dernières souches présentent deux bandes à environ 40 et 48 kDa. Aucune de ces bandes ne coïncide avec les deux autres espèces PEN1 et FUS2, qui montrent respectivement deux bandes de protéine de MM apparente de 23 et 36 kDa, ainsi qu'une bande de protéine de MM apparente de 28 kDa. En analysant les activités précédemment mesurées, on constate que les résultats pour TRI5 et TR1 sont relativement similaires. Ceci suggère que les deux souches pourraient être identiques ou très proches l'une de l'autre.

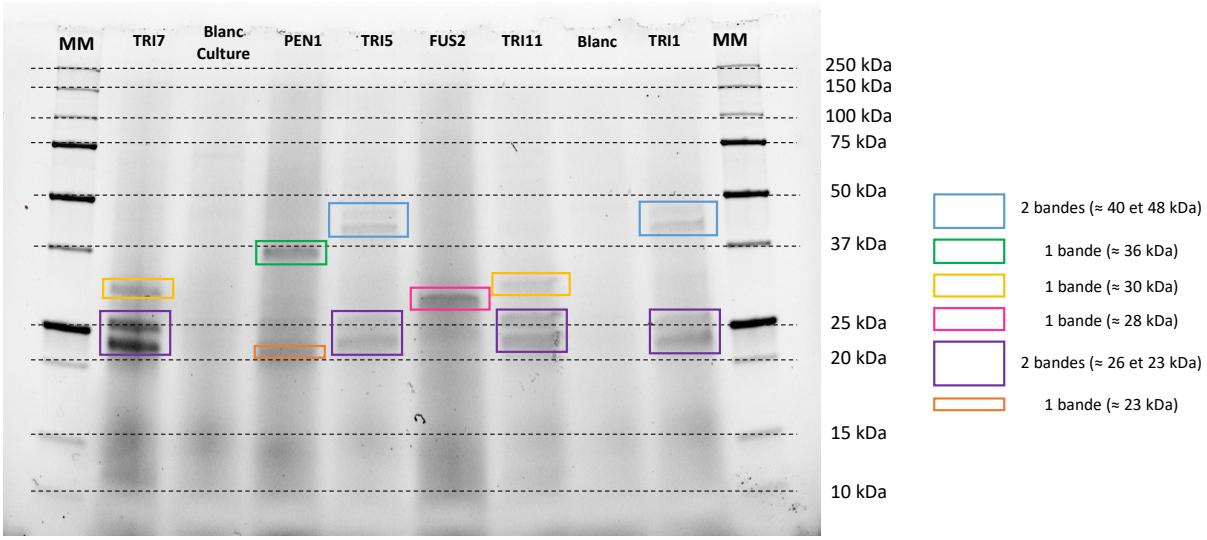

Figure 36. Gel SDS-PAGE any-kD des différents extraits enzymatiques obtenus après fermentation solide sur marc de café. MM pour marqueur de masse moléculaire

Les bandes de protéines observées donnent une idée générale des protéines présentes dans les extraits, ainsi que de leur masse moléculaire apparente. Comme dis précédemment, ces informations n'apportent pas d'éléments permettant la sélection d'une souche par rapport à une autre, mais cela permet une première identification des protéines

responsables de ces activités. Une caractérisation plus détaillée a été réalisée par la suite sur la souche sélectionnée, PEN1 (voir partie 5 de ce chapitre). Pour des raisons pratiques et en raison du fait que ce champignon n'a été identifié que par son genre à ce stade de l'étude, nous allons poursuivre en utilisant l'appellation *Penicillium* sp.

4. Publication : Optimisation des conditions de culture de *Penicillium* sp. et de l'extraction de ses enzymes extracellulaires sur marc de café épuisé en polyphénols en vue de la production d'un cocktail cellulolytique et lipolytique

Les résultats de l'étude se présentent sous la forme d'un article de recherche non publié à ce jour.

Optimization of *Penicillium* sp. culture conditions and extracellular enzyme extraction on spent coffee grounds subjected to polyphenols removal for the production of a cellulolytic and lipolytic cocktail.

Maxime Beaudor, Maria Hamada Tahtah, Peggy Vauchel, Delphine Pradal, Abdulhadi Aljawish and Vincent Phalip

Abstract

Solid-state fermentation is an increasingly popular approach for the valorization of biowaste in the production of high-value-added products such as enzymes. Key factors influencing the production of lipase, β-mannanase, and endoglucanase including moisture content, fermentation duration, and inoculum size underwent screening and optimization. Moreover, the pivotal parameters driving enzymes extraction, specifically solvent volume and extraction time, were examined and optimized. *Penicillium* sp. was chosen to facilitate the production of the desired enzymes. The coffee grounds used as a substrate underwent ultrasond-assisted extraction at 400 W power, using a solvent mixture of 50% ethanol, and a liquid-solid ratio of 40 mL, yielding a successful recovery of phenolic compounds evaluated at 11.83 ± 0.15 mg GAE/g dm. By employing a liquid-solid ratio of 7 mL/g dm and a contact time of 55 minutes, successful recovery of 75.09 ± 2.55 U/g dm of lipase activity and 138.78 ± 6.76 mU/g dm of β-mannanase activity was achieved. The optimization of culture conditions has led to the identification of optimal growth parameters, resulting in the attainment of 65.261 U/g dm, 947.516 mU/g dm, and 295.457 mU/g dm of lipase, β-mannanase, and endoglucanase activity, respectively. These optimized conditions comprised a moisture content of 74.1%, a fermentation duration of 7.1 days, and an inoculum size of 10^7 spores/g dm.

1. Introduction

Coffee is the most drunk beverage after water and tea and most traded commodity after petroleum and its derivatives.[1] However, the coffee industry generates a substantial amount of biomass as byproducts of which the spent coffee grounds (SCG) is concerned.[2] Coffee grounds are rich in numerous compounds such as fibers, proteins, lipids, and phenolic compounds.[3] Many studies have focused on the extraction of polyphenols from coffee grounds[4–8], as they represent high-value molecules with applications in various fields such as the agri-food industry[9], cosmetics[10], and pharmaceuticals[11]. However, these are not the only compounds that

can be valorized. SCG fibers are composed of non-solubilized polysaccharides such as galactomannans, arabinogalactans, and cellulose, with half of the total being in the form of galactomannans.[12–14] The degradation of mannan structures primarily relies on key enzymes, namely β-1, 4-mannanase (EC 3.2.1.78), and β-mannosidase (EC 3.2.1.25), as well as some accessory enzymes, such as β -glucosidase (EC 3.2.1.21) and α-galactosidase (EC 3.2.1.22).[15] These enzymatic activities are found in a diverse array of micro-organisms, including various fungi and especially many *Penicillium*.[16–19] The lipids present in coffee grounds can also influence the production of another type of enzymes, such as lipases[20] (EC 3.1.1.3) that can catalyze the hydrolysis reaction of ester compounds such as triacylglycerol into fatty acids and glycerol[21]. Some *Penicillium* species like *Penicillium roqueforti* have the ability to produce these enzymes on various byproducts of the agri-food industry, such as cocoa bran residues[22] or solid palm oil residue.[23] Another study conducted by Yuliyanti and al.[24] has already demonstrated the utilization of coffee grounds for lipase production using *Aspergillus aculeatus* on SCG. This underscores the potential for a multifaceted enzymatic approach to valorize various aspects of coffee waste across different industries. Considering the substantial expenses associated with commercial enzyme production, an alternative approach that holds promise is solid-state fermentation (SSF). This technique offers several advantages, including heightened productivity in terms of enzymatic extracts.[25] Utilizing solid-state fermentation facilitates the synthesis and retrieval of these hydrolytic enzymes in the form of valuable enzyme cocktails, with significant applications found notably within the detergent industry. This sector emerges as a notable consumer of enzymes, projected to account for 7.4% of the enzyme market by 2024.[26] However, such enzyme cocktails can also be used as dietary supplements in the feed for livestock or poultry. In fact, plant feed contains a large amount of the nonstarch polysaccharide fraction, which is poorly digested by animals.[27] Exogenous enzyme cocktails, such as carbohydrases, can break specific chemical bonds in plant-based diets.[28] Lipase can improve the digestibility of dietary lipids.[29] Given the aforementioned concerns, this study assesses the potential of utilizing agro-industrial coffee waste after removal of phenolic compounds, for the production of hydrolytic enzymes via SSF, with a particular emphasis on β-mannanase, endoglucanases, and lipases. A strain isolated and identified as *Penicillium* sp. was chosen for enzyme production, as no study has previously investigated lipase production from this species using spent coffee grounds. In this study, the optimal extraction conditions (including time and solvent-to-sample ratio) and production conditions (including moisture content, fermentation duration, and inoculum size) of these enzymes were determined at the

laboratory flask scale (Figure 1). The overarching aim was to investigate the implementation of a valorization cascade, encompassing the retrieval of polyphenols and subsequent production of an enzymatic cocktail (Figure 1).

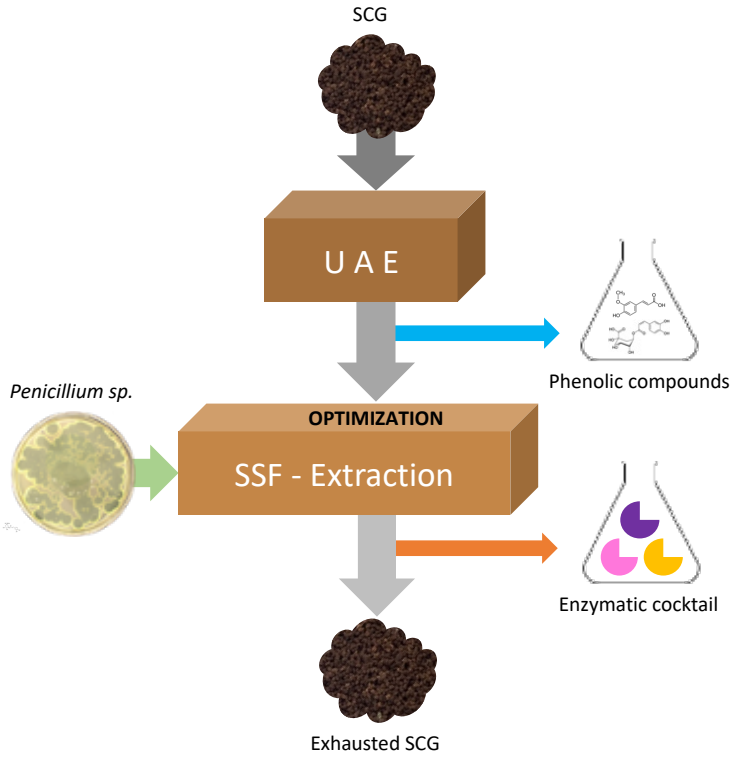

Figure 1. Cascading valorization approach of SCG

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

Ethanol was from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium carbonate was from Prolabo (Paris, France). The Folin-Ciocalteu's phenol reagent was obtained from EMD Milipore Corporation (Billerica, MA, USA). All followed elements were sourced from Sigma Aldrich: 4-nitrophenyl butyrate, sodium carbonate, sodium carboxymethylcellulose, sodium acetate, citric acid, DNS (3,5-dinitrosalicylic acid), potassium sodium tartrate tetrahydrate, gallic acid, glucose, mannose, Bradford reagent, bovine serum albumin and buffer components (sodium citrate dihydrate, sodium chloride, sodium hydroxide, sodium phosphate

dibasic heptahydrate, sodium phosphate monobasic monohydrate). Carob galactomannan (low-viscosity) was purchased from Megazyme and acetonitrile from Carlo Erba (99,95%).

2.2. Spent coffee grounds

Spent coffee grounds were provided by a local waste collection company, Gecco (Avelin, France). This company collects a mix of spent coffee grounds (SCG) from restaurants and bars in the North of France. The batch of SCG used for the present work had been stored on Gecco site in open air barrels for 1-6 months. To prevent microbial spoilage during storage in the laboratory, SCG were dried in an electric forced-air food dehydrator (Food Dehydrator, Excalibur) at 40°C for 12 hours. Dried SCG were then subjected to an ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds. For this, a 0.9 L innovative stainless-steel tube with a 22 kHz frequency generator (SINAPTEC, Ultrasonic Lab750) was used. An ultrasound power of 400 Watts was applied to a 700 mL volume for 30 minutes. The solid-to-liquid ratio was 1 g of dry matter per 40 mL of solvent, and the solvent was 50% (v/v) ethanol in water.

2.3. *Penicillium* strain and spore production

The *Penicillium* strain was isolated from SCG before drying. Its identification was carried out by obtaining the amplification of ITS1-ITS4 sequences after DNA extraction using a kit (Machery-Nagel, NucleoSpin Soil). The amplicons were sequenced (Eurofins), and a basic local alignment search tool (BLAST, NCBI database) was used for sequence similarity searches. Spore production was carried out by cultivating the fungi for 7 days on a potato dextrose agar (PDA) medium at 25°C. The harvest was performed using sterile physiological water (0.9% NaCl) by surface rubbing and filtration through Miracloth (Millipore) before being frozen at -20°C for subsequent use (with a maximum storage duration of 48 hours).

2.4. Solid state fermentation procedure

Fermentations were carried out in 50 mL wide-neck Erlenmeyer flasks with 5g of dry substrate. Subsequently, humidification was performed using deionized water before the Erlenmeyer flask was autoclaved. The appropriate spore dilution (corresponding to a volume of 343 µL) was then added to the substrate in the center of the Erlenmeyer flask using a micropipette to achieve the desired spore concentration per gram of dry matter. The volume of the spore solution was considered when determining the required amount

of water for achieving the desired moisture level. The Erlenmeyer flasks, sealed with a cotton plug, were then placed in a water-saturated incubator (to prevent water evaporation and substrate drying) at a temperature of 25°C.

2.5. Enzyme extraction

The enzymatic extraction is carried out using autoclaved water. Following incubation under orbital agitation at 150 rpm, at 25°C in an incubator (Inforst HT, Multritron). The entire Erlenmeyer flask content is then transferred into a 50 mL Falcon tube for centrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5804 R) at 10,000g for 10 minutes at 8°C. The enzymatic extract, referred to as a cocktail, is obtained from the filtered supernatant using a 0.45 µm syringe filter. The enzymatic cocktail is finally stored at 4°C while awaiting its use (maximum 24 hours after its recovery to prevent loss of activity due to the presence of proteases, inhibitors or contaminants). The preliminary investigation aimed at identifying the optimal extraction time and liquid-to-solid ratio for the recovery of an active hydrolytic enzymatic cocktail, were conducted over a 9-day period at a moisture content of 60% and an inoculum of $5x10^6$ spores/g dm. A pH meter (Mettler Toledo, FiveEasy FE20) was employed to ascertain the pH of the extracts.

2.6. Analytical measurements

2.6.1. Characterization of SCG before and after polyphenol removal

Moisture content of SCG was measured by a moisture analyzer (PRECISA, XM60). Evaluation of phenolics content of SCG was performed according to the procedure described by Beaudor and al.[4]

2.6.2. Total polyphenols content (TPC)

TPC were performed according to Folin-Ciocalteu method, using high-throughput microplate procedures. Assays were carried out on a microplate reader (Molecular Devices, SpectraMax ABS Plus) using spectrophotometric detection and flat bottom 96-well microtiter plates.[30] Folin-Ciocalteu microplate assays were performed according to the procedure described Beaudor et al.[4] Briefly, a 20% (w/v) sodium carbonate solution was prepared. Folin-Ciocalteu's phenol reagent was diluted 1:5 (v/v) with water. Standard gallic acid solutions (0 – 400 mg/L) were prepared from a 400 mg/L stock solution, generating a calibration curve (equation: $y = 0.055x + 0.0663$; $R2 = 0.9996$) within this range. Each well contained 20 µL of extraction sample or gallic acid standard solution, 120 µL of water, and 30 µL of Folin-Ciocalteu reagent solution (1:5, v/v),

followed by 30 µL of 20% (w/v) sodium carbonate solution. The experiments were triplicated at 45 ± 1°C. After 8 minutes, absorbance at 765 nm of the blue complex was measured. The total phenolic content was quantified in gallic acid equivalents (mg of GAE/g dm) using the gallic acid calibration curve.

2.6.4 Measurement of enzyme activities

Three different enzyme activity assays were conducted in 96-well microplates on the cocktails obtained at the end of fermentation. The lipolytic activity was determined following the method of Winkler and Stuckmann[31] using p-NP butyrate as substrate. One unit (U) of hydrolytic activity of lipase was expressed as micromoles of 4-nitrophenol released per minute by hydrolysis of 4-nitrophenyl butyrate. The reaction was conducted for a period of 45 minutes, with data points being recorded at 5-minutes intervals. The assays were conducted at 37°C, and the spectral measurements were conducted at a wavelength of 400 nm. The buffer used was a phosphate buffer at 50 mM, maintaining a pH of 7.4. The substrate, 4-Nitrophenyl butyrate, was prepared at 50 mM concentration (8.82 µL in 1 mL acetonitrile). Each well contained 200 µL, consisting of an enzyme solution volume of 20 µL, buffer volume of 175 µL, and a substrate volume of 5 µL. The blank control consisted of buffer in place of the enzyme solution. Enzyme activity calculations were conducted within the linear range of the kinetic curve, utilizing a precisely derived formula (Equation 1).

$$Lipase\ activity\ \left(\frac{U}{g}\right) = \frac{\mathrm{Abs}_{max} - \mathrm{Abs}_{min}}{\mathrm{t}} * \frac{\mathrm{Vol}_{tot}}{\varepsilon * Vol_{enz}} * \frac{V_{ext}}{m_{SCG}}$$

The formula yielded enzyme activity (U/mL), considering parameters like Abs_{max} (maximum absorbance within the linear range), Abs_{min} (minimum absorbance within the linear range), t (time span within the linear range), Vol_{tot} (total volume, 0.2 mL), ε (molar absorptivity, 0.0148 $M^{-1}cm^{-1}$), Vol_{enz} (enzyme volume 20 µL), V_{ext} (enzyme extraction volume), m_{SCG} (mass of spent coffee grounds used for fermentation, 5g)).

The enzymatic activity of glycoside hydrolase was evaluated using galactomannan for mannanase activity and carboxymethyl cellulose (CMC) for endo-β-1,4-glucanase activity assay through the DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) method, quantifying the release of reducing sugars during hydrolysis.[32] One unit (U) of glycoside hydrolase activity was quantified in terms of micromoles of reduced sugar released per minute

under assay condition. The reaction was conducted for a period of 30 minutes at 50°C, and the spectral measurements were performed at a wavelength of 540 nm. The buffer used was a citrate buffer at 50 mM, maintaining a pH of 4.5. The substrate, comprising 0.5% galactomannan or carboxymethylcellulose was prepared by dissolving 0.5 g of each powder substrate in 100 mL of the buffer. The reactions were performed in a volume of 1000 µL (contained in a 1.5 mL Eppendorf tube), with 500 µL of enzyme solution and 500 µL of buffer-substrate mixture. The blank control involved the buffer-substrate mixture in place of the enzyme solution. To obtain the concentration of released reducing sugars, a standard reduced sugar range (10, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0 g/L) was employed for calibration. One calibration curve was established for mannose, and another for glucose. 60 µL sample from the calibration range, blank, or test sample was mixed with 120 µL of DNS solution in a PCR plate. The mixture was subjected to thermal treatment at 95°C for 6 minutes, followed by a 1-minute ice-cooling step. Subsequently, the mixture was diluted in a 96-well microplate in triplicate, with each well containing 40 µL of the coloured solution obtained before and 160 µL of water. Finally, the spectrophotometric reading was taken at 540 nm. The equations of the standard curves were y = 0,2915x - 0,0332 (R^2 = 0,9999) for mannose and y = 0,2543x - 0,009 (R^2 = 0,9982) for glucose.

Enzyme activity calculations were conducted using a meticulously derived formula (Equation 2).

$$Glycoside\ hydrolase\ activity\ \left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{(C_{sugar} - C_0) * 2 * 10^3}{MW_{sugar} * 30} * \frac{V_{ext}}{m_{SCG}}$$

The formula calculated enzyme activity (U/mL) based on parameters including the sugar concentration in g/L at t (C_{sugar}), the sugar concentration in g/L at t = 0 minutes (C_0), time in minutes (here 30 minutes), a dilution factor of 2 for the enzyme solution (total 1000 µL/500 µL enzyme = 2), and the molecular weight of the specific reference sugar (180,156 g/mol for mannose or glucose) (MW_{sugar}). V_{ext} is enzyme extraction volume and m_{SCG} is the mass of spent coffee grounds used for fermentation, here 5g. This formula considers the unit conversion from mol/L to µmol/mL by multiplying by 10^3.

2.7. Experimental designs

Two face-centered central composite designs were used, precisely two full factorial designs 2^k, where 2^k experiments were required to cover all possible combinations of factor levels.[33,34]

The initial experimental design aimed to establish optimal conditions for the extraction of extracellular enzymes. This design included 2 factors (k = 2) with 2 levels each. The process variables under consideration were the liquid-to-solid ratio (R, mL/g dm) and the extraction time (T, minutes).

Subsequently, the second experimental design focused on investigating culture conditions. This design encompassed three factors (k = 3) with two levels each. The process variables analysed included substrate moisture content (M, %), fermentation duration (D, days), and inoculation (I, spores/g dm).

Real and coded values of low and high levels for each process variable were given in Table 1 and Table 2. Axial points (α) were fixed to 1. To assess experimental errors, central point repetitions were carried out with four and five repetitions for the initial and second experimental designs, respectively. Detailed information on the 12 and 19 assays of the first and second design can be found in Table 3 and Table 5 (in section 3.1.2.), respectively.

For the first experimental design, process responses were lipase activity (L, U/g dm) and endo-β-1,4-mannanase activity (M, mU/g dm). Concerning the second design, another hemicellulolytic activity has been added to the two previous ones, the endo-β-1,4-glucanase (G, mU/g dm). Modelling and statistical analyses were performed with Design-expert V13 software (Stat-Ease, Minneapolis, MN, USA) and SigmaPlot V12 software (Systat Sofware, San Jose, CA USA). Each response was modelled using multiple regression according to a second-order polynomial function (Equation 3):

(Equation 3) $$Y = b_0 + \Sigma_i b_i X_i + \Sigma_i b_{ii} X_i^2 + \Sigma_{ij} b_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Y is the matrix of the answers, b_0 the constant value, b_i the coefficient effect of the factor X_i, b_{ij} represents the coefficient of interaction between factor X_i and factor X_j, and ε is the experimental error. Coefficients b_0, b_i, b_{ii} and b_{ij} are determined by matrix algebra according to the relation (Equation 4):

(Equation 4) $$b = (X^t.X)^{-1}X^t.Y$$

X is the experiment matrix in coded variables and X^t is the transposed experiment matrix. Analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the statistical significance of independent variables. If p-value was less than 0.05 then the variables were considered significant.

Table 1.Level values for each parameter of the extracellular enzyme extraction design

Real values		Coded values	
Liquid to solid ratio, R (mL/g dm)	Extraction time, T (minutes)	X_1	X_2
3	3	-1	-1
5	6	0	0
7	9	+1	+1

Table 2. Level values for each parameter of the culture optimization design

Real values			Coded values		
Moisture content, MC (%)	Duration, D (Days)	Inoculation, I (Spores/g dm)	X_1	X_2	X_3
55	3	10^5	-1	-1	-1
65	6	$5.05x10^6$	0	0	0
75	9	10^7	+1	+1	+1

Using multilinear regression methodology (MLR), it was possible to perform a multivariate data analysis. Quadratic regression models were chosen so as to keep an adjusted R^2 value of at least 0.8.

3. Results & Discussion

In order to propose a sustainable and complete valorisation of SCG, an antioxidant polyphenol recovery step was conducted before solid state fermentation. Use of ultrasound-assisted extraction under optimized conditions allowed the extraction of up to 83% of extractable phenolic compounds. The optimization of this method utilization has been described in a previous article.[4]

3.1. pH of the extracted cocktail

During this study, the initial pH was not regulated, and sterile deionized water was used for enzyme extraction. The cocktails, before being used for various assays, had all a pH of 4.3 ± 0.15.

3.2. Preliminary studies

3.2.1. Characterization of spent coffee grounds (SCG)

The initial dry matter content of SCG after the dehydration treatment reached 96 ± 0.5% (w/w). Total extractable polyphenols content of SCG was evaluated at 14.1 ± 1.2 mg GAE/g dm (successive extractions were performed to exhaust SCG as described in section 2). In preparation of the subsequent solid-state fermentation process 11.83 ± 0.15 mg GAE/g dm were successfully extracted in UAE optimized conditions (400 Watts, 30 minutes, 40 mL/g, 50% ethanol in water solvent).[4]

3.2.2. Pre-studies on enzymes extraction parameters: liquid to solid ratio (R) and extraction time (T)

Several parameters can influence the efficiency of an extracellular enzyme extraction process from solid substrate produced by filamentous fungi. Optimizing these parameters can lead to improve final activity yields. Among these factors there are the type of buffer (pH, concentration), temperature, agitation, liquid-solid ratio, and extraction time.[35,36] Cultures were conducted over a 9-day period at a moisture content of 60% and an inoculum of $5x10^6$ spores/g dm (Figure 2).

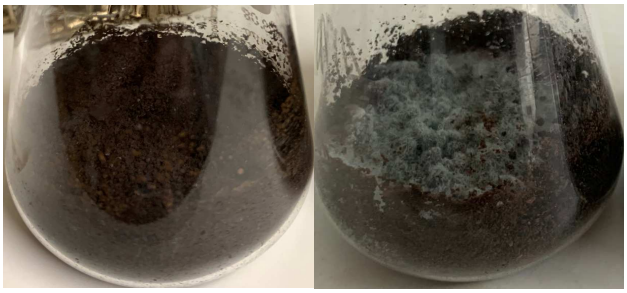

Figure 2. Substrate colonization after 9 days of fermentation.
On the left, t = 0 day; on the right, t = 9 days

Concerning this work, it was chosen to not study the nature of the buffer because the choice of the buffer can influence enzymatic activities. Hence, buffers specifically tailored to enhance the desired activity are employed individually during the assays for the dilution and solubilization of the commercial substrate. Agitation was not investigated as a deliberate choice and it was chosen to employ an agitation for correct homogenization of the solvent-substrate mixture. Contact time is a significant factor as it allows agitation to effectively play its role in to disassociating the fungal structures from the substrate, making the enzymes produced in the hyphae[37] more available. However, this can also lead to a loss of efficiency if the process is too prolonged. The plan limits for extraction time were selected based on previous studies that varied this parameter from 10 to 50 minutes for pectinases extraction.[35,38] The liquid-to-solid ratio is a crucial factor for several reasons. Firstly, it ensures proper homogenization of the substrate and efficient contact between the enzyme-bearing substrate surfaces. However, excessive dilution can hinder enzymatic activity assays by reducing enzyme concentration. The selection of plan limits for this parameter is justified by the minimum required volume (3 mL/g dm, or 15 mL) for enzyme extraction in a residual volume after solvent absorption by the substrate, which can absorb water in this case. As for the upper limit (7 mL/g dm, or 35 mL), an excessively large volume would lead to enzyme dilution, making activities difficult to quantify using the established colorimetric tests. Several studies focused on optimizing enzymes produced through solid-state fermentation have employed similar ratios[38–40]. The effect of temperature was not studied, considering 25°C within the studied time range ensures a relatively stable growth of *Penicillium* sp. [41]

This study used response surface methodology (RSM) to explore the interactions between two independent variables (liquid to solid ratio and extraction time) in order to determine their optimal levels. RSM, employing a face centered central composite design was employed to optimize the selected parameters for lipase and endo-β-1,4-mannanase production by *Penicillium* sp. A total of 12 experiments, including four center points, were conducted. Each numerical factor was varied across three levels (-1 ; 0 ; +1). The experimentally obtained values as well as the values predicted by the model are listed in Table 3. The standard deviation associated with the experimental values, representing the variation of measurements from the reference point (0 ; 0) of the experimental design, as well as the standard deviation associated with the model, are reported in Table 3. These deviation values calculated by the model closely approach the experimentally obtained values.

Table 3. Responses observed and predicted by the model for the 12 assays of extracellular enzyme extraction experimental design

Assay n°	*Varied parameters (coded values)*		*L U/g dm*		*M mU/g dm*	
	R	*ET*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*
1	-1	-1	13.08	12.31	32.86	34.73
2	1	-1	60.83	61.11	201.89	137.80
3	-1	1	16.22	16.94	36.25	35.60
4	1	1	75.09	76.86	138.78	198.39
5	-1	0	14.56	14.60	34.36	33.15
6	1	0	71.09	68.96	161.61	166.09
7	0	-1	57.14	57.61	100.54	99.66
8	0	1	70.29	67.80	126.22	130.38
9	0	0	63.02	62.68	104.33	113.01
10	0	0	60.47	62.68	114.37	113.01
11	0	0	65.39	62.68	120.07	113.01
12	0	0	59.83	62.68	116.55	113.01
	Std. Dev.		2.55	2.43	6.76	5.72

In this study, the independent variables were coded as liquid to solid ratio (R) and extraction time (T). The second-order polynomial model for the lipase activity was expressed by Equation 5 and for endo-β-1,4-mannanase activity by Equation 6.

(Equation 5) $Y_L = +62.68 + 27.18\ R + 5.09\ T + 2.78\ R*T - 20.90\ R^2 + 0.0275\ T^2$

(Equation 6) $Y_M = +113.01 + 66.47\ R + 15.36\ T + 14.93\ R*T - 13.39\ R^2 + 2.01\ T^2$

The model's adequacy was assessed through ANOVA, using Fisher's statistical analysis. The results of this analysis are presented in Table 4. The Model F-value of 200.92 and 179.17 for L and M responses respectively, indicates that the model is highly significant. The probability of observing an F-value of this magnitude due to random noise is only 0.01%. *P*-values lower than 0.05 suggest that the corresponding model terms are significant. In the case of L response, b_1, b_2, and b_{11} are significant model terms. For M response, b_1, b_2, b_{12} and b_{11} are significant model terms. *P*-values greater than 0.1 suggest that the model terms are not significant. Both of the predicted R^2 value of 0.9737 and 0.9708 show reasonable agreement with the adjusted R^2 value of 0.9878 and 0.9891 respectively for L and M responses. Adeq precision assesses the signal-to-noise ratio, with a ratio greater than 4 being desirable. With a ratio of 37.576 and 40.852 for each response, the signal is considered adequate and the calculated models can effectively

guide exploration within the design space. All the statistic results of the two models showed that accuracy and general applicability of the second-order polynomial equations, and they were adequate to describe the responses of experiments.

Table 4. Model coefficients and ANOVA results for enzyme extraction experimental designs

	L			M		
	Mean square	*F-value*	*p-value*	*Mean square*	*F-value*	*p-value*
Model	1185.62	200.92	< 0.0001	5862.28	179.17	< 0.0001
R	4432.41	751.14	< 0.0001	26507.34	810.14	< 0.0001
T	155.59	26.37	0.0021	1416.25	43.28	0.0006
R*T	30.90	5.24	0.0621	891.61	27.25	0.0020
R^2	1164.77	197.39	< 0.0001	478.14	14.61	0.0087
T^2	0.0020	0.0003	0.9858	10.76	0.3288	0.5872
R^2		0.9941			0.9933	
Adj. R^2		0.9891			0.9878	
Pred. R^2		0.9708			0.9737	
Adeq Pr		37.5761			40.8523	

In Figure 3, for both enzymatic activities, it is observed that at low liquid-to-solid ratios, the activities are low, and the influence of time is not significant. The values for lipase activity plateau were around 15 U/g dm regardless of the extraction time, when associated with a 3 mL/g dm ratio and around 30 mU/g dm for endo-β-1,4-mannanase activity. However, as the liquid-to-solid ratio increases, the role of time seems to exert a more significant influence, leading to drastically higher enzyme activities. The main difference observed is the emergence of an activity optimum around a ratio of 6.3 mL/g dm for lipase activity, whereas a ratio of 7 mL/g dm yields the most efficient results for endo-β-1,4-mannanase activity. A 55-minutes duration also seems appropriate as the optimal extraction time in both scenarios but an elevated lipase activity can be achieved before this time, around 45 minutes.

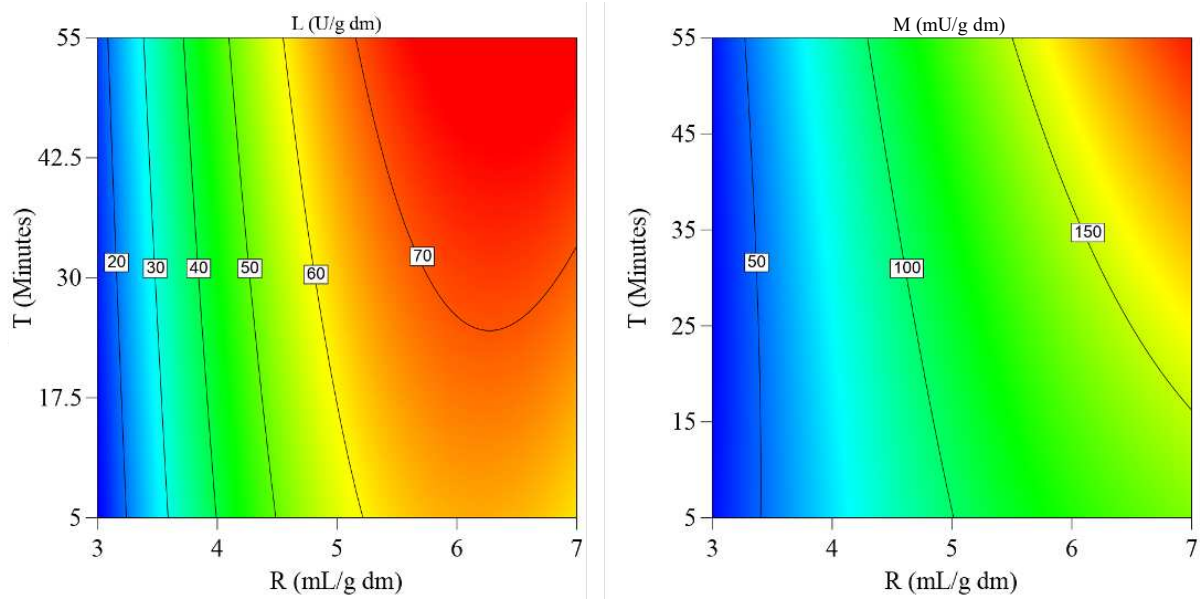

Figure 3. Heat map of lipases activity (L) and endo-β-1,4-mannanase activity (M) responses in function of extraction time (T) and liquid to solid ratio (R)

Quite similar optimal time (60 minutes) had already been observed for the extraction of acid protease produced by *Rhizopus oligosporus* in rice bran at 22°C, under agitation, with a ratio of 10 mL/g dm.[42] Other studies have opted for shorter durations, 30 minutes for the extraction of cellulases produced on coffee husks[36], or between 30 and 50 minutes for the extraction of pectinases produced by *Aspergillus niger* on wheat and soy bran[35], both with a ratio of 5 mL/g dm. Lima and al.[17] found an optimal extraction ratio of β-mannanase produced by *Penicillium citrinum* at 8 mL of extraction buffer per gram of palm residue for tests conducted among three values (3 ; 8 ; 15 mL/g of substrate) at 30 minutes.[17] These conclusions are consistent with the obtained results.

Based on the data analysis, it was chosen for the following experiments to perform the extraction of enzymes produced by the fungus with a liquid-to-solid ratio of 7 mL/g dm and a contact time of 55 minutes. Indeed, the combination of these two conditions results in high or even optimal activities for both responses within the boundaries of the studied design.

3.3. Optimization of enzymes cocktail production through solid-state fermentation

In solid-state fermentation processes, several crucial parameters come into play, significantly influencing the overall outcome. The thickness of the layer of substrate,

particle size, composition, pH, oxygen availability, fermentation duration, inoculum size, temperature and moisture content all contribute to shaping the fermentation dynamics.[43,44] In order to minimize the use of intermediate processes between polyphenol extraction and solid-state fermentation, the decision was made to exclude the particle size study, which would have required substrate sieving. Further supplementation of the medium was not investigated, as coffee grounds already represent a complete substrate and in a context of biowaste valorization, minimizing inputs is preferable.

The duration of fermentation determines the extent of microbial action and product accumulation. Proper moisture content ensures proper microbial growth, enzyme secretion, and mass transfer.[45] Inoculum size influences the initial microbial population and the rate of fermentation initiation [46]. These parameters collectively interact and dictate the success of solid-state fermentation processes, making their careful management pivotal for optimal product yield and quality. The temperature was set to 25°C to ensure optimal fungal growth of *Penicillium* sp.

The plan limits for moisture content, duration and inoculation were partially selected with the support of previous studies that have evaluated these parameters on other or similar substrates, fungi or product enzymes. For moisture content, a minimum of 55% has been chosen to ensure minimal fungal growth. Additionally, these minimum conditions have previously been reported for the production of protease using *Penicillium* sp. on defatted soybean cake.[47] Furthermore, another study focused on lipase production has already investigated conditions ranging from 60 to 70% moisture content on agro-industrial residue using *Penicillium roqueforti*.[22] A comprehensive study investigated the production of β-mannanase by *Penicillium aculeatum* on oilseed residues, using humidity conditions ranging from 40% to 70%, inoculum concentrations ranging from $2x10^4$ to $2x10^7$ spores/g of substrate, and fermentation durations ranging from 2 to 10 days.[48] The limits of the plan were established based on these data.

3.3.1. Model responses and analysis

Optimization studies for the production conditions of enzyme cocktails on SCG were conducted using a design of experiments, as outlined in section 2.7.

The objective was to find optimal culture conditions of *Penicillium* sp. on SCG in terms of lipase, endo-β-1,4-mannanase and endo-β-1,4-glucanase activities. Results obtained after modelling and statistical analysis of the experimental design are presented in Tables 5 (observed and model response for each assay), Table 6 (ANOVA results) and

Figure 4 (surface responses). The experimental maximum and minimum values from the design (Table 5) provide some insights. Indeed, the maxima for glycoside hydrolase (M and G) responses were achieved at a high moisture content level of 75%, at 6 days of fermentation and an inoculum of $5.05x10^6$ spores/g dm (coded values: 1 ; 0 ; 0). In contrast the minima were obtained at a weak moisture content level of 55% at 9 days of fermentation and an inoculum of 10^5 spores/g dm (coded values: -1 ; 1 ; -1). For lipase activity (L), the maximum was reached at average conditions of 65% moisture content, 6 days of fermentation and an inoculum of $5.05x10^6$ spores/g dm (coded values: 0 ; 0 ; 0). The minimum was reached for the lowest parameter values of the experimental design, with moisture content of 55%, 3 days of fermentation and an inoculum of 10^5 spores/g dm (coded values: 1 ; 1 ; 1). The standard deviations from Table 5 provide an insight into the assessment of experimental and model-calculated values.

Table 5. Responses observed and predicted by the model for the 19 assays of enzyme cocktail production experimental design

Assay n°	*Varied parameters (Coded values)*			*L* *U/g dm*		*M* *mU/g dm*		*G* *mU/g dm*	
	H	*D*	*I*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*	*observed*	*predicted*
1	-1	-1	-1	15.37	14.87	316.96	301.22	146.03	149.73
2	1	-1	-1	23.95	22.65	468.04	476.29	220.74	223.09
3	-1	1	-1	36.16	38.07	103.68	102.16	78.11	85.55
4	1	1	-1	47.84	50.64	491.74	489.03	142.63	148.72
5	-1	-1	1	19.70	18.37	450.27	450.52	115.47	110.68
6	1	-1	1	24.10	23.65	844.25	843.32	275.08	268.94
7	-1	1	1	45.18	47.96	251.79	241.09	135.84	134.79
8	1	1	1	56.05	58.03	832.40	845.69	285.27	282.86
9	-1	0	0	51.77	48.89	468.040	495.75	190.18	184.87
10	1	0	0	60.84	57.81	903.49	885.59	295.45	295.58
11	0	-1	0	25.38	28.95	488.78	496.94	193.58	198.46
12	0	1	0	67.21	57.74	396.95	398.59	183.39	173.32
13	0	0	-1	63.53	60.62	411.76	423.47	179.99	160.42
14	0	0	1	69.06	66.07	678.36	676.45	193.578	207.96
15	0	0	0	54.44	62.88	577.64	609.86	210.56	217.38
16	0	0	0	48.72	62.88	586.53	609.86	224.14	217.38
17	0	0	0	64.63	62.88	595.42	609.86	203.76	217.38
18	0	0	0	65.03	62.88	675.40	609.86	227.54	217.38
19	0	0	0	69.77	62.88	633.93	609.86	210.56	217.38
	Std. Dev.			8.60	7.39	40.6	30.88	10.1	12.25

All R^2 and adjusted R^2 values were greater or equal to 0.80 (Table 6), indicating that observed and model results were in good accordance and there was no overestimation of the model due to the number of variables. Predicted R^2 values show a reasonable level of agreement with the Adjusted R^2 values (the difference is less than 0.2) for each calculated model that indicate the model's ability to generalize to new data. Adequacy precision values (higher than 4) reflect an acceptable signal quality. Hence, the models can effectively guide explorations within the design spaces.

Statistical analysis of the data (Table 6) revealed a highly significant model for the three responses with F-value of 11.33, 85.96 and 41.08 for L, M and G responses respectively. The values also indicate a significant influence of the three independent variables (*p-value* < 0.05) for M and G responses. The non-significant terms are the parameters with a *p-value* > 0.1 as interactions terms D*I and M*D for M and G responses respectively. Equations 7, 8, and 9 yield the coefficients for the equations of the three calculated models. Notably, in the case of the two glycoside hydrolase activities (M and G),

humidity emerges as the most influential factor, while for lipase activity (L), fermentation duration takes precedence as the predominant influencing factor.

Table 6. ANOVA analysis of the culture conditions experimental design for the enzyme cocktail production

	L			M			G		
	Mean square	*F-value*	*p-value*	*Mean square*	*F-value*	*p-value*	*Mean square*	*F-value*	*p-value*
Model	618.25	11.33	0.0006	81960.55	85.96	< 0.0001	6160.89	41.08	< 0.0001
M	199.02	3.65	0.0885	3.799E+05	398.45	< 0.0001	30642.55	204.30	< 0.0001
D	2071.91	37.96	0.0002	24180.65	25.36	0.0007	1578.89	10.53	0.0101
I	74.19	1.36	0.2737	1.600E+05	167.79	< 0.0001	5651.27	37.68	0.0002
M*D	11.45	0.2097	0.6578	22430.24	23.52	0.0009	51.90	0.3460	0.5708
M*I	3.12	0.0572	0.8163	23702.63	24.86	0.0008	3604.12	24.03	0.0008
D*I	20.37	0.3731	0.5564	53.75	0.0564	0.8176	3898.22	25.99	0.0006
M^2	248.04	4.54	0.0619	17841.50	18.71	0.0019	1425.97	9.51	0.0131
D^2	1042.86	19.10	0.0018	71798.20	75.30	< 0.0001	2709.89	18.07	0.0021
I^2	0.5847	0.0107	0.9198	9804.57	10.28	0.0107	3010.00	20.07	0.0015
R^2		0.9189			0.9885			0.9762	
Adj. R^2		0.8377			0.9770			0.9525	
Pred. R^2		0.7337			0.9618			0.8643	
Adeq Pr		9.5521			34.9713			23.6393	

The second-order polynomial model for the lipase activity was expressed by Equation 7, for endo-β-1,4-mannanase activity by Equation 8 and for endo-β-1,4-glucanase activity by Equation 9.

(Equation 7) $Y_L = +62.88 + 4.46\ M + 14.39\ D + 2.72\ I + 1.20\ M*D - 0.6247\ M*I + 1.60\ D*I - 9.53\ M^2 - 19.54\ D^2 + 0.4626\ I^2$

(Equation 8) $Y_M = +609.86 + 194.92\ M - 49.17\ D + 126.49\ I + 52.95\ M*D + 54.43\ M*I - 2.59\ D*I + 80.81\ M^2 - 162.10\ D^2 - 59.90\ I^2$

(Equation 9) $Y_G = +217.38 + 55.36\ M - 12.57\ D + 23.77\ I - 2.55\ M*D + 21.23\ M*I + 22.07\ D*I + 22.84\ M^2 - 31.49\ D^2 - 33.19\ I^2$

Regarding the analysis of the response surfaces, it was decided to set the unshown third parameter to maximize the enzyme activities (Figure 4). For L, fixed optimized parameters values were MC: 67.4%, D: 7.2 days, I: 10^7 spores/g dm. For M, MC: 75%,

D: 6 days, I: 10^7 spores/g dm and for G, MC: 75%, D: 6 days, I: $7x10^6$ spores/g dm. Given the shapes of the nine obtained response surfaces, the decision was made to first analyse the lipase activity (L), followed by the activities of the two glycoside hydrolases (G and M). Some coherence is observed in the trends of these two latter responses due to their belonging to the same family: glycoside hydrolase.

L reaches its optimum around a value of 70 U/g dm is achieved with a fermentation duration of approximately 7 days within a moisture content range of 60 to 75% (Figure 4). Among the parameters, I is the least influential; for a fixed fermentation duration of 7.2 days, regardless of MC or I, the activity remains above 50 U/g dm (Figure 4). A study investigating static fermentation conditions on agar medium to achieve optimal lipase activity by *Penicillium roqueforti* has concluded on an optimal fermentation time of 7 days.[49] Similar results were also found for fermentation duration (3.06 U/g dm) with *Penicillium candidum* on wheat bran with a moisture content of 65%, on inoculum of 1×106 spores/g dm, at an incubation temperature of 25°C and extract by distilled water.[50] Another study conducted with this fungus demonstrated an activity of 14.67 U/g on cocoa bran residues at a moisture content of 70%.[22] For a fermentation duration shorter than 4 days, L does not exceed 40 U/g dm, which is almost 2 times lower than the optimal duration of 7.2 days (Figure 4). The obtained values are challenging to compare with the literature, as no prior study has reported on the production of lipases from SCG by *Penicillium* sp. Nevertheless, this substrate has been used (with supplementation of olive oil and glucose) for the production of such enzymes using *Aspergillus aculeatus*.[24] Another study has also demonstrated the feasibility of producing lipases on this substrate using different strains, including *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Paecillomyces variotii*, *Mucor hiemalis* and *Aspergillus foetidus*.[51] The activity values obtained in these studies are higher, but they were not measured using p-NP butyrate, making any comparisons insignificant.

For M and G, the most influential parameter was humidity. Maximum values of around 1000 mU/g dm and 300 mU/g dm were reached for M and G, respectively. In contrast to L, the inoculum played a more significant role (Figure 4). These values were lower than a study in which *Aspergillus niger* F12 was tested for the production of β-mannanase (15.94 U/g dm) and β-glucosidase (3.03 U/g dm) on spent coffee grounds over a 5-day fermentation with 50% moisture content (using Mandels medium) and an inoculum of 10^7 spores/g dm.[52] Both activities were determined using the DNS method

for reducing sugars, but the mannanase activity was measured using locust bean gum as substrate assay. Significantly higher activities have been reported for mannanase production using *Penicillium aculeatum* APS1 (2807 U/g) on palm kernel cake and soybean meal (moisture level 52.25%, incubation time 130 h, inoculum $15x10^7$ spores/g)[48], or with *Penicillium chrysogenum* (8479.82 U/g) on corn cob (moisture content 74.0%, initial pH 4.5, inoculum size 11.6% (v/w), volume of extraction solvent 16.0 ml/g dry substrate, extraction time 108 min).[19] However, various parameters such as substrate supplementation, substrate thickness for solid-state fermentation play significant roles. The activity of endoglucanases has already been the subject of several studies, notably on cocoa shell residue by *Penicillium roqueforti* ATCC10110. The maximum activity was 0.89 U/g dm under the conditions where fermentation time, water activity (a_w), and incubation temperature were 72 h, 0.964 A_w, and 30ºC, respectively.[53] Coffee pulp has previously been utilized as a substrate for the production of endoglucanase by *Penicillium citrinum* under optimized conditions of 6 days with a moisture content of 61.79% and an inoculum of 10^8 spores/g dm.[54] In comparison with other studies, the activities may appear low, but the enzyme activity testing conditions such as temperature and pH have not been optimized. Several examples of optimal conditions for β-mannanases and endoglucanases produced by other *Penicillium* species are provided in Table 7.

Table 7. Enzymes from *Penicillium* and their associated optimal conditions

Enzymes	Organisms	Temperature (°C)	pH	References
β-mannanase	*Penicillium aculeatum*	65	6	[48]
β-mannanase	*Penicillium occitanis*	40	4	[16]
β-mannanase	*Penicillium italicum*	70 and 100	5	[18].
Endoglucanase	*Penicillium roqueforti*	50	5	[53]
Endoglucanase	*Penicillium* sp.	60	4.2	[55]
Endoglucanase	*Penicillium citrinum*	60	5.5	[54]

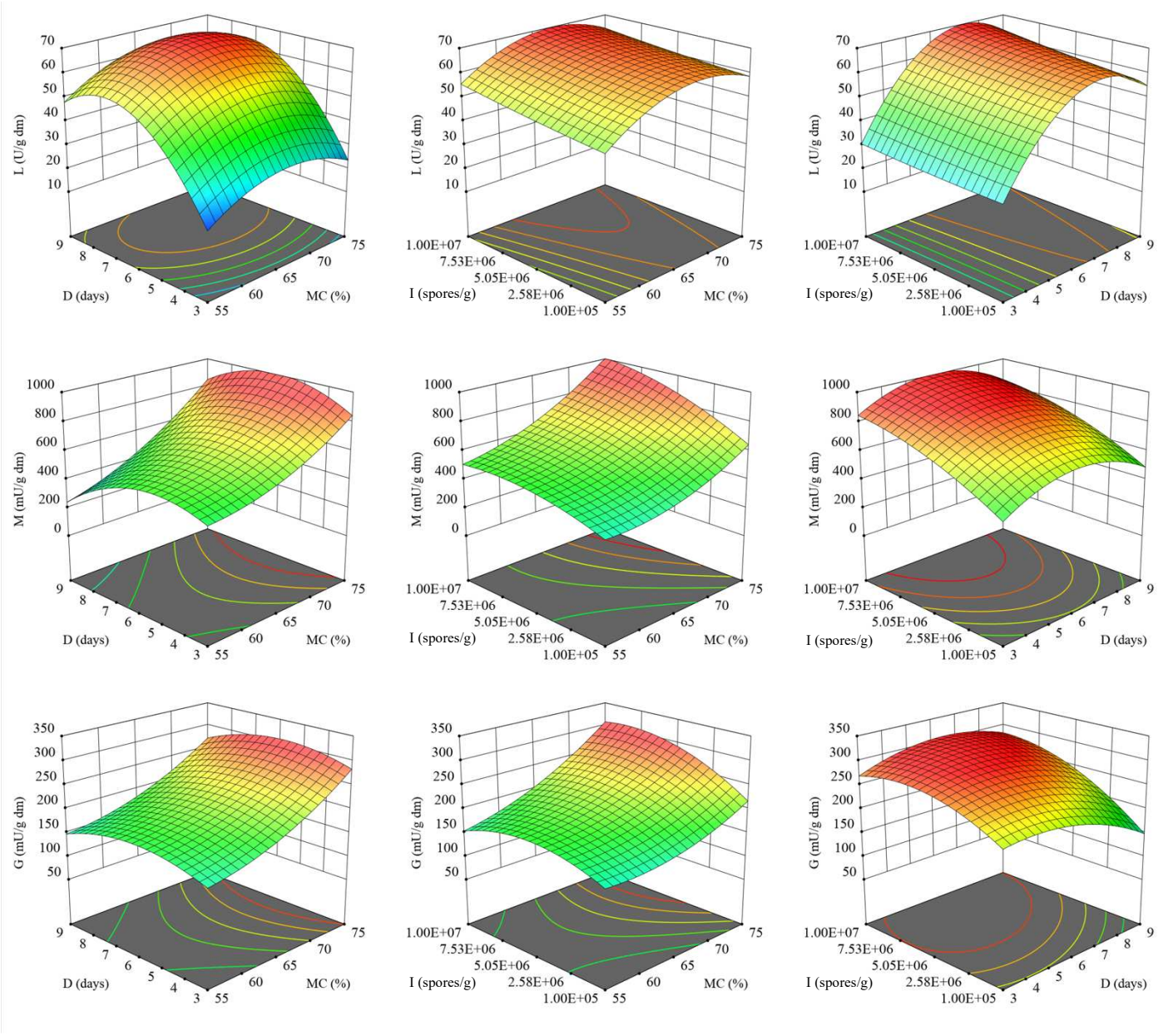

Figure 4. Three-dimensional response surfaces plot of the central composite design experiment

The numerical resolution of the equations to maximize the production of the three enzymes led to the identification of optimal conditions to implement. Four solutions were determined, all having an equal desirability level of 0.972 (Table 8). According to the results, it appears that a correct approximation of the three optimal parameters was MC: 74.1%, D: 7.1 days and I: 10^7 spores/g dm.

Table 8. Results of optimization on the cocktail combining the three potential maximum activities

N°	M (%)	D (Days)	I (Spores/g dm)	L	M	G
1	74.170	7.161	9999950.508	65.261	947.516	295.457
2	74.160	7.140	9999476.811	65.259	947.979	295.456
3	74.184	7.189	9999353.135	65.259	946.873	295.458
4	74.148	7.114	9999837.014	65.255	948.564	295.458

In comparison with other studies, the activities may appear low, but the enzyme activity testing conditions such as temperature, buffer, reaction time, and pH have not been optimized.

4. Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first documented instance of the current optimization of production and extraction of lipase, β-mannanase, and endoglucanase by the *Penicillium* sp. strain on spent coffee grounds. This substrate has demonstrated its suitability for efficient enzyme production. The utilization of this cost-effective and readily available substrate for enzyme production by *Penicillium* sp., along with distilled water as the solvent for enzyme extraction, holds the potential to further curtail production expenses. The statistical methodologies employed in this study have also demonstrated their efficacy in optimizing both production and extraction conditions for these enzymes. Moreover, the findings underscored the strain's ability to efficiently utilize the substrate and synthesize the requisite enzymes for this purpose. Carbon and lipid sources played a crucial role in initiating enzyme production, thereby facilitating fungal growth through this mechanism.[24] It's worth noting that the optimal conditions for glycoside hydrolase activity differed from those for lipase activity. For industrial processing of enzyme cocktail, the optimal solid-to-liquid ratio should be chosen based on the specific intended use of the extract. When no additional concentration steps are planned, concentrated enzyme extracts are more desirable.[38] Employing minimal solvent volumes for cocktail enzyme retrieval significantly decreases energy needs, equipment dimensions, and environmental impact.[56]

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors thanks GECCO company for the kind providing of spent coffee grounds. This work was financed by French Region Hauts-de-France, I-SITE ULNE program and GECCO company.

References

1 G. D. Gebreeyessus, Science of The Total Environment, 2022, 833, 155113.
2 C. Kourmentza, Ch. N. Economou, P. Tsafrakidou and M. Kornaros, Journal of Cleaner Production, 2018, 172, 980–992.
3 R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H. A. Vergara-Castañeda and B. D. Oomah, Trends in Food Science & Technology, 2015, 45, 24–36.
4 M. Beaudor, P. Vauchel, D. Pradal, A. Aljawish and V. Phalip, Chemical Engineering and Processing - Process Intensification, 2023, 188, 109358.
5 A. S. Caballero-Galván, D. L. Restrepo-Serna, M. Ortiz-Sánchez and C. A. Cardona-Alzate, Waste Biomass Valor, 2018, 9, 2381–2389.
6 S. I. Mussatto, L. F. Ballesteros, S. Martins and J. A. Teixeira, Separation and Purification Technology, 2011, 83, 173–179.
7 Y.-F. Shang, J.-L. Xu, W.-J. Lee and B.-H. Um, South African Journal of Botany, 2017, 109, 75–80.
8 N. Solomakou, A. Loukri, P. Tsafrakidou, A.-M. Michaelidou, I. Mourtzinos and A. M. Goula, Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2022, 25, 100592.
9 J. Santana-Gálvez, L. Cisneros-Zevallos and D. A. Jacobo-Velázquez, Molecules, 2017, 22, 358.
10 K.-H. Lee, H.-K. Do, D.-Y. Kim and W. Kim, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021, 583, 22–28.
11 N. B. Rathod, N. Elabed, S. Punia, F. Ozogul, S.-K. Kim and J. M. Rocha, Plants, 2023, 12, 1217.
12 T. Jooste, M. P. García-Aparicio, M. Brienzo, W. H. van Zyl and J. F. Görgens, Appl Biochem Biotechnol, 2013, 169, 2248–2262.
13 J. Simões, F. M. Nunes, M. R. Domingues and M. A. Coimbra, Carbohydrate Polymers, 2013, 97, 81–89.
14 J. Simões, A. S. P. Moreira, C. P. Passos, F. M. Nunes, M. R. M. Domingues and M. A. Coimbra, in Coffee, ed. A. Farah, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2019, pp.

445–457.
15 L. R. S. Moreira and E. X. F. Filho, Appl Microbiol Biotechnol, 2008, 79, 165–178.
16 M. Blibech, R. E. Ghorbel, I. Fakhfakh, P. Ntarima, K. Piens, A. B. Bacha and S. Ellouz Chaabouni, Appl Biochem Biotechnol, 2010, 160, 1227–1240.
17 A. C. Lima, D. Silva, V. Silva, M. Godoy, M. Cammarota and M. Gutarra, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2021, 96, 2744–2754.
18 O. O. Olaniyi, D. J. Arotupin, B. J. Akinyele and O. S. Bamidele, Microbiology Research Journal International, 2014, 1092–1104.
19 H. Zhang and Q. Sang, Biochemical Engineering Journal, 2015, 97, 101–110.
20 S. Steudler, A. Werner and T. Walther, in Solid State Fermentation: Research and Industrial Applications, eds. S. Steudler, A. Werner and J. J. Cheng, Springer International Publishing, Cham, 2019, pp. 51–81.
21 A. Messaoudi, H. Belguith, I. Gram and J. B. Hamida, AJB, 2010, 9, 8243–8247.
22 S. C. Araujo, M. R. M. F. Ramos, E. L. do Espírito Santo, L. H. S. de Menezes, M. S. de Carvalho, I. M. de C. Tavares, M. Franco and J. R. de Oliveira, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022, 52, 325–330.
23 L. H. S. Menezes, M. R. M. F. Ramos, S. C. Araujo, E. L. do E. Santo, P. C. Oliveira, I. M. de C. Tavares, P. H. Santos, M. Franco and J. R. de Oliveira, Preparative Biochemistry & Biotechnology, 2022, 52, 885–893.
24 A. Yuliyanti, M. Manullang and M. Ilmi, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 948, 012055.
25 U. Hölker, M. Höfer and J. Lenz, Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64, 175–186.
26 J. M. Vicaria, O. Herrera-Márquez, M. Serrano-Haro, A. Vidal, E. Jurado and J. L. Jiménez-Pérez, Chemical Engineering Science, 2022, 260, 117858.
27 D. Duijsens, S. Gwala, A. P. Pallares, K. Pälchen, M. Hendrickx and T. Grauwet, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2021, 20, 5067–5096.
28 A. Torres-Pitarch, D. Hermans, E. G. Manzanilla, J. Bindelle, N. Everaert, Y. Beckers, D. Torrallardona, G. Bruggeman, G. E. Gardiner and P. G. Lawlor, Animal Feed Science and Technology, 2017, 233, 145–159.
29 N. A. Dierick, J. A. Decuypere, K. Molly, E. Van Beek and E. Vanderbeke, Livestock Production Science, 2002, 76, 1–16.
30 G. Granados-Guzman, R. Salazar-Aranda, M. Garza-Tapia, R. Castro-Rios and N. Waksman de Torres, CAC, 2017, 13, 499–507.
31 U. K. Winkler and M. Stuckmann, J Bacteriol, 1979, 138, 663–670.
32 G. L. Miller, Anal. Chem., 1959, 31, 426–428.
33 J. Goupy, Revue MODULAD.
34 T. Rakić, I. Kasagić-Vujanović, M. Jovanović, B. Jančić-Stojanović and D. Ivanović, Analytical Letters, 2014, 47, 1334–1347.
35 L. R. Castilho, R. A. Medronho and T. L. M. Alves, Bioresource Technology, 2000, 71, 45–50.
36 M. Marín, A. Sánchez and A. Artola, Journal of Cleaner Production, 2019, 209, 937–946.
37 H. A. B. Wösten, Current Opinion in Biotechnology, 2019, 59, 65–70.

38 R. D. P. B. Pirota, L. S. Miotto, P. S. Delabona and C. S. Farinas, Braz. J. Chem. Eng., 2013, 30, 117–123.

39 A. B. Díaz, I. Caro, I. de Ory and A. Blandino, Enzyme and Microbial Technology, 2007, 41, 302–306.

40 M. Marín, A. Artola and A. Sánchez, Waste Biomass Valor, 2019, 10, 2761–2772.

41 Marín, Sanchis, Sáenz, Ramos, Vinas, and Magan, Journal of Applied Microbiology, 1998, 84, 25–36.

42 L. Ikasari and D. A. Mitchell, Enzyme and Microbial Technology, 1996, 19, 171–175.

43 S. Bhargav, B. P. Panda, M. Ali and S. Javed, Chem. Biochem. Eng. Q.

44 B. K. Lonsane, 1985.

45 A. Durand, Biofutur, 1998, 1998, 41–43.

46 H. Chen, Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice, Springer Netherlands, Dordrecht, 2013.

47 S. Germano, A. Pandey, C. A. Osaku, S. N. Rocha and C. R. Soccol, Enzyme and Microbial Technology, 2003, 32, 246–251.

48 P. Bangoria, J. Divecha and A. R. Shah, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2021, 34, 102023.

49 R. R. Eitenmiller, J. R. Vakil and K. M. Shahani, Journal of Food Science, 1970, 35, 130–133.

50 A. Alhelli, A. S. Meor Hussin, H. Mirhosseini, A. Mohammed, N. Khairullah Mohammed and E. Khalil, 2019.

51 E. D. S. França, A. F. Souza, D. G. D. L. Lemos, U. M. D. B. L. Lins, G. M. D. Campos-Takaki, C. A. A. D. Silva and M. A. B. D. Lima, RSD, 2022, 11, e36011427515.

52 C. P. Favaro, I. J. Baraldi, F. P. Casciatori and C. S. Farinas, Biomolecules, 2020, 10, 227.

53 P. C. Oliveira, A. R. de-Brito, A. B. Pimentel, G. A. Soares, C. S. V. Pacheco, N. B. Santana, E. G. P. da-Silva, A. G. de-A.-Fernandes, M. L. O. Ferreira, J. R. Oliveira, M. Franco, and State University of Southwest Bahia, Rev.Mex.Ing.Quim., 2018, 18, 777–787.

54 L. Amaya-Delgado, A. Calixto-Romo, K. Guillén-Navarro, J. Sánchez and M. Peña-Maravilla, RMIQ, 2017, 16, 757–769.

55 P. S. Santa-Rosa, A. L. Souza, R. A. Roque, E. V. Andrade, S. Astolfi-Filho, A. J. Mota and C. G. Nunes-Silva, Electronic Journal of Biotechnology, 2018, 31, 84–92.

56 D. N. Adhyaru, N. S. Bhatt and H. A. Modi, Bioresour. Bioprocess., 2015, 2, 3.

5. Complément d'étude sur les extraits obtenus

Des études complémentaires ont été entreprises pour mieux caractériser les enzymes produites par *Penicillium* sp. en fermentation solide sur le marc de café appauvri. En effet, le marc de café a été soumis à une extraction éthanolique assistée par ultrasons de ses composés phénoliques dans les conditions optimisées au chapitre 1. Les analyses ont été réalisées sur le marc de café appauvri après fermentation dans les conditions suivantes : humidité de 74%, 7 jours de fermentation à 25°C avec un inoculum de 10^7 spores/g de matière sèche.

Une analyse protéomique par chromatographie liquide haute et ultra haute performance couplée à de la spectrométrie de masse en tandem (H(U)PLC-MS/MS) et à une analyse bio-informatique ont étésemployées afin d'obtenir une compréhension qualitative de l'ensemble des protéines produites par le champignon sur le marc. Puis, plusieurs tests d'activité ont été exécutés pour établir quantitativement la production des enzymes dans les conditions optimales préalablement définies pour la création d'extraits hydrolytiques actifs.

5.1. La caractérisation des extraits par H(U)PLC-MS/MS

Les extraits ont été caractérisés d'un point de vue analytique grâce à la combinaison de techniques séparatives (HPLC et UPLC en phase inverse (RP)) et de la spectrométrie de masse simple (MS) et en tandem (MS/MS) comme outil de caractérisation moléculaire. Les données de spectrométrie de masse obtenues ont été confrontées, par l'intermédiaire de logiciels bio-informatiques dédiés, aux bases de données biochimiques de protéines (UniprotKB) afin d'identifier les protéines générées. Deux phases de caractérisation par HPLC et UPLC ont été menées. Une première en HPLC-ESI-Q/TOF puis une complémentaire en nano-UPLC-ESI-ORBITRAP. De cette manière, une couverture, la plus exhaustive possible du paysage protéique produit a pu être déterminée.

5.1.1. Préparation des échantillons par réduction, alkylation et digestion tryspique

Les protéines précipitées (partie 3.1.4 de ce chapitre) ont été reprises dans du bicarbonate d'ammonium à 25 mM, réduites (5 mM de dithiothréitol, 5 minutes à 80°C), alkylées (10 mM d'iodoacétamide, 20 minutes à 20°C), puis digérées par un mélange de trypsine/Lys-C à une concentration de 3 ng/µL pendant 19 heures à 37°C. Ensuite, la solution a été centrifugée

pendant 10 minutes à 8 000 × *g*. Le culot a été éliminé et les surnageants ont été soumis à une analyse HPLC-MS/MS et UPLC-MS/MS.

5.1.2. Séparation des peptides et caractérisation des peptides par HPLC-ESI-Q/TOF

Les peptides générés par l'hydrolyse enzymatique (réalisée par la trypsine) ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC). Dix µL ont été traités par RP-HPLC à l'aide d'un système de chromatographie biocompatible ACQUITY (Waters) équipé d'une colonne analytique C18 (150 × 2,6 mm, taille des particules 3 µm, Interchim). L'élution des peptides a été effectuée à 30°C avec un débit de 0,5 $mL.min^{-1}$ en utilisant deux solvants : le solvant A était composé de 99,9% d'eau ultrapure et de 0,1% d'acide formique (FA), et le solvant B de 99,9% d'acétonitrile (ACN) et de 0,1% de FA. Un gradient d'élution apolaire a été utilisé : de 5% de solvant B à 40% de solvant B pendant 45 minutes, suivi de procédures de lavage et d'équilibration de la colonne avec 100% et 5% de solvant B pendant 5 minutes, respectivement. Les peptides ont ensuite été ionisés dans la source d'ionisation électrospray du QTof Synapt G2-Si™ (Waters). L'analyse MS a été réalisée en mode sensibilité, en ions positifs et en mode d'analyse dépendante des données (DDA). La température de la source a été réglée à 150°C, et les tensions de capillaire et de cône ont été réglées à 3 000 et 60 V, respectivement. Les mesures MS et MS/MS ont été effectuées dans une plage de masse/charge (m/z) fixée entre 50 et 2 000 m/z avec un temps de balayage de 0,2 s. Un maximum de 10 ions précurseurs avec un seuil d'intensité de 10 000 ont été sélectionnés pour la fragmentation par dissociation induite par collision (CID) avec des tensions spécifiées allant de 8 à 9 V et de 40 à 90 V pour les ions de masse moléculaire faible inférieure et ceux de masse moléculaire élevée, respectivement. La leucine enképhaline a été injectée dans le système toutes les 2 minutes pendant 0,5 seconde pour suivre et corriger l'erreur de mesure pendant toute la durée de l'analyse. L'analyse RP-HPLC-MS/MS a été effectuée en duplicat.

5.1.3. Séparation des peptides et caractérisation par nano-UPLC-ESI-ORBITRAP

La préparation de peptides a été déssalée à l'aide d'un dispositif Millipore® ZipTips C18 (Millipore). La phase C18 a été lavée avec 100% d'ACN puis équilibrée avec 0,1% d'acide trifluoroacétique (TFA). Les peptides contenant 0,1% de TFA ont été liés aux pointes de pipette

ZipTipC18 (10 cycles d'aspiration/refoulement dans chaque tube), qui ont ensuite été lavées cinq fois avec 10 µL de 0,1% de TFA (aspiration/refoulement) pour éliminer les matériaux non liés, et l'élution a été réalisée deux fois avec 10 µL d'acétonitrile à 50%. Les éluats ont été séchés et dissous dans 20 µL de solution d'acétonitrile / acide formique (2% / 0,1%) (bain à ultrasons pendant 5 minutes). Les échantillons ont été séparés à un débit de 300 nL/min, par un système chromatographique en phase inverse en ligne (système UPLC Easy-nLC 1000, Thermo Scientific, Waltham, États-Unis) équipé d'une colonne de capture Proxeon (diamètre interne de 100 µm x 2 cm, Thermo Scientific) et d'une colonne capillaire de remplissage C18 (Acclaim PepMap 100 C18, diamètre interne de 75 µm x 50 cm, Thermo Scientific). L'éluant LC a été ionisé par électrospray directement depuis la colonne analytique et une tension de 1,7 kV a été appliquée via la jonction liquide de la source de nanospray. Le système chromatographique a été connecté à un spectromètre de masse Q Exactive (Thermo Scientific) réglé pour acquérir un top 10 MS^2 en mode dépendant des données. Les scans de l'analyse ont été effectués à un pouvoir de résolution de 70 000 FWHM (m/z 400), en mode positif et en utilisant une cible de contrôle automatique par gain de 5e6. La charge par défaut a été réglée à 2, les états de charge non attribués et +1 ont été rejetés et l'exclusion dynamique a été activée pendant 20 secondes. La plage de balayage a été réglée sur 300-1600 m/z. Pour le $ddMS^2$, la plage de balayage était comprise entre 200 et 2 000 m/z, un microscan a été acquis à 17 500 FWHM et une fenêtre d'isolement de 4,0 m/z a été utilisée.

5.1.4. Retraitement bio-informatique des données de spectrométrie de masse

Le retraitement des données de spectrométrie de masse et les recherches en banque de données ont été effectués via le logiciel PEAKS® Studio XPro (Bioinformatics Solutions Inc.) en utilisant la base de données UniProtKB limitée au protéome complet de l'organisme *Penicillium* (11 avril 2023). Une tolérance en masse de 35 ppm pour les ions parents et une tolérance MS/MS de 0,2 Da ont été autorisées. Les recherches d'identité de peptides ont été effectuées en notifiant le choix de la trypsine comme enzyme et en autorisant trois sites de coupure manqués. L'oxydation variable de la méthionine a également été prise en compte. La pertinence des identités de protéines et de peptides a été évaluée en fonction de leur score d'identification PEAKS® Studio (taux de faux positifs (FDR) < 1%).

5.2. Résultats de l'analyse

Le traitement des données protéiques a conduit à l'identification de 408 peptides correspondants à 21 protéines, ainsi que de 978 peptides correspondants à 44 protéines dans la base de données UniProtKB pour le genre *Penicillium*, pour les échantillons soumis respectivement à l'analyse par HPLC-ESI-Q/TOF et à l'analyse par nanoUPLC-ESI-ORBITRAP (Tableau 15). Toutes les protéines identifiées par HPLC-ESI-Q/TOF ont aussi été identifiées par nanoUPLC-ESI-ORBITRAP ce qui a permis de présenter dans le tableau les protéines communes aux deux méthodes en haut et en bas les protéines supplémentaires identifiées par nanoUPLC-ESI-ORBITRAP (Tableau 2). La classification enzymatique, le groupe d'appartenance, le numéro d'accession ainsi que la masse moléculaire ont été rapportés en rapprochant les données des bases Uniprot et Cazy (Carbohydrate-Active enZYmes Database). Le score du logiciel Peaks Studio a permis d'évaluer la qualité et la confiance des identifications de peptides et de protéines dans les analyses protéomiques menées. Plus ce score est élevé, plus l'attribution du peptide au spectre de fragmentation est fiable et de haute qualité. Le taux de couverture de séquence peut être employé pour évaluer la proportion de la séquence protéique qui est couverte par les peptides que nous avons identifiés. Plus la couverture est élevée, plus il y a de peptides identifiés couvrant la protéine totale. Le nombre de peptides identifiés correspond au nombre total de fragments peptidiques identifiés qui sont attribués à une protéine. Cependant, ce chiffre peut inclure des occurrences répétées du même peptide pour plusieurs séquences protéiques différentes (tels que des isoformes). En revanche, le nombre de peptides uniques identifiés correspond au nombre de peptides issus uniquement de la protéine identifiée. Plus ce nombre est élevé, plus la probabilité de présence effective de cette protéine dans l'échantillon est élevée.

Tableau 15. Liste des protéines identifiées par HPLC-ESI-Q/TOF et nano-UPLC-ESI-ORBITRAP. Le trait de séparation indique les identifications supplémentaires ajoutées grâce à l'analyse des données de l'ULPC

Nomenclature EC	Groupe	Description	Accession	Masse Moléculaire (Dalton)	Score Peaks (-10lgP)	Couverture (%)	Peptides	Peptides uniques
EC 3.4.23.20	A1	Penicillopepsin	A0A0G4PIX9	40882	277,88	63	64	10
	G1	Peptidase (eqolisin)	A0A0G4NZJ2	28262	190,13	37	20	4
EC 3.2.1.22	GH27	α-galactosidase	A0A0G4PPG1	48082	168,67	24	12	2
	S53/S8	Proteinase inhibitor propeptide	A0A1V6QSJ9	69127	133,89	17	6	6
EC 4.6.1.19		Ribonuclease T2	A0A0G4PQ82	27895	131,27	35	5	5
EC 3.2.1.4	GH5	Endo-1,4-β-glucanase	A0A0G4NSX0	36316	126,81	30	6	6
EC 3.2.1.3	GH15	Glucoamylase	A0A1V6QI42	67619	119,94	16	6	2
	G1	Aspergillopepsin-2	A0A1Q5TE21	28851	116,86	5	7	7
EC 3.2.1.78	GH5	Endo-β-1,4-mannanase	A0A0G4PLX1	45686	108,82	24	5	5
EC 1.1.3.-		Gulonolactone oxidase	A0A1V6R9S1	59855	99,39	11	4	2
		Histidine phosphatase	A0A0G4PMR4	57911	83,11	7	3	2
EC 3.2.1.-	GH43	Exo-arabinanase	A0A7T7BIQ2	41454	65,73	9	2	2
EC 3.4.16.-	S10	Carboxypeptidase (serine protéase)	A0A0G4P3P5	56937	64,44	7	2	2
EC 3.1.4.3	PLC	Phospholipase C	A0A0G4PWZ0	37603	62,54	7	2	2
		Leucine rich repeat 5	A0A0A2IC98	40999	54,84	7	3	2
EC 3.2.1.17	GH25	Lysozyme	A0A0M8PB99	23810	67,18	16	3	2
EC 3.1.1.3		Lipase secreted	A0A1V6RPZ2	49399	80,45	20	5	3
EC 3.2.1.80	GH32	Exo-inulinase	A0A1V6QPY4	73759	94,93	8	3	3
	S28	Peptidase	A0A0M8P6Y1	61685	121,6	19	9	5
EC 3.2.1.39	GH17	Glucan-1,3-β-glucosidase	A0A0G4PJW8	48754	151,32	11	4	4
EC 2.7.7.19		β-polymerase (PolyA)	A0A0G4PV73	66550	54,12	1	2	2
EC 3.2.1.8	GH10	Endo-1,4-β-xylanase	Q9P8J1	35351	171,25	19	8	3
EC 4.2.2.10	PL1	Pectin lyase	A0A0G4PAV6	52795	218,28	22	9	9

Nomenclature EC	Groupe	Description	Accession	Masse Moléculaire (Dalton)	Score Peaks (-10lgP)	Couverture (%)	Peptides	Peptides uniques
EC 4.2.2.-	PL-	Pectin_lyase_fold	W6QE41	103935	120,75	5	3	3
EC 3.2.1.21	GH3	β-glucosidase	A0A0G4NUY3	94363	106,32	6	5	5
EC 4.2.2.-	PL-	Polysaccharide lyase	A0A1V6N7V5	28138	198,86	39	10	10
EC 3.4.-.-	M28	Peptide hydrolase	A0A1V6RJ64	52897	163,7	17	7	7
EC 3.2.1.15	GH28	Endo-polygalacturonases (pectinase)	Q9UR16	37897	154,23	21	7	7
EC 3.5.1.4		Amidase	A0A0A2LDN0	62865	129,56	10	5	5
EC 3.2.-.-	GH16	Glycosidase	A0A0G4PKN6	43691	123,21	11	3	3
EC 3.2.1.113	GH47	α-1,2-Mannosidase	A0A1V6NDC1	56528	121,09	10	4	4
EC 3.2.1.14	GH18	Chitinase	A0A0G4NZ17	43704	120,91	16	5	2
EC 3.4.16.-	S10	Carboxypeptidase (serine protease)	A0A0G4PQL0	67854	114,4	7	2	2
		Ferritin	A0A0G4P3K2	25228	113,86	23	5	5
EC 3.1.1.11	CE8	Pectinesterase	A0A0G4P3G9	195045	113,3	3	5	2
EC 3.1.1.31		6-phosphogluconolactonase	A0A1V6QRP7	43319	107,96	10	3	3
		Cupin	A0A101M8Z0	55849	98,53	9	4	4
EC 1.10.3.2		Laccase	A0A1V6QV24	65268	96,63	4	2	2
EC 3.4.16.1	S10	Peptidase (serine carboxypeptidase)	A0A0G4PI70	62317	95,79	5	2	2
EC 3.5.1.2		Glutaminase GtaA	W6Q6C3	75772	93,44	6	3	3
EC 2.4.1.-	GH72	1,3-β-glucanosyltransferase	A0A0G4PPS4	57114	92,4	9	4	4
EC 3.2.1.99	GH43	Arabinan endo-1,5-α-L-arabinanase	A0A0G4PDA3	35816	91,51	8	2	2
EC 3.2.1.103	GH16	Endo-1,3-β-glucanase	A0A1V6P447	61374	90,47	11	4	4
	A1	Peptidase (aspartic peptidase)	A0A0G4NVC8	51610	88,41	4	2	2
EC 5.1.3.3		Aldose 1-/Glucose-6-phosphate 1-epimerase	A0A0A2L6F9	45136	86,79	8	3	3

NB : la nomenclature a été relevée à l'aide des bases de données Cazy et Uniprot

Une vaste majorité des enzymes identifiées appartiennent à la catégorie des glycosides hydrolases. Parmi elles, on peut citer une variété d'enzymes telles qu'une α-galactosidase, une endo-1,4-β-glucanase, une exo-arabinanase, une endo-β-1,4-mannanase, une exo-inulinase, une endo-1,3-β-glucanase, une endo-1,4-β-xylanase, une β-glucosidase, une endo-polygalacturonase, une glycosidase, une α-1,2-mannosidase, une chitinase, une arabinan-endo-1,5-α-L-arabinanase et une endo-1,3-β-glucanase. *Penicillium* sp. a démontré sa capacité à synthétiser ces enzymes lorsqu'il est cultivé sur marc de café ayant subi une extraction préalable de ses composés phénoliques. Parmi les enzymes mentionnées, des exemples marquants incluent l'endo-β-1,4-mannanase et l'endo-1,3-β-glucanase, qui ont respectivement contribuées aux activités mannanase et CMCase mesurées dans les sections 3 et 4 de ce chapitre. De plus, une endo-1,4-β-xylanase a également été identifiée, et elle est à l'origine de l'activité xylanase évaluée dans la section 3 de ce chapitre. L'ensemble de ces enzymes a permis au champignon de dégrader efficacement les fibres complexes constituant le substrat (décrites dans la section 1 de la bibliographie) et ainsi, de libérer les sucres nécessaires à sa croissance. Par ailleurs, d'autres enzymes ont également été associées à des activités mesurées, telles qu'une lipase et plusieurs protéases (penicillopepsin, peptidase G1, peptidase S28, carboxypeptidase) responsables respectivement de l'activité lipase (décrite dans les sections 3 et 4 de ce chapitre) et de l'activité protéase (décrite dans la section 3 de ce chapitre). De nombreux champignons libèrent des acides organiques pour acidifier l'environnement tout en sécrétant des enzymes qui sont actives de manière optimale dans ces conditions. Traditionnellement, les peptidases fongiques à action acidifiante étaient classées dans la famille des protéases aspartiques et la penicillopepsin de l'espèce *Penicillium* en fait partie (O'Donoghue et al., 2008). Cette enzyme a obtenu le score le plus élevé (277,88) indiquant donc potentiellement une abondance dans les extraits comparé aux autres enzymes identifiées.

On remarque aussi la présence dans le cocktail extrait de nombreuses autres enzymes intéressantes comme une phospholipase de type C qui clive les phospholipides en produisant de l'inositol triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG). Cette enzyme montre une application dans le dégommage de certains pétroles bruts (Jiang et al., 2015). La présence d'une endo-polygalacturonase, également connue sous le nom de pectinase, est relevée. Ces

enzymes jouent un rôle de premier plan dans l'industrie alimentaire, spécifiquement dans les étapes cruciales d'extraction et de clarification des jus de fruits (S. Haile & Ayele, 2022).

Afin de faire le lien avec l'étude protéomique, il est également pertinent d'évaluer des activités liées à la présence de ces enzymes dans l'extrait obtenu à la suite de la fermentation solide, réalisée dans les conditions optimales identifiées à la section 4 pour la production d'un cocktail hydrolytique (c'est-à-dire une humidité de 74%, une fermentation de 7 jours à 25°C avec un inoculum de 10^7 spores/g de matière sèche). L'activité protéase a été mesurée avec de l'azo caséine comme substrat (voir méthode section 3 de ce chapitre). Les autres activités de glycoside hydrolase ont été mesurées avec du xylan birchwood (Sigma Aldrich) et pectin from citrus fruit (Sigma Aldrich) avec la méthode au DNS décrite dans la section 3 pour respectivement l'activité protéase, endo-1,4-β-xylanase et l'activité endo-polygalacturonase. Les activités obtenues ont été 56,4 U/g, 625,9 mU/g et 856,2 mU/g respectivement pour l'activité protéase, xylanase et pectinase. Les enzymes responsables de ces activités hydrolytiques notables peuvent être considérées comme bien représentées dans les extraits avec des scores Peaks relativement élevés (> 100), un taux de couverture important (> 19%) et un nombre de peptides uniques supérieur à 5.

Les protéines qui ont été identifiées proviennent principalement de deux organismes cibles présents dans la base de données Uniprot de *Penicillium* : *Penicillium camemberti* et *Penicillium solitum*. L'identification phénotypique permet de soutenir l'hypothèse que le *Penicillium* sélectionné pourrait correspondre à *Penicillium solitum*. De plus, dans la section 2 de ce chapitre, l'analyse des régions ITS1 et ITS4 a révélé un score d'alignement remarquablement élevé de 944 avec un taux de recouvrement de 98% pour cette souche en particulier. Cependant, il est important de noter qu'il existe certaines protéines identifiées à la fois en HPLC et en UPLC qui pourraient ne pas appartenir à cette espèce spécifique. Ceci suggère la possibilité d'un manque de données exhaustives sur les séquences qui sont en jeu dans les bases de données existantes.

6. Conclusion

Ce chapitre a permis d'aborder différents aspects de la production d'enzymes par fermentation solide à partir d'un champignon endogène au marc de café (*Penicillium solitum*) déjà identifié par une autre étude sur ce substrat avant torréfaction (Silva et al., 2008).

Une première étape de criblage a été réalisée pour isoler une souche de champignon parmi une quarantaine, capable de produire des enzymes hydrolytiques après extraction de composés phénoliques. Les résultats des tests effectués ont révélé que la souche PEN1 (*Penicillium solitum*) sélectionnée présentait des activités enzymatiques significatives (Tableau 3). Ces enzymes jouent un rôle prépondérant sur le marché mondial des enzymes, tant individuellement que lorsqu'elles sont utilisées en combinaison, comme le souligne la section 4.6.4 de l'étude bibliographique, et elles trouvent une utilisation croissante dans divers secteurs industriels. Concernant les hémicellulases, Il existe un large éventail d'applications industrielles sous leur forme purifiée ou sous forme de cocktails comme dans les aliments pour la clarification de jus (Adigüzel & Tunçer, 2016; Adiguzel et al., 2016; Zhao et al., 2020), la production de produits de fermentation comme le bioéthanol à partir de biomasses variées (Shukor et al., 2016; Taherzadeh & Karimi, 2007; Zhang & Sang, 2015), ou la supplémentation de la nourriture pour bétail (Dierick et al., 2002; Torres-Pitarch et al., 2017). Les protéases, elles, sont utilisées dans différents secteurs d'activité comme dans des détergents, elles sont utiles pour éliminer les taches comprenant des protéines au même titre que les lipases pour les taches de gras (Contesini et al., 2018).

Les conditions d'extraction et de fermentation de certaines enzymes produites par la souche sélectionnée sur le marc de café, préalablement traité par une extraction assistée par ultrasons réduisant de 84% ses composés phénoliques, ont été optimisées. L'extraction a été réalisée avec un ratio liquide-solide de 7 mL/g de matière sèche et un temps de contact de 55 minutes. Le modèle a calculé des conditions de fermentation optimales, notamment une humidité de 74,1% sur une durée de 7 jours et un inoculum de 10^7 spores/g, démontrant ainsi une forte capacité de production d'activité enzymatique (Tableau 3).

Enfin, la caractérisation par HPLC-ESI-Q/TOF puis par nanoUPLC-ESI-ORBITRAP du cocktail enzymatique produit lors de la fermentation dans les conditions optimales obtenues

précédemment ont permis d'identifier beaucoup d'enzymes à haut potentiel de valorisation. Les activités corrélées à la présence de ces autres enzymes ont aussi été mesurées afin de compléter l'éventail d'activité du cocktail. Une estimation de la souche isolée ayant permis d'obtenir ces résultats est *Penicillium solitum.*

Tableau 16. Récapitulatif des activités enzymatiques mesurées en fonction des conditions de fermentation et d'extraction mises en place

Activité	Criblage	Optimisation extraction	Optimisation fermentation
Conditions fermentation	M : 0,5 g H : 60%, D : 5 jours I : 10^6 sprores/g	M : 5 g H : 60%, D : 9 jours I : 5x10^6 sprores/g	M : 5 g H :74.1%, D : 7,1 jours I : 10^7 sprores/g
Conditions extraction	R : 5 mL/g T : 30 minutes	R : 7 mL/g T : 55 minutes	R : 7 mL/g T : 55 minutes
Lipase (U/g)	46,67	76,86	67,86
Protéase (U/g)	39,94	-	56,40
Mannanase (mU/g)	482,34	198,39	1023,52
Xylanase (mU/g)	99,56	-	625,90
Endoglucanase (mU/g)	185,43	-	289,95
Pectinase (mU/g)	-	-	856,20

NB : M = masse de marc sec ; H = humidité ; D = durée de fermentation ; I = inoculum ; R = ratio liquide-solide ; T = temps d'extraction

Dans la littérature, (Cai & Yang, 2023) avait déjà évoqué la difficulté de trouver une souche microbienne capable de produire un cocktail enzymatique contenant non seulement de la lipase, mais aussi de la protéase acide, de la xylanase, de la glucanase, de la pectinase, et de la cellulase, spécifique au substrat pour la fermentation en phase solide.

Afin de pouvoir optimiser au mieux la mise en œuvre du cocktail obtenu, les conditions de pH et de température pourraient faire l'objet d'une perspective intéressante.

Chapitre 3 : Étude de l'impact du stockage du marc sur l'obtention des composés d'intérêt

1. Introduction

Ce chapitre a pour objectif de caractériser les transformations occasionnées par les conditions de stockage sur le marc de café et d'établir une comparaison de l'application de la cascade sur deux marcs ayant subi un vieillissement différent. Le marc de café utilisé dans les travaux des chapitres 1 et 2 a été fourni par l'entreprise partenaire Gecco. Actuellement, cette entreprise fait valoriser ce marc auprès de la société Ecovalim qui le mélange avec des sciures de bois et le comprime pour former des bûches de chauffage. Le marc de café est stocké dans des bacs de récupération placés dans un entrepôt, pendant plusieurs mois sur le site de Gecco jusqu'à ce qu'une quantité suffisante soit atteinte pour un transport vers son lieu de transformation (généralement 1 à 6 mois). Les études menées dans les chapitres 1 et 2 ont été réalisées sur un échantillon d'un des lots destinés à cette valorisation. Ce lot a donc subi un vieillissement lié au stockage (Figure 37). Les conditions de stockage favorisent la dégradation et la transformation de divers composés en raison de la croissance de souches microbiennes, qu'elles soient fongiques ou bactériennes, du fait de la nature humide du substrat. De fait, on peut observer le développement de moisissures. En fonction de la profondeur, la couleur, donc la nature des moisissures, est différente. En surface, la colonisation est totale avec une majorité de moisissures de couleur blanchâtre et verdâtre. En profondeur, les moisissures sont de couleur plutôt jaunâtre et moins visibles.

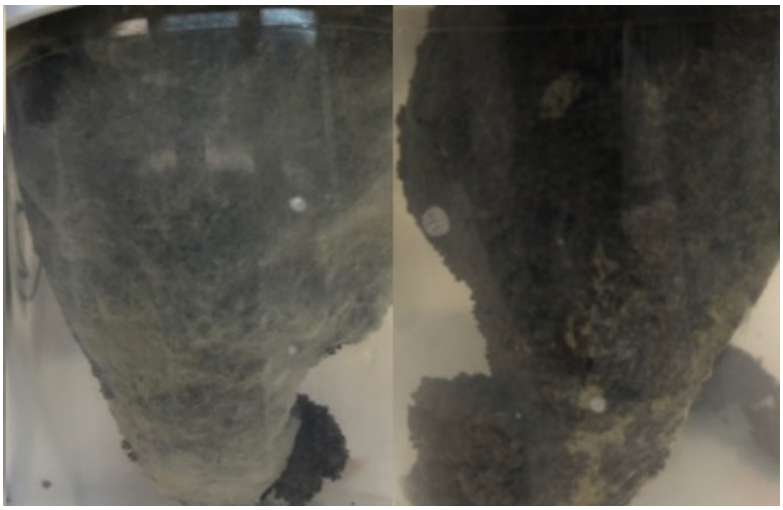

Figure 37. Marc humide provenant de la société Gecco ayant été stocké pendant 1 à 6 mois. De gauche à droite : zone en surface, zone profonde

Après avoir validé la cascade de valorisation (chapitres 1 et 2), il est maintenant intéressant d'envisager l'étude de l'utilisation d'un marc de café frais, n'ayant pas subi ce vieillissement, dans le but d'évaluer l'impact du stockage sur les produits générés. Pour cela, dans un premier temps, nous allons comparer les performances de l'extraction assistée par ultrasons sur un marc frais et caractériser la composition des extraits obtenus en composés phénoliques. Dans un deuxième temps, la cascade de valorisation complète va être appliquée sur le marc frais avec l'utilisation de *Penicillium solitum* en fermentation solide pour la production d'enzymes. L'objectif est de statuer sur une approche industrielle pour la valorisation en cascade définie dans le cadre de la thèse avant une éventuelle montée en échelle.

2. Description des marcs de café utilisés

2.1. Le marc de l'entreprise Gecco

Comme mentionné précédemment, le marc de café provenant de l'entreprise Gecco est un mélange de différents types de café *Arabica* et *Robusta*, principalement collecté dans des bars, des restaurants et des cafés de la région Hauts-de-France. Ce marc collecté sous forme humide, a été mélangé pour obtenir un échantillon homogène des différents marcs collectés, puis séché pour obtenir le marc qui a été utilisé au cours de la thèse. Avant d'être séché, ce marc a été conservé pendant une période allant de 1 à 6 mois sur le site de Gecco. Cela a donné à de nombreux organismes le temps de consommer et/ou de libérer de nombreux composés qui peuvent éventuellement impacter les étapes de valorisation envisagées. Par exemple, au cours de ce travail de thèse, plus de 40 champignons filamenteux ont été identifiés comme colonisateurs de ce substrat humide.

2.2. Le marc frais

Un marc de café frais, provenant du laboratoire, a été utilisé pour comparaison. Il provient de l'utilisation de dosettes variées (*Arabica*, *Robusta*, mix des deux) adaptées à la machine à café (SENSEO® Original Plus) et a été soumis aux mêmes conditions de séchage (séché dans un déshydrateur alimentaire à air forcé (Food Dehydrator, Excalibur) à 40°C pendant 12 heures) afin d'atteindre un taux de matière sèche similaire au marc de Gecco (plus de 95%).

Le séchage a été effectué moins de 12 heures après la récupération du marc de café afin d'éviter sa dégradation.

3. L'extraction des polyphénols de deux marcs différents

3.1. Comparaison de la composition des extraits obtenus par extraction assistée par ultrasons

L'extraction des composants phénoliques des marcs a été réalisée dans les conditions optimales définies en fin de chapitre 1, à savoir : solvant eau-éthanol (50-50 ; v/v), ratio liquide-solide de 40 mL/g MS et une puissance des ultrasons de 400 W sur une durée de 10 minutes. Les extraits ont ensuite été caractérisés en termes de polyphénols totaux, d'activité antioxydante (ABTS), de protéines et de sucres réducteurs.

3.1.1. Matériel et méthode pour l'étude comparative des deux marcs

Les extractions assistées par ultrasons ont été réalisées avec le même extracteur que celui utilisé dans le chapitre 1 (SINAPTEC, Ultrasonic Lab750). Les extraits ont été centrifugés 10 min à 4800 x *g* et filtrés à 0,2 µm sur membrane PES (polyéthersulfone). Les tests colorimétriques concernant le dosage des polyphénols au réactif de Folin-Ciocalteu, de l'activité antioxydante à l'ABTS ont été effectués dans les mêmes conditions que celles décrites au chapitre 1.

Le protocole de dosage des sucres réducteurs à l'aide de la méthode du DNS en microplaque a été mis en place pour permettre une évaluation des concentrations de sucres réducteurs dans un échantillon. Une solution de DNS est préparée avec 1 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique ajouté à 100 mL d'eau distillée, suivi de 30 g de tartrate de sodium potassium et 20 mL de soude NaOH 2M. Une gamme de concentrations est réalisée à l'aide d'un sucre de référence (ici le glucose) (10 ; 5 ; 2,5 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,1 ; 0 g/L). Dans une plaque PCR, 60 µL de la gamme, du blanc ou de l'échantillon sont ajoutés, suivi de 120 µL de la solution DNS. La plaque est ensuite chauffée à 95°C pendant 5 minutes, puis une minute de refroidissement est effectuée dans de la glace. Dans une microplaque à 96 puits, 160 µL d'eau distillée sont ajoutés dans chaque puits, et 40 µL du mélange provenant de la plaque PCR sont ajoutés dans trois puits distincts pour effectuer des triplicats. Enfin, une agitation de trois secondes est

effectuée avant la lecture des absorbances à 540 nm. Les concentrations ont été calculées en se référant à la droite étalon d'équation y = 0,2542x - 0,009 (R^2 = 0,9982).

Pour le dosage des protéines, un réactif commercial de Bradford a été utilisé ainsi qu'une gamme de concentrations de sérum albumine bovine (BSA) pour établir une référence (125 ; 100 ; 50 ; 25 ; 0 µg / mL). Dans les puits d'une microplaque 96 puits, 50 µL des échantillons à tester, de la gamme de concentrations ou du blanc (eau distillée) sont déposés, suivi de l'ajout de 150 µL du réactif de Bradford dans chaque puits. Cette étape est suivie par une période d'incubation de 5 à 10 minutes pour permettre une réaction complète entre les protéines et le réactif de Bradford. Enfin, la lecture des absorbances est effectuée à une longueur d'onde de 595 nm. Les concentrations ont été calculées en se référant à la droite étalon d'équation y = 0,0034x + 0,0086 (R^2 = 0,9981).

3.1.2. Séparation, identification et quantification des composés phénoliques

Les extraits filtrés ont été analysés par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) couplée à un spectromètre de masse haute résolution doté d'un analyseur de masse type quadrupôle-temps de vol (Q/TOF) équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) (MaXis Impact II, Bruker Daltonics). Cinq µL ont été traités par RP-HPLC à l'aide d'un système de chromatographie (HPLC Ultimate 3000, Thermo Scientific) équipé d'une colonne analytique F5 (Kinetex, 150 × 2,1 mm, taille des particules 2,6 µm, Phenomenex) et l'élution des molécules a été effectuée à 30°C à un débit d'analyse de 0,4 mL/min selon le gradient de solvant A (H_2O contenant 0,1% (v/v) AF) et de solvant B (MeOH contenant 0,1% (v/v) AF) suivant : 20% B pendant 2 min, 20 à 80% de B pendant 13 min, 80% de B pendant 3 min, 80 à 100% de B pendant 5 min, 100 à 20% de B pendant 12 min et 20% de B pendant 3 min. Les analyses MS ont été effectuées en mode négatif. La tension du capillaire a été fixée à 2,5 kV avec une température de désolvatation de 200°C et un débit de gaz de séchage de 7 L/min. La pression du nébuliseur était de 31 psi. Toutes les données de masse ont été collectées, transformées et analysées à l'aide du logiciel Compass DataAnalysis (v.4.0, Bruker Daltonics).

Les différents standards utilisés pour procéder à l'identification des composés phénoliques extraits du marc de café ont été les acides caféoylquiniques (5-CQA, 4-CQA, 3-

CQA) et dicaféoylquinique (1,3-diCQA, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5-diCQA) ainsi que l'acide caféique, l'acide férulique, l'acide p-coumarique et l'acide vanillique. Les acides chlorogéniques ont été fournis par Chengdu Biopurify Phytochemicals, les autres par Sigma-Aldrich. Ces composés sont les principaux composés phénoliques habituellement retrouvés dans le marc de café (S. Angeloni et al., 2020). Les chromatogrammes obtenus pour les standards utilisés à une concentration de 0,1 mM sont affichés de manière superposée par rapport à leur temps d'élution sur la Figure 38. Les droites de calibrations permettant de calculer la concentration de chaque composé ont été réalisées à l'aide de dilutions allant de 100 à 0 µM (100 ; 50 ; 25 ; 12,5 ; 6,25 ; 3,125 ; 0 µM).

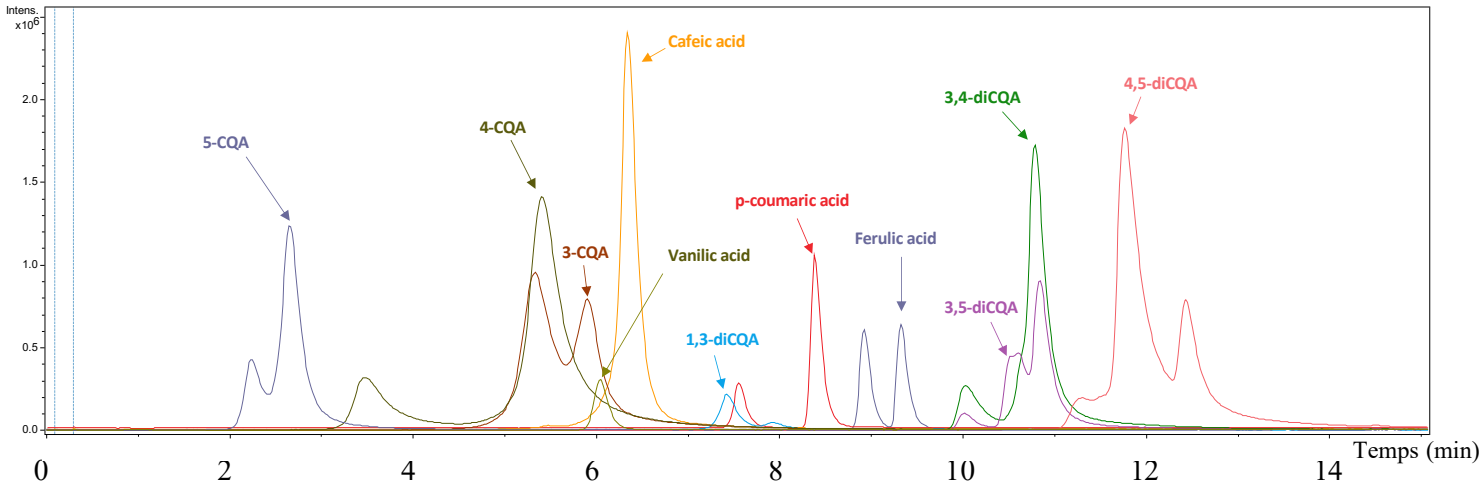

Figure 38. Superposition des chromatogrammes des 11 standards utilisés (C = 0,1mM)

3.1.3. Composition des extraits après extraction assistée par ultrasons

Nous avons comparé la composition des extraits obtenus avec les deux marcs café. Une augmentation moyenne de 12% des polyphénols totaux extraits est observée à partir du marc de café frais (Tableau 17) par rapport au marc provenant de l'entreprise Gecco, ainsi qu'une augmentation moyenne d'environ 22% de l'activité antioxydante mesurée par l'ABTS. Ces différences peuvent être attribuées à divers paramètres tels que l'origine du café ou encore le degré de torréfaction des grains.

Tableau 17. Polyphénols totaux, activités antioxydantes, sucres et protéines mesurés dans les extraits obtenus après extraction assistée par ultrasons sur les deux marcs

	Gecco	Frais
TPC (mg GAE/g)	11,5 ± 0,3	12,9 ± 0,9
AA (µmol TE/g)	63,5 ± 1,9	77,9 ± 2,2
Sucres (mg/g)	57,9 ± 1,8	1,8 ± 0,3
Protéines (mg/g)	10,3 ± 0,5	12,8 ± 0,4

NB : TPC = total polyphenol content ; AA = activité antioxydante

Une étude menée par (Zuorro & Lavecchia, 2012) a comparé les polyphénols totaux extraits entre un marc de café provenant de plusieurs bars de la ville de Rome et un marc de café provenant de capsules. Une différence d'environ 20% a été observée en faveur du marc de café provenant des capsules. Selon les auteurs, cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les capsules utilisées dans cette étude contenaient du café pur *Arabica*, tandis que les bars à café utilisent généralement des mélanges de grains *Arabica* et *Robusta*. Une autre étude menée par (Vignoli et al., 2011), portant sur la différence en polyphénols totaux et en activité antioxydante entre les grains de café *Arabica* et *Robusta*, a révélé un taux plus élevé de 45% en activité antioxydante (mesurée par l'ABTS) et de 24% pour les polyphénols totaux en faveur du café *Arabica*. De même, le degré de torréfaction joue un rôle crucial dans la teneur finale en polyphénols du café, avec une réduction d'environ 60% des polyphénols pour un marc ayant subi une torréfaction de 21 minutes par rapport à une torréfaction de 3 minutes (Mestanza et al., 2023). Les différences observées dans la littérature étant plus importantes que dans notre étude, il apparait difficile de conclure sur l'impact d'un vieillissement lié aux conditions de stockage donnant lieu aux différences de valeurs observées pour les polyphénols totaux et l'activité antioxydante. Au vu de l'hétérogénéité des marcs (mélange *Arabica*/*Robusta* provenant de divers horizons et ayant subi des torréfactions différentes, ces différences peuvent très bien être dues à d'autres paramètres que le stockage.

Concernant les protéines, on observe une différence moyenne de +24% en faveur du marc frais par rapport au marc de Gecco. Cette différence peut être attribuée à l'origine du café, au degré de torréfaction et à la méthode d'extraction, tout comme c'est le cas pour les polyphénols totaux. Une étude menée par (Lago et al., 2001) sur trois marcs de café provenant

de trois entreprises a mis en évidence des différences notables dans leur composition en protéines, allant jusqu'à 35%. Nous pouvons donc conclure que la concentration en protéines extraites ne semble pas être un indicateur significatif de la différence entre deux marcs ayant été soumis à des conditions de stockage différentes.

En revanche, la concentration en sucres dans l'extrait est nettement supérieure pour le marc de Gecco par rapport au marc frais, avec respectivement 57,9 mg contre 1,8 mg de sucres réducteurs par gramme de marc. Il apparaît que la colonisation, visible à l'œil nu, par divers micro-organismes du marc humide stocké à l'air libre pendant plusieurs mois sur le site de Gecco, a permis l'hydrolyse des fibres présentes dans le marc. Ces sucres peuvent être séparés et faire l'objet de multiples valorisations par le biais de fermentations liquides par exemple. En effet, de nombreuses publications ont déjà étudié l'hydrolyse acide et/ou enzymatique du marc de café, pour la récupération de sucres (jusqu'à 0,3 g/g de marc) (Battista et al., 2021; Mussatto, 2006; Mussatto, Carneiro, et al., 2011) et par la suite la production de bioéthanol avec l'utilisation de levures (Mussatto et al., 2012).

3.1.4. Nature des composés phénoliques

La quantité de composés phénoliques totaux est légèrement différente dans les deux marcs de café. Nous avons souhaité savoir si les molécules extraites étaient les mêmes. La Figure 39 présente les chromatogrammes obtenus pour les extraits issus du marc de Gecco et du marc frais. On observe des différences importantes. Les composés phénoliques attendus et sélectionnés comme standards (11 molécules) sont élués au cours des 15 premières minutes de la séparation chromatographique. Les standards ont été choisis en se basant sur les études menées par (S. Angeloni et al., 2020; Schrader et al., 1996). On retrouve la plupart de ces composés dans le marc de café frais, tandis qu'ils sont quasiment absents dans le marc provenant de la société Gecco. Le Tableau 2 liste pour chacun des deux marcs les composés identifiés par leur rapport masse sur charge (m/z) et leur temps de rétention.

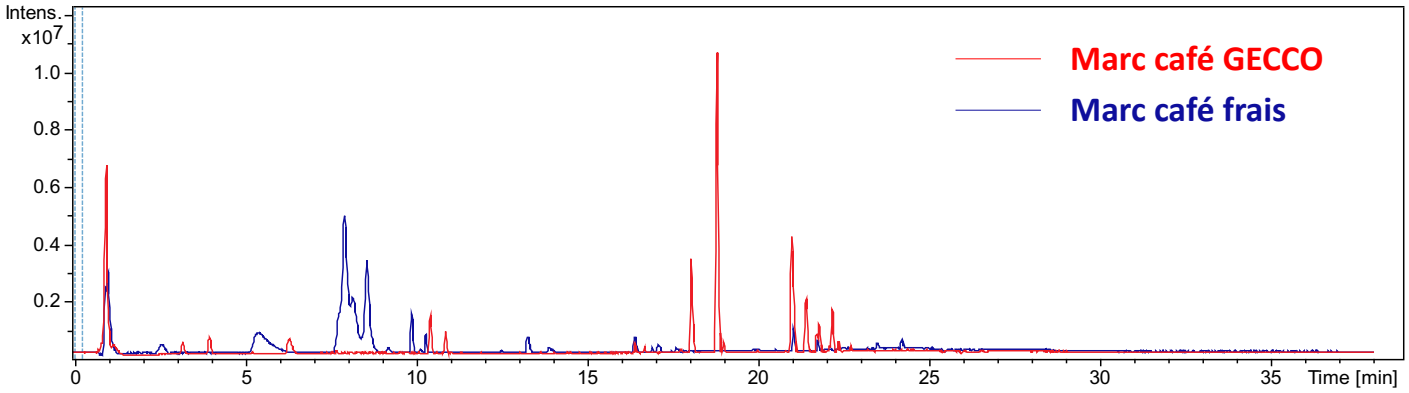

Figure 39. Superposition des deux chromatogrammes obtenus pour le marc de café frais et le marc de Gecco

Les composés majoritaires sont similaires entre le marc de l'étude préalablement citée (S. Angeloni et al., 2020) et le marc de café frais de notre étude. En revanche, aucun acide chlorogénique n'a été détecté dans l'extrait obtenu à partir du marc de Gecco, alors que les acides 5-CQA et 3-CQA sont présents dans l'extrait du marc de café frais, avec des concentrations respectives de 4,28 et 5,86 mg/g (Tableau 18). L'acide caféique est le composé phénolique prédominant dans le marc de Gecco, avec une concentration de 1,28 mg/g. Une explication possible serait une dégradation des acides (di)chlorogéniques, comportant un (ou 2) acide(s) caféique(s), qui se serai(en)t dissocié(s) de l'acide quinique. On remarque aussi la présence d'acide 3,5-diCQA dans l'extrait du marc frais et d'acide *p*-coumarique dans le marc de la société Gecco. Le seul composé phénolique commun entre ces deux extraits est l'acide férulique en concentration trois fois supérieure dans le marc de Gecco. Certains composés comme le 4-CQA, le 1,3-diCQA, le 3,4-diCQA et le 4,5-diCQA n'ont pas été détectés.

Tableau 18. Composés phénoliques identifiés dans chacun des deux marcs de café

Molécules	Temps de rétention (min)	m/z	Frais	Gecco	(S. Angeloni et al., 2020)
			C (mg/g)	C (mg/g)	C (mg/g)
5-CQA	2,7	353.0951	4,28	-	1,18
4-CQA	5,5	353.0951	-	-	-
3-CQA	≈ 5,8	353.0951	5,86	-	0,4
1,3-diCQA	7,5	515.1268	-	-	-
3,4-diCQA	11,8	515.1268	-	-	-
4,5-diCQA	≈ 12	515.1268	-	-	-
3,5-diCQA	≈ 10,9	515.1268	0,37	-	0,1
Ac vanilique	6.1	167.0422	-	-	traces
Ac *p*-coumarique	8,4	163.0473	-	0,04	traces
Ac ferulique	8,9 et 9,3	193.0579	0,18	0,48	traces
Ac caféique	6,4	179.0422	-	1,28	0,01

NB : C = concentration ; m/z = masse/nombre de charges ; traces : valeur < 0,001 ; Ac : acide

Au-delà de la différence observée sur la présence des acides chlorogéniques (jusqu'à 15 minutes d'élution), comme notifié précédemment, on remarque que de nombreux composants uniquement présents dans l'extrait obtenu avec le marc de Gecco, ont été élués après 15 minutes de séparation (Figure 39). Ces composants ont été élués plus tardivement avec une haute résolution, indiquant une affinité élevée pour la colonne utilisée. Cette colonne étant notamment employée pour la séparation de cycles aromatiques, il est possible que ces composés puissent en être.

3.2. Simulation d'un stockage du marc frais humide avec la croissance d'un champignon filamenteux avant extraction des composés phénoliques

Afin de vérifier si la colonisation du marc par des champignons du fait des conditions de stockage peut influencer l'extraction des polyphénols totaux, une simulation de vieillissement sur le marc frais a été réalisée avec *Penicillium solitum*. Nous espérons ainsi mimer la différence constatée entre le marc GECCO et le marc frais.

Dans la littérature, une étude a suggéré que l'utilisation de certains champignons, tels que *Aspergillus niger*, *Aspergillus ustus*, *Mucor* sp., *Penicillium purpurogenum* et *Neurospora crassa*, pourrait faciliter la libération de ces composés (Machado et al., 2012). Dans cette étude, environ 40% (7 mg GAE/g) des polyphénols totaux présents dans le marc de café ont été libérés/récupérés après 6 jours de colonisation avec le champignon *P. purpurogenum*.

3.2.1. Conditions de fermentation fongiques sur le marc frais

Un triplicat de fermentation menée avec *Penicillium solitum* sur du marc frais a été étudié en comparaison avec un marc frais stérile non inoculé. Brièvement, 5 g de marc frais humidifié à 70% avec de l'eau déminéralisée ont été autoclavés dans des Erlenmeyers de 50 mL avant d'être inoculés ou non par 10^6 spores/g de marc. La souche utilisée a été celle isolée et sélectionnée au chapitre 2, *Penicillium solitum.* La fermentation a duré 7 jours à une température de 25°C. Après ce délai, des extractions eau-éthanol 50-50 (v/v) pour un ratio liquide-solide de 20 mL/g de marc ont été réalisées à température ambiante pendant une heure sous agitation magnétique (l'extraction conventionnelle a été choisie par contrainte technique). Les extraits ont ensuite été soumis à un dosage des polyphénols totaux et à une mesure de l'activité antioxydante par l'ABTS.

3.2.2. Mesure des polyphénols totaux et de l'activité antioxydante

Les polyphénols totaux mesurés après extraction ont été de 9,7 ± 0,1 mg GAE/g contre 10,6 ± 0,2 mg GAE/g pour respectivement le marc frais ayant subi une fermentation et le marc frais témoin sans inoculation. Concernant l'activité antioxydante des extraits, une diminution a été observée passant de 64,8 ± 0,29 à 58,8 ± 0,43 µmol Trolox/g marc frais quand le marc a subi une fermentation. Ces variations sont très légères et sont cohérentes avec une étude

s'intéressant à l'extraction des polyphénols de la pulpe de café *Arabica* après fermentation ou non avec *Aspergillus tamarii* de (Arellano-González et al., 2011).

3.2.3. Composition des extraits en composés phénoliques

Entre le marc frais et le marc ayant supporté la croissance du champignon, on constate une disparition totale des composés phénoliques majoritairement présents dans l'extrait du marc frais à savoir les acides chlorogéniques (avant 15 min d'élution, Figure 40). De plus, on remarque l'apparition de plusieurs pics ayant des temps de rétention similaires (après 15 minutes d'élution) à certains déjà observés dans l'extrait du marc provenant de la société Gecco. Notez que du fait de l'affichage, certains pics ne sont pas visibles sur les chromatogrammes (les pics apparaissant après 15 minutes écrasent les autres du fait de leur intensité).

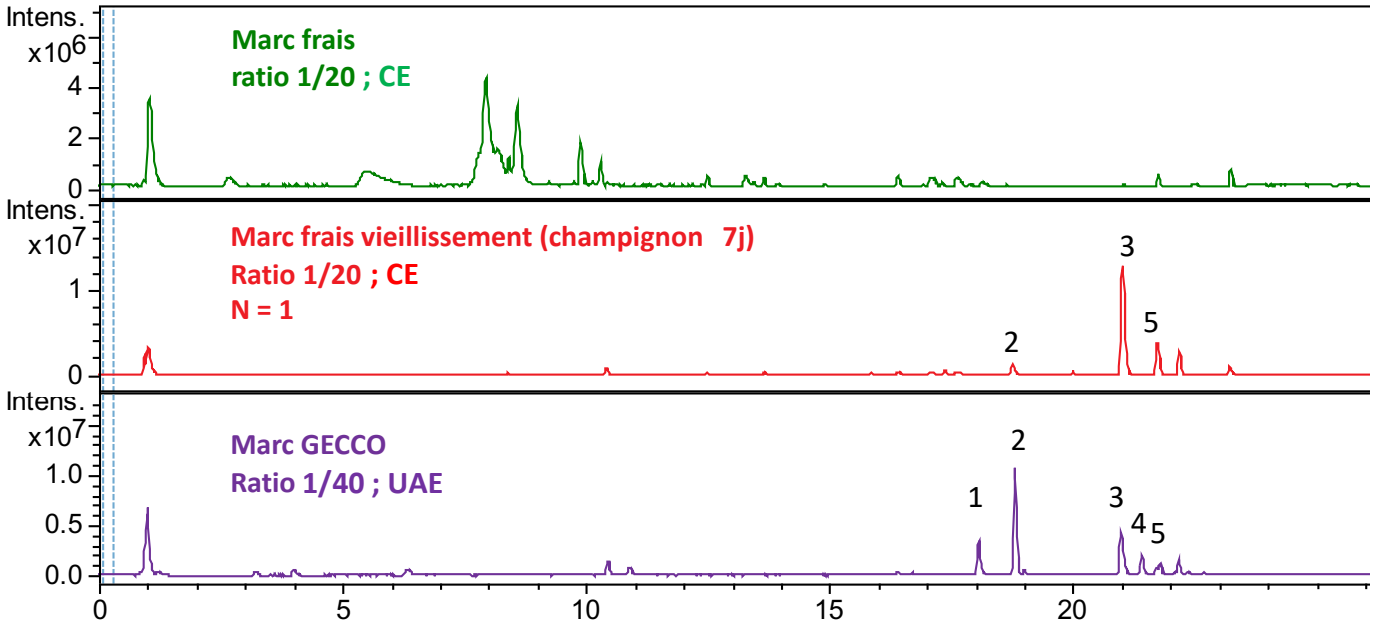

Figure 40. Chromatogrammes des composés phénoliques extraits des différents marcs de café

Les identifications présentées dans le Tableau 19 ont été obtenues par recherche des m/z associés aux temps de rétention des différents standards sur le logiciel de traitement de données Compass DataAnalysis.

Les concentrations en certains composés sont en effet drastiquement réduites après colonisation du marc par le champignon : passant de 2,67 mg/g à 0,06 pour le 3-CQA, de 2,4 mg/g à 0 mg/g pour le 5-CQA et de 0,34 mg/g à une concentration < 0,01 mg/g pour le 3,5-diCQA. On observe également une absence de l'acide férulique, déjà très faiblement présent chez le marc frais. Cependant, l'apparition d'acide caféique (0,35 mg/g) laisse à penser que les acides chlorogéniques, étant des esters de l'acide caféique et de l'acide (L)-quinique, ont été dégradés ou transformés.

Tableau 19. Composés phénoliques identifiés avant et après simulation de vieillissement, comparaison avec le marc de Gecco

Molécules	Temps de rétention (min)	m/z	Frais 1/20 CE C (mg/g)	Frais après FMS 1/20 CE C (mg/g)	Gecco 1/40 UAE C (mg/g)
5-CQA	2,7	353,0951	2,67	0,06	-
3-CQA	~5,8	353,0951	2,4	-	-
3,5-diCQA	~10,9	515,1268	0,34	traces	-
Ac *p*-coumarique	8,4	163,0473	-	-	0,04
Ac ferulique	8,9 et 9,3	193,0579	0,03	-	0,48
Ac caféique	6,4	179,0422	-	0,35	1,28

NB : C = concentration ; m/z = masse/nombre de charges ; traces : valeur < 0,001 ; Ac : acide

Il semble cohérent de conclure qu'il y a eu une transformation des composés phénoliques par le champignon inoculé en d'autres composés responsables de l'activité antioxydante. Donc, les conditions de stockage prolongé d'un marc humide susceptible d'être colonisé par des champignons peuvent entraîner des transformations de ses composés phénoliques. De plus, les composés identifiés rappellent ceux du marc de Gecco avec l'absence d'acides chlorogéniques et la présence de composés phénoliques simples comme l'acide caféique. On peut également émettre l'hypothèse que d'autres composés non identifiés, absents du chromatogramme de l'extrait du marc inoculé par *Penicillium solitum*, mais présents sur le chromatogramme du marc Gecco, pourraient résulter de transformations induites par d'autres champignons colonisateurs provenant de l'environnement de stockage.

Les valeurs de m/z et de temps de rétention sont fournies à titre indicatif pour les différents composés inconnus (Figure 40, Tableau 20). Ces valeurs ne permettent pas une identification immédiate des composés correspondants. Cependant, l'utilisation de bases de données ou le recours à la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) pourraient potentiellement permettre une identification.

Tableau 20. Données chromatographiques des composés non identifiés du marc de Gecco et du marc frais vieillis (Figure 40)

	1	2	3	4	5
m/z	297,24	299,26	279,23	255,23	281,25
Temps de rétention (min)	18	19,8	21	21,4	21,8

NB : m/z = masses/nombre de charges

De nombreuses hypothèses peuvent être formulées sur les biotransformations des composés phénoliques opérées par les différentes enzymes produites par des micro-organismes ayant la capacité de coloniser le marc de café (Tinikul et al., 2018). Chez *Penicillium solitum,* de nombreuses enzymes peuvent avoir induit des modifications par le biais de réactions d'estérification, de décarboxylation, d'amination, d'halogénation, d'hydroxylation et de rupture de cycle sur les composés phénoliques normalement retrouvés dans le marc de café (comme les acides chlorogéniques) (Figure 41). Les enzymes de *Penicillium solitum* identifiées au chapitre 2 possiblement responsables de catalyser ces différentes réactions sont les glycosidases, les amidases, les estérases, les lipases (Murota et al., 2018). On remarque que les m/z des composés inconnus sont plus faibles que ceux des acides chlorogéniques du marc de café (Tableau 19, Tableau 20). Cette information permet de formuler l'hypothèse que les réactions opérées sont susceptibles d'être des pertes de fonctions.

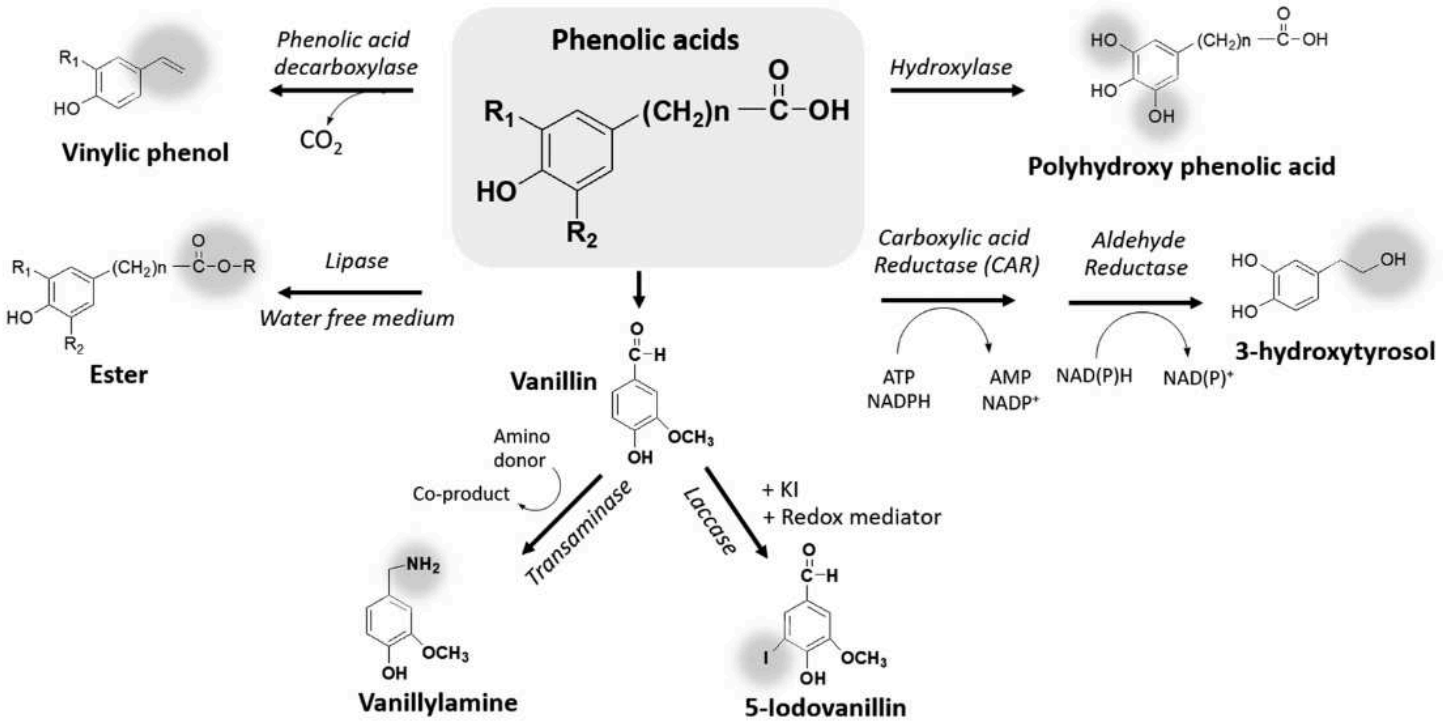

Figure 41. Exemples de biotransformations des composés phénoliques d'origine végétale par diverses réactions enzymatiques. Figure tirée de (Tinikul et al., 2018)

Ces composés dérivés des acides chlorogéniques du marc de café peuvent répondre positivement aux différents tests d'activité antioxydante. Ceci expliquerait que l'activité mesurée n'est que légèrement modifiée pour le marc de Gecco et le marc frais vieilli.

4. Influence du stockage sur l'étape de fermentation solide dans la cascade de valorisation

Afin d'évaluer l'influence du stockage du marc sur la fermentation solide après l'extraction des composés phénoliques, un plan d'expérience similaire à celui décrit dans l'article du chapitre 2 sur le marc de Gecco a été appliqué sur le marc frais en vue de la production d'un cocktail enzymatique hydrolytique.

4.1. Matériel et méthode

4.1.1. L'extraction des composés phénoliques

Dans cette étude, le marc frais a d'abord été soumis à une extraction assistée par ultrasons de 10 minutes selon les conditions optimales obtenues pour le marc de Gecco, à savoir une puissance d'ultrasons de 400 W, un rapport liquide-solide de 40 mL/g, et l'utilisation d'un mélange d'éthanol à 50% dans de l'eau. Les résultats expérimentaux relatifs à l'extraction des polyphénols totaux, des sucres, des protéines et de l'activité antioxydante de l'extrait obtenu ont déjà été présentés dans ce chapitre (section 3.1.3) et sont résumés sur la Figure 42 en fin de chapitre.

4.1.2. La fermentation solide avec *Penicillium solitum*

Suite à l'extraction assistée par ultrasons, un marc appauvri a été récupéré pour être soumis à une fermentation solide avec *Penicillium solitum*. Pour cette étape, un plan d'expérience a été mis en place afin d'optimiser les conditions de fermentation pour l'obtention d'un cocktail enzymatique performant. Les paramètres étudiés en entrée sont similaires à ceux choisis dans l'article 2 sur les mêmes plages de valeurs (une humidification de 55 à 75%, une durée de 3 à 9 jours, ainsi qu'une taille de l'inoculum de 10^5 à 10^7 spores/g), tout comme les activités mesurées en réponse (l'activité lipase, mannanase et endoglucanase). La mise en œuvre a été réalisée de manière analogue à celle de l'article, avec 5 g de marc de café dans des Erlenmeyers de 50 mL et une incubation à 25°C. Pour la récupération des enzymes, les conditions optimisées de l'article 2 ont été utilisées (un ratio liquide-solide de 7 mL/g et un temps de contact entre le substrat et l'eau de récupération de 55 minutes).

4.2. Résultats du plan d'expérience appliqué au marc frais appauvri

L'objectif ici n'étant pas d'analyser les forces des différents paramètres individuellement par rapport aux activités étudiées, la présentation des surfaces de réponse ainsi que les analyses d'ANOVA n'ont pas été affichées (Annexes). Cependant, à titre indicatif, les R^2 prédits des modèles obtenus étaient de 0,8522, 0,7957 et 0,7489 respectivement pour l'activité lipase, mannanase et endoglucanase. Ces valeurs nous permettent d'utiliser les modèles

établis comme sources de prédiction pour les réponses calculées à l'intérieur des bornes du plan étudié.

Les conditions de culture optimales sur le marc frais appauvri en composés phénoliques après UAE, pour les activités recherchées sont résumées dans le Tableau 5. La résolution mathématique des équations de modélisation de chaque réponse a permis d'obtenir les conditions permettant d'atteindre les valeurs maximales respectives de chaque activité (trois premières lignes du Tableau 21). La résolution commune des équations a permis d'identifier les conditions optimales pour la création d'un cocktail répondant à la problématique d'obtenir les valeurs les plus élevées possibles pour les trois activités mesurées ensemble (4ème ligne du Tableau 21).

Tableau 21. Résultats des résolutions des équations des différents modèles pour l'optimisation des réponses recherchées

Maximale	Humidité (%)	Durée (jours)	Inoculum (spores/g)	Activité lipase (U/g)	Activité mannanase (mU/g)	Activité endoglucanase (mU/g)
Lipase	68,4	6,6	$7,8x10^6$	**56,2**	788,4	161,9
Mannanase	74,9	5,3	$7,2x10^6$	47,8	**927,9**	202,5
Endoglucanase	75	9	$7x10^6$	45,2	892,2	**210,8**
Cocktail	74,9	7,2	$8,1x10^6$	**49,5**	**938,8**	**205,5**

On remarque que pour les deux glycosides hydrolases (mannanase et endoglucanase), les conditions d'humidité permettant d'atteindre des valeurs maximales sont similaires (environ 75%), mais la durée de fermentation diffère, passant de 5 jours pour l'activité mannanase à 9 jours pour l'activité endoglucanase. La taille de l'inoculum joue un rôle secondaire dans les variations des trois activités sur la gamme étudiée. Il convient de rappeler que ce résultat est similaire à celui obtenu au chapitre 2 pour la fermentation réalisée à partir du marc de Gecco. En ce qui concerne l'activité lipase, les conditions sont relativement similaires à celles relevées au chapitre 2 avec 67% d'humidité et 7,2 jours de fermentation, mais une différence toutefois notable dans la taille optimale requise de l'inoculum, qui était de 10^7 spores/g, tandis qu'ici, elle est de $7,8x10^6$ spores/g.

En ce qui concerne le cocktail enzymatique, les conditions optimales calculées pour la fermentation sur marc frais sont très proches de celles calculées pour le marc de Gecco. Pour rappel, les conditions étaient de 74,1% d'humidité, 7,1 jours de fermentation et 10^7 spores/g, alors qu'ici, elles sont de 74,9% d'humidité, 7,2 jours de fermentation et $8,1x10^6$ spores/g. Les valeurs des trois activités obtenues dans les conditions optimisées de fermentation solide sont présentées dans la Figure 42.

4.3. Comparaison de deux marcs appauvris ayant subi des conditions de stockage différentes pour la production d'un cocktail enzymatique

On observe des activités enzymatiques plus élevées pour l'activité glucanase et l'activité lipase, lorsqu'une fermentation est réalisée sur un marc appauvri ayant préalablement subi une colonisation (Figure 42). En effet, l'activité glucanase est significativement plus élevée de 43% pour le marc de Gecco et l'activité lipase l'est de 32%. En ce qui concerne l'activité mannanase, on remarque une augmentation non-significative de moins de 1% de l'activité mesurée.

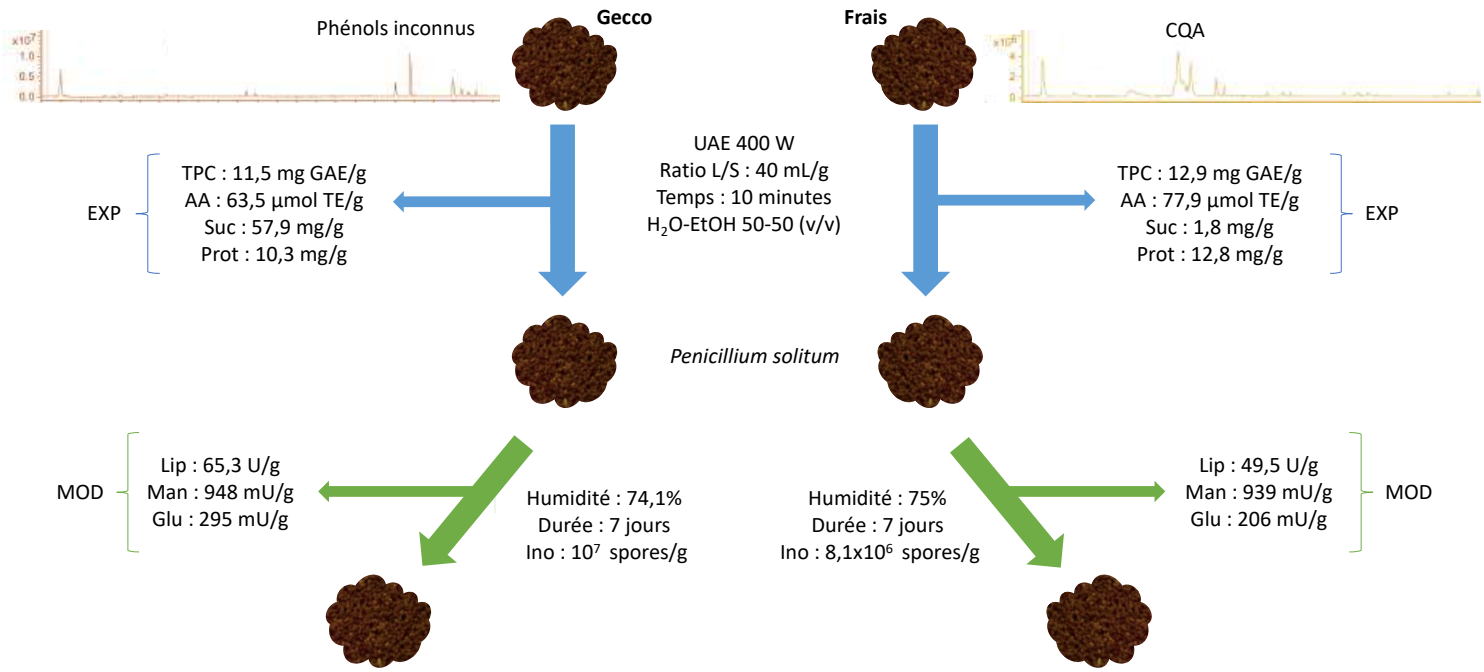

Figure 42. Comparaison de l'application de la cascade optimisée sur deux marcs ayant subi des conditions de stockage différentes. EXP = valeurs expérimentales ; MOD = valeurs modélisées ; Ino = inoculum ; Suc = sucres réducteurs ; Prot : protéines ; Lip = activité lipase ; Man = activité mannanase ; Glu = activité glucanase

La première hypothèse suggérée par ces résultats concerne la richesse en fibres du marc de café (jusqu'à 70% quand ce dernier est frais) (Campos-Vega et al., 2015), qui permet, malgré une colonisation préalable (entraînant une diminution des polymères de sucres disponibles), de soutenir la croissance ultérieure d'autres champignons en vue de sa valorisation par FMS. En effet, les similitudes des valeurs d'activité mannanase indiquent qu'il n'y a probablement pas eu de manque de carbone, et donc il est probable que les sucres disponibles restent en excès.

La deuxième hypothèse implique qu'une colonisation occasionnée par les conditions de stockage aurait permis la suppression d'inhibiteurs enzymatiques naturellement présents dans le marc qui auraient pu être dégradés ou transformés. En effet, malgré l'extraction assistée par ultrasons opérée avant la fermentation solide, certains composés phénoliques résiduels non extractibles de la lignine peuvent inhiber l'activité de certaines enzymes (hémi)cellulolitiques (Berlin et al., 2006; Ximenes et al., 2011). Il a été montré que l'utilisation de tannases sur de la lignine insoluble permet de dégrader les composés phénoliques oligomères et ainsi d'atténuer l'inhibition de ces derniers sur la cellulolyse (Tejirian & Xu, 2011). L'activité lipase peut aussi être inhibée par divers composés phénoliques présents dans la lignine (de Camargo et al., 2016).

5. Conclusion

En raison de sa nature humide et poreuse, ainsi que de sa composition riche en fibres, le marc de café est un substrat propice au développement de nombreux micro-organismes, y compris des champignons filamenteux. Si on envisage l'industrialisation de l'extraction de composés phénoliques à partir du marc de café, les conditions de stockage deviennent un élément crucial dans l'obtention des molécules recherchées. De plus, après extraction, on observe une influence significative sur la production d'enzymes par FMS.

L'utilisation de marc de café frais séché rapidement avant le stockage a permis d'obtenir une concentration en polyphénols totaux extraits 9% plus élevée et une activité antioxydante 10% plus élevée par rapport à celle d'un marc humide ayant subi une fermentation avec

Penicillium solitum pendant 6 jours. Une analyse par HPLC a révélé une différence significative dans l'origine des valeurs obtenues par des dosages colorimétriques. En effet, les acides chlorogéniques couramment présents dans le marc de café (CGA) ont été remplacés par d'autres composés (phénols ou esters par exemple) présentant un pouvoir antioxydant relativement similaire lorsque le marc a été soumis à un vieillissement naturel ou mimé expérimentalement comme dans notre étude.

Si l'on s'intéresse à la production d'enzymes par FMS après l'extraction des composés phénoliques, on remarque que l'état de transformation du marc suite aux conditions de stockage joue un rôle important. En effet, la possible dégradation des inhibiteurs naturellement présents dans la lignine permettrait d'obtenir des rendements en activité lipolytique et (hémi)cellulolytique plus importants. De plus, on note que la croissance du champignon permettant une production optimisée du cocktail enzymatique recherché n'est pas limitée par un manque de nutriments malgré une longue durée de stockage.

Pour résumer, si l'on souhaite obtenir spécifiquement les CGA du marc de café, l'utilisation d'un marc frais, n'ayant pas subi de colonisation microbienne, est préconisée. Si l'objectif est d'obtenir un extrait phénolique au pouvoir antioxydant, sans pour autant connaître sa composition précise, le marc humide peut être stocké plusieurs mois avant séchage. De plus, dans le cadre d'une cascade qui ferait intervenir une FMS après l'extraction des composés phénoliques, de meilleurs rendements en activités hydrolytiques peuvent être obtenus dans ces conditions.

Conclusion générale et perspectives

La valorisation des biodéchets constitue un enjeu majeur de ce siècle. À une époque où les ressources deviennent de plus en plus limitées, il est essentiel de réduire notre impact sur l'environnement et préserver au mieux ce que notre planète peut offrir. En 2023, le mercredi 2 août a marqué le jour du dépassement selon le *Global Footprint Network*, c'est-à-dire le jour de l'année où l'humanité a consommé l'ensemble des ressources que la planète peut générer en une année. Le café, étant l'une des ressources les plus échangées à travers le monde après le pétrole, aux côtés des céréales et d'autres denrées alimentaires, la valorisation des coproduits associés à sa production apparaît comme l'un des défis majeurs auxquels la société doit faire face. Parmi ces coproduits, le marc de café, qui représente un des principaux déchets de cette industrie, a été au cœur des travaux de cette thèse. L'objectif principal était de définir et d'évaluer une approche de valorisation en cascade du marc de café, avec une perspective de mise en œuvre industrielle. Les procédés choisis devaient être économiquement viables, respectueux de l'environnement et capables de générer divers produits. Deux procédés de valorisation ont été sélectionnés pour cette étude : l'extraction solide-liquide et la fermentation solide. Chacun de ces procédés exploite de manière différente le marc de café pour récupérer et produire des produits à forte valeur ajoutée, les composés phénoliques et un cocktail enzymatique.

Dans un premier temps, l'étude de l'influence de la taille des particules sur l'extraction des composés phénoliques du marc a permis de mettre en avant l'obtention d'un extrait plus concentré en polyphénols totaux avec l'emploi de particules plus fines (< 500 µm). Cependant, dans le cas d'une industrialisation, des étapes supplémentaires de tri et de broyage seraient nécessaires afin de pouvoir bénéficier de cet avantage. Deux techniques d'extraction solide-liquide ont été étudiées et comparées : l'extraction conventionnelle (CE) et l'extraction assistée par ultrasons (UAE). Pour chacune, les paramètres d'extraction optimaux ont été déterminés. Pour les deux types d'extraction, le solvant a eu un impact significatif sur la concentration en polyphénols totaux de l'extrait obtenu avec des résultats optimaux pour un

solvant eau-éthanol 50/50 (v/v). Dans une démarche d'éco-extraction, le recyclage de l'éthanol par évaporation et condensation à l'aide d'un évaporateur rotatif est une piste intéressante à étudier qui permettrait à l'échelle industrielle de réaliser des économies à long terme. La société ES France propose des modèles ATEX pouvant traiter jusqu'à un volume de 100 litres. Bien que l'utilisation des ultrasons soit plus contraignante du point de vue industriel, elle a permis d'obtenir des rendements nettement plus élevés (≈ 30%) et de réaliser d'importantes économies d'énergie (≈ 300%) par rapport à l'extraction conventionnelle. Il convient de noter que les équipements industriels pour l'extraction assistée par ultrasons, capables de fournir des puissances volumiques similaires à celles utilisées dans cette étude (400 W/L), sont encore peu répandus. Certaines entreprises telles que R.E.U.S, Sinaptec, Sono-liquid, et Hiescher proposent des modèles permettant la mise en œuvre de ce procédé de manière continue ou en recirculation, avec des puissances allant jusqu'à 10 000 Watts et des débits atteignant 10 m^3/h. Concernant les applications des extraits phénoliques générés dans les conditions optimales d'UAE, d'autres tests *in vitro* et *in vivo* permettraient d'avoir un aperçu de leurs applications dans des domaines spécifiques. L'entreprise cosmétique Nivea par exemple, a développé un partenariat avec la société Kaffee Bueno pour l'utilisation d'huile contenant de la caféine et des acides chlorogéniques extraits du marc de café dans la formulation de crème de jour énergisante.

La récupération de la phase solide servant à la fermentation en milieu solide (FMS), nécessite d'être étudiée. Pour les travaux de recherche effectués, le marc a été étalé jusqu'à obtenir une couche mince de l'ordre du centimètre afin d'être séché à l'air libre en attente de sa valorisation par FMS. Une variété de micro-organismes peut alors s'y déposer par voie aérienne et entrer en concurrence avec la souche sélectionnée, pour la production d'un cocktail enzymatique hydrolytique. Cette mise en concurrence pour la colonisation du substrat peut avoir une influence négative sur les résultats attendus. Dans le cas de notre cascade, la récupération de la phase solide fait suite à l'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique, pouvant servir à décontaminer le marc et limiter la prolifération microbienne dans une certaine mesure. Il serait alors intéressant d'étudier le temps optimal d'enchaînement des procédés permettant se dispenser d'une étape de stérilisation pouvant occasionner des coûts supplémentaires non-négligeables.

Les travaux de thèse ont permis d'identifier plus de 40 souches fongiques isolées du marc et par criblage d'activités enzymatiques, un champignon, *Penicillium solitum* a été sélectionné comme le plus pertinent pour une valorisation du marc de café appauvri par fermentation solide. L'analyse des paramètres d'extraction des enzymes ainsi que des conditions de culture a permis de mettre en avant leur rôle majeur dans la production d'un cocktail enzymatique. Des activités de glycosides hydrolases ainsi qu'une activité lipolytique ont été révélées. L'un des paramètres de culture clé a été le taux d'humidification du marc. L'emploi d'eau étant nécessaire pour la croissance des champignons, l'utilisation de l'eau résiduelle absorbée par le marc lors de l'étape d'extraction pourrait être étudiée. Il s'agirait de trouver le temps optimal nécessaire à l'évaporation de l'éthanol, inhibiteur de croissance, tout en permettant de conserver l'eau indispensable à la croissance. Suite à l'étape d'identification des enzymes produites sur marc appauvri par *Penicillium solitum*, des tests d'activité complémentaires ont pu être réalisés pour compléter le panel d'enzymes déjà étudié. Finalement, le cocktail produit présente diverses activités comme une activité protéase, lipase, mannanase, glucanase, pectinase pouvant être utilisé dans divers domaines. Des études complémentaires permettraient de préciser les domaines d'application les plus prometteurs pour ce complexe enzymatique. En effet, il existe de nombreux cocktails enzymatiques pouvant faciliter l'assimilation de certains aliments pour le bétail ou encore remplacer certains composants chimiques dans des détergents. De plus, la mise en œuvre de ce cocktail, c'est-à-dire l'optimisation des conditions de pH et de température n'a pas été réalisée et pourrait permettre de révéler le plein potentiel du produit généré.

À des fins d'industrialisation de la cascade, les conditions de stockage du marc ont été étudiées. En effet, ce biodéchet, de par notamment sa richesse et son humidité, peut être modifié pendant le stockage. Comme soulignée précédemment, cette nature humide donne lieu à sa colonisation par de nombreux micro-organismes. Ces derniers sont en capacité de modifier sa composition. La cascade de valorisation appliquée à un marc frais, n'ayant pas subi de vieillissement occasionné par ses conditions de stockage, permet la récupération après l'extraction assistée par ultrasons d'acides chlorogéniques comme le 5-CQA, le 3-CQA ou encore le 3,5 diCQA. Ces composés identifiés et quantifiés par HPLC, sont absents d'extraits obtenus après simulation de colonisation fongique (effectuée sur 7 jours de croissance à 25°C) sur marc frais humide. Il y aurait donc un intérêt particulier à limiter le temps de stockage du

marc après sa collecte si ces composés sont recherchés. Des tests d'applications spécifiques peuvent donc être à développer autour de ces extraits. Les autres composés qui n'ont pas été clairement identifiés dans ces travaux de thèse peuvent faire l'objet d'une identification par l'utilisation de bases de données ou le recours à la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN). De plus, il est à noter que les conditions de stockage, au-delà de leur impact sur les composés obtenus après UAE, peuvent influencer la deuxième étape de la cascade, à savoir la FMS pour la production d'un cocktail enzymatique. En effet, la dégradation du marc de café humide liée à des conditions de stockage prolongées permet par la suite par FMS optimisée avec *Penicillium solitum* d'obtenir de meilleures activités glycoside hydrolase et lipase dans le complexe enzymatique produit. Une étude approfondie sur la caractérisation biochimique des modifications du marc de café humide ayant lieu lors de son stockage prolongé permettrait de mieux comprendre les mécanismes de sa biodégradation. Cette compréhension pourrait ensuite aider à adapter l'approche industrielle de la cascade. L'examen d'une fermentation répétée est également envisageable, en effet, le marc de café est en capacité de servir de substrat pour permettre une croissance fongique de manière cyclique. De plus, une étape ultime de valorisation énergétique pourrait permettre une utilisation optimale de ce biodéchet.

Ces travaux de thèse permettent de valider la mise en œuvre de la cascade de valorisation du marc de café étudiée et laissent entrevoir de nombreux travaux complémentaires permettant à la fois d'optimiser l'approche industrielle discutée (Figure 43) et de mieux adapter les applications suggérées des produits récupérés/générés.

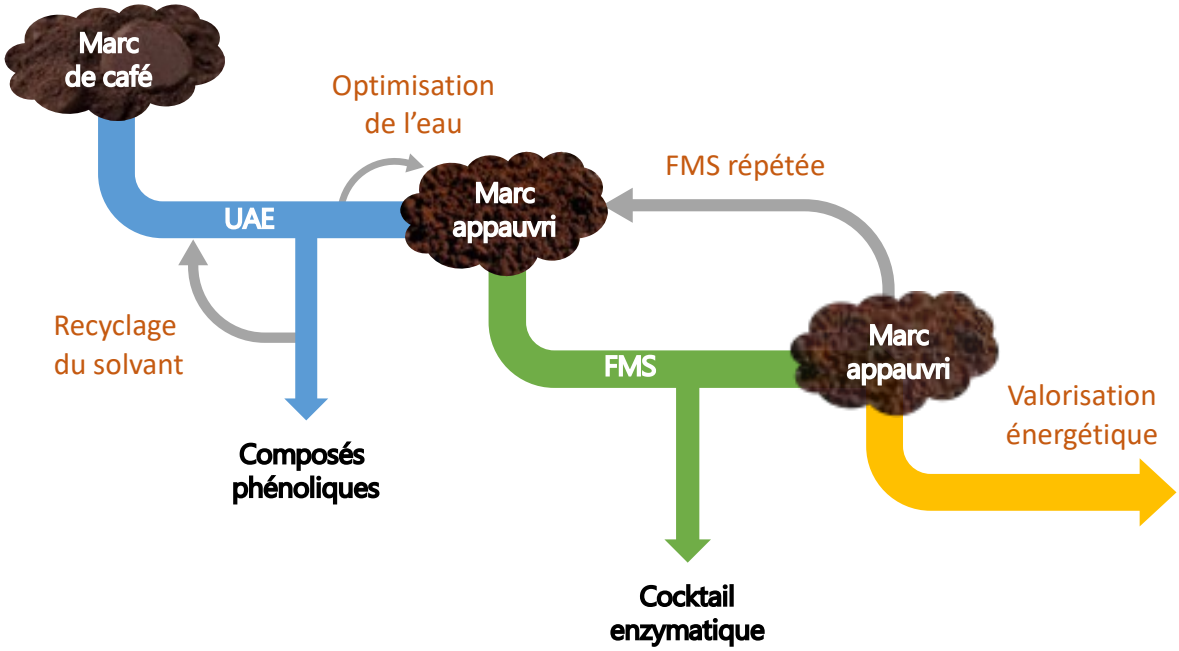

Figure 43. Exemples de perspectives intéressantes à développer en vue de l'industrialisation de la cascade étudiée

Bibliographie

A

Abdullah, R., Naeem, N., Aftab, M., Kaleem, A., Iqtedar, M., Iftikhar, T., & Naz, S. (2018). Enhanced Production of Alpha Amylase by Exploiting Novel Bacterial Co-Culture Technique Employing Solid State Fermentation. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, *42*(2), 305-312. https://doi.org/10.1007/s40995-016-0015-x

Acevedo, F., Rubilar, M., Scheuermann, E., Cancino, B., Uquiche, E., Garcés, M., Inostroza, K., & Shene, C. (2013). Spent Coffee Grounds as a Renewable Source of Bioactive Compounds. *J. Biobased Mater. Bioenergy*, 9.

Adigüzel, A. O., & Tunçer, M. (2016). Production, Characterization and Application of a Xylanase from Streptomyces sp. AOA40 in Fruit Juice and Bakery Industries. *Food Biotechnology*, *30*(3), 189-218. https://doi.org/10.1080/08905436.2016.1199383

Adiguzel, G., Sonmez, Z., Adiguzel, A., & Nadaroglu, H. (2016). Purification and characterization of a thermostable endo-beta-1,4 mannanase from Weissella viridescens LB37 and its application in fruit juice clarification. *European Food Research and Technology*, *242*(5), 769-776. https://doi.org/10.1007/s00217-015-2584-x

Afriliana, A., Hidayat, E., Mitoma, Y., Masuda, T., & Harada, H. (2021). Studies on Composting Spent Coffee Grounds by Aspergillus sp and Penicillium sp in Aerobic Static Batch Temperature Control. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, *10*, 91-112. https://doi.org/10.4236/jacen.2021.101007

Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez-Sánchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado-Barragan, L. A., Ramírez-Coronel, A., & Contreras-Esquivel, J. C. (2007). Microbial tannases : Advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *76*(1), 47-59. https://doi.org/10.1007/s00253-007-1000-2

Aguilera, J. M. (2003). Solid-Liquid Extraction. In *Extraction Optimization in Food Engineering*. CRC Press.

Ahirwar, S., Soni, H., Rawat, H. K., Prajapati, B. P., & Kango, N. (2016). Experimental design of response surface methodology used for utilisation of palm kernel cake as solid substrate for optimised production of fungal mannanase. *Mycology*, *7*(3), 143-153. https://doi.org/10.1080/21501203.2016.1229697

Ahlawat, S., Dhiman, S. S., Battan, B., Mandhan, R. P., & Sharma, J. (2009). Pectinase production by Bacillus subtilis and its potential application in biopreparation of cotton and micropoly fabric. *Process Biochemistry*, *44*(5), 521-526. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.01.003

Aidoo, K. E., Hendry, R., & Wood, B. J. B. (1982). Solid Substrate Fermentations. In A. I. Laskin (Éd.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 28, p. 201-237). Academic Press. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70236-3

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds : A review. *Current Research in Food Science*, *4*, 200-214. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011

Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M., & Kaltschmitt, M. (2012). Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*, *96*, 70-76. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2012.01.023

Ali, A., Lim, X. Y., Chong, C. H., Mah, S. H., & Chua, B. L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from Piper betle using response surface methodology. *LWT*, *89*, 681-688. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.033

Andrade, C., Perestrelo, R., & Câmara, J. S. (2022). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity from Spent Coffee Grounds as a Powerful Approach for Its Valorization. *Molecules*, *27*(21), Article 21. https://doi.org/10.3390/molecules27217504

Andrade, K. S., Gonçalvez, R. T., Maraschin, M., Ribeiro-do-Valle, R. M., Martínez, J., & Ferreira, S. R. S. (2012). Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks : Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, *88*, 544-552. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.031

Angeloni, G., Guerrini, L., Masella, P., Innocenti, M., Bellumori, M., & Parenti, A. (2019). Characterization and comparison of cold brew and cold drip coffee extraction methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(1), 391-399. https://doi.org/10.1002/jsfa.9200

Angeloni, S., Nzekoue, F. K., Navarini, L., Sagratini, G., Torregiani, E., Vittori, S., & Caprioli, G. (2020). An analytical method for the simultaneous quantification of 30 bioactive compounds in spent coffee ground by HPLC-MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry*. https://doi.org/10.1002/jms.4519

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, *125*(5), 989-1009. https://doi.org/10.1039/B000080I

Arellano-González, M. A., Ramírez-Coronel, M. A., Torres-Mancera, M. T., Pérez-Morales, G.

G., & Saucedo-Castañeda, G. (2011). *Antioxidant Activity of Fermented and Nonfermented Coffee (Coffea arabica) Pulp Extracts*.

Armenta, S., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2015). The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 2-8. https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.011

Arora, S., Dubey, M., Singh, P., Rani, R., & Ghosh, S. (2017). Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. *Process Biochemistry*, *61*, 12-23. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.06.009

Arya, S. S., Venkatram, R., More, P. R., & Vijayan, P. (2022). The wastes of coffee bean processing for utilization in food : A review. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(2), 429-444. https://doi.org/10.1007/s13197-021-05032-5

Atabani, A. E., Al-Muhtaseb, A. H., Kumar, G., Saratale, G. D., Aslam, M., Khan, H. A., Said, Z., & Mahmoud, E. (2019). Valorization of spent coffee grounds into biofuels and value-added products : Pathway towards integrated bio-refinery. *Fuel*, *254*, 115640. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115640

Ayilara, M. S., Olanrewaju, O. S., Babalola, O. O., & Odeyemi, O. (2020). Waste Management through Composting : Challenges and Potentials. *Sustainability*, *12*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/su12114456

Azabou, S., Abid, Y., Sebii, H., Felfoul, I., Gargouri, A., & Attia, H. (2016). Potential of the solid-state fermentation of tomato by products by Fusarium solani pisi for enzymatic extraction of lycopene. *LWT - Food Science and Technology*, *68*, 280-287. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.064

Azeredo, L. A. I., Gomes, P. M., Sant'Anna, G. L., Castilho, L. R., & Freire, D. M. G. (2007). Production and Regulation of Lipase Activity from Penicillium restrictum in Submerged and Solid-State Fermentations. *Current Microbiology*, *54*(5), 361-365. https://doi.org/10.1007/s00284-006-0425-7

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. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426-436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Azwanida. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *04*(03). https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196

B

Bagewadi, Z. K., Mulla, S. I., & Ninnekar, H. Z. (2018). Optimization of endoglucanase production from Trichoderma harzianum strain HZN11 by central composite design under response surface methodology. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *8*(2), 305-316. https://doi.org/10.1007/s13399-017-0285-3

Bais-Moleman, A. L., Sikkema, R., Vis, M., Reumerman, P., Theurl, M. C., & Erb, K.-H. (2018). Assessing wood use efficiency and greenhouse gas emissions of wood product cascading in the European Union. *Journal of Cleaner Production*, *172*, 3942-3954. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.153

Bajko, E., Kalinowska, M., Borowski, P., Siergiejczyk, L., & Lewandowski, W. (2016). 5-O-Caffeoylquinic acid : A spectroscopic study and biological screening for antimicrobial activity. *LWT - Food Science and Technology*, *65*, 471-479. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.024

Bajpai, P. (1997). Microbial Xylanolytic Enzyme System : Properties and Applications. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 43, p. 141-194). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70225-9

Bala, A., & Singh, B. (2017). Concomitant production of cellulase and xylanase by thermophilic mould Sporotrichum thermophile in solid state fermentation and their applicability in bread making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(6), 109. https://doi.org/10.1007/s11274-017-2278-6

Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, *7*(12), 3493-3503. https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z

Banerjee, S., & Arora, A. (2021). Sustainable bioprocess technologies for urban waste valorization. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, *4*, 100166. https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100166

Barbosa, H. M. A., de Melo, M. M. R., Coimbra, M. A., Passos, C. P., & Silva, C. M. (2014). Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology. *The Journal of Supercritical Fluids*, *85*, 165-172. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.11.011

Barel, M. (2020). *Café : De la cerise à la tasse*.

Barrett, A. J., & McDonald, J. K. (1986). Nomenclature : Protease, proteinase and peptidase.

The Biochemical Journal, *237*(3), 935. https://doi.org/10.1042/bj2370935

Barsotti, L., Merle, P., & Cheftel, J. C. (1999). Food processing by pulsed electric fields. I. Physical aspects. *Food Reviews International*, *15*(2), 163-180. https://doi.org/10.1080/87559129909541185

Bartel, C., Mesias, M., & Morales, F. J. (2015). Investigation on the extractability of melanoidins in portioned espresso coffee. *Food Research International*, *67*, 356-365. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.053

Battista, F., Zanzoni, S., Strazzera, G., Andreolli, M., & Bolzonella, D. (2020). The cascade biorefinery approach for the valorization of the spent coffee grounds. *Renewable Energy*, *157*, 1203-1211. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.113

Battista, F., Zuliani, L., Rizzioli, F., Fusco, S., & Bolzonella, D. (2021). Biodiesel, biogas and fermentable sugars production from Spent coffee Grounds : A cascade biorefinery approach. *Bioresource Technology*, *342*, 125952. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125952

Bayoï, J. R., Djoulde, D. R., Maiwore, J., Bakary, D., Essome, J. S., Noura, B., Tcheme, G., Sah, R. T., Ngang, J. J. E., & Etoa, F.-X. (2014). *INFLUENCE DU PROCEDE DE FABRICATION SUR LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DU JUS DE «FOLERE» (Hibiscus sabdariffa) VENDU DANS TROIS VILLES DU CAMEROUN: MAROUA, MOKOLO ET MORA [INFLUENCE OF MANUFACTURING PROCESS ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF FOLERE BEVERAGE (Hibiscus sabdariffa) SOLD IN THREE TOWNS OF CAMEROON: MAROUA, MOKOLO AND MORA]*. *9*(2).

Beaudor, M., Vauchel, P., Pradal, D., Aljawish, A., & Phalip, V. (2023). Comparing the efficiency of extracting antioxidant polyphenols from spent coffee grounds using an innovative ultrasound-assisted extraction equipment versus conventional method. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, *188*, 109358. https://doi.org/10.1016/j.cep.2023.109358

Ben Akacha, N., & Gargouri, M. (2015). Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds : Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food and Bioproducts Processing*, *94*, 675-706. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.09.011

Benthin, B., Danz, H., & Hamburger, M. (1999). Pressurized liquid extraction of medicinal plants. *Journal of Chromatography. A*, *837*(1-2), 211-219. https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00071-0

Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S., & Saddler, J. (2006). Inhibition of cellulase, xylanase and β-glucosidase activities by softwood lignin

preparations. *Journal of Biotechnology*, *125*(2), 198-209. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.02.021

Bhargav, S., Panda, B. P., Ali, M., & Javed, S. (2008). Solid-state Fermentation : An Overview. *Chem. Biochem. Eng. Q.*

Biji, G. D., Arun, A., Muthulakshmi, E., Vijayaraghavan, P., Arasu, M. V., & Al-Dhabi, N. A. (2016). Bio-prospecting of cuttle fish waste and cow dung for the production of fibrinolytic enzyme from Bacillus cereus IND5 in solid state fermentation. *3 Biotech*, *6*(2), 231. https://doi.org/10.1007/s13205-016-0553-0

Blackwell, M., Hibbett, D. S., Taylor, J. W., & Spatafora, J. W. (2006). Research Coordination Networks : A phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia*, *98*(6), 829-837. https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832613

Blomsma, F., & Brennan, G. (2017). The Emergence of Circular Economy : A New Framing Around Prolonging Resource Productivity: The Emergence of Circular Economy. *Journal of Industrial Ecology*, *21*(3), 603-614. https://doi.org/10.1111/jiec.12603

Boadi, D. K., & Neufeld, R. J. (2001). Encapsulation of tannase for the hydrolysis of tea tannins. *Enzyme and Microbial Technology*, *28*(7), 590-595. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00295-2

Bolzonella, D., Fatone, F., & Cecchi, F. (2013). Aperçu de la méthanisation agricole en Italie: *Sciences Eaux & Territoires*, *Numéro 12*(3), 24-27. https://doi.org/10.3917/set.012.0024

Boyadzhieva, S., Angelov, G., Georgieva, S., & Yankov, D. (2018). *Characterization of polyphenol content and antioxidant capacity of spent coffee grounds*. 6.

Bradbury, A. G. W., & Halliday, D. J. (1990). Chemical structures of green coffee bean polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(2), 389-392. https://doi.org/10.1021/jf00092a010

Brar, S. K., Pachapur, V. L., Valdez Castillo, M., & Le Bihan, Y. (2022). *Integrated Biorefinery Approach for Utilization of Wood Waste into Levulinic Acid and 2-Phenylethanol Production Using Mild Treatment Conditions* (SSRN Scholarly Paper 4189449). https://doi.org/10.2139/ssrn.4189449

Bravo, J., Juániz, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012). Evaluation of Spent Coffee Obtained from the Most Common Coffeemakers as a Source of Hydrophilic Bioactive Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(51), 12565-12573. https://doi.org/10.1021/jf3040594

Bravo, J., Monente, C., Juániz, I., De Peña, M. P., & Cid, C. (2013). Influence of extraction process on antioxidant capacity of spent coffee. *Food Research International*, *50*(2),

610-616. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.026

Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, *81*(1), 236-242. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027

Buddhiwant, P., Bhavsar, K., Kumar, V. R., & Khire, J. M. (2016). Phytase production by solid-state fermentation of groundnut oil cake by Aspergillus niger : A bioprocess optimization study for animal feedstock applications. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *46*(6), 531-538. https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1045606

Burniol-Figols, A., Cenian, K., Skiadas, I. V., & Gavala, H. N. (2016). Integration of chlorogenic acid recovery and bioethanol production from spent coffee grounds. *Biochemical Engineering Journal*, *116*, 54-64. https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.04.025

Bursać Kovačević, D., Barba, F. J., Granato, D., Galanakis, C. M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., & Putnik, P. (2018). Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *Food Chemistry*, *254*, 150-157. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.192

Byun, S.-Y., Kwon, S.-H., Heo, S.-H., Shim, J.-S., Du, M.-H., & Na, J.-I. (2015). Efficacy of Slimming Cream Containing 3.5% Water-Soluble Caffeine and Xanthenes for the Treatment of Cellulite : Clinical Study and Literature Review. *Annals of Dermatology*, *27*(3), 243-249. https://doi.org/10.5021/ad.2015.27.3.243

C

Caballero-Galván, A. S., Restrepo-Serna, D. L., Ortiz-Sánchez, M., & Cardona-Alzate, C. A. (2018). Analysis of Extraction Kinetics of Bioactive Compounds from Spent Coffee Grounds (Coffea arábica). *Waste and Biomass Valorization*, *9*(12), 2381-2389. https://doi.org/10.1007/s12649-018-0332-8

Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, *59*(4), 379-389. https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1

Caetano, N. S., Mata, T. M., Martins, A. A., & Felgueiras, M. C. (2017). New Trends in Energy Production and Utilization. *Energy Procedia*, *107*, 7-14. https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.12.122

Caetano, N., Silva, V., & Mata, T. M. (2012). Valorization of coffee grounds for biodiesel

production. *Chemical Engineering Transactions*, *26*, 267-272. https://doi.org/10.3303/CET1226045

Cai, Y., & Yang, G. (2023). Enzyme cocktail with hyperactive lipase through solid-state fermentation by the novel strain Penicillium sp. Y-21. *Scientific Reports*, *13*, 14527. https://doi.org/10.1038/s41598-023-41912-w

Calle Chumo, R. N., Calle Chumo, D. A., Gallegos Peredo, A. S., & Jarrin Oseguera, P. I. (2022). Influence of the Solvent on the Extraction of Phenolic Com-pounds from the Coffee Grounds by Soxhlet Leaching. *Ingeniería e Investigación*, *43*(1), e97521. https://doi.org/10.15446/ing.investig.97521

Camardo Leggieri, M., Decontardi, S., & Battilani, P. (2018). Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. *International Journal of Food Microbiology*, *278*, 52-60. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.023

Campbell-Johnston, K., Vermeulen, W. J. V., Reike, D., & Brullot, S. (2020). The Circular Economy and Cascading : Towards a Framework. *Resources, Conservation & Recycling: X*, *7*, 100038. https://doi.org/10.1016/j.rcrx.2020.100038

Campos-Vega, R., Loarca-Piña, G., Vergara-Castañeda, H. A., & Oomah, B. D. (2015). Spent coffee grounds : A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(1), 24-36. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.04.012

Castillo-Santos, K., Ruiz-López, I. I., Rodríguez-Jimenes, G. C., Carrillo-Ahumada, J., & García-Alvarado, M. A. (2017). Analysis of mass transfer equations during solid-liquid extraction and its application for vanilla extraction kinetics modeling. *Journal of Food Engineering*, *192*, 36-44. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.020

Cen, P., & Xia, L. (1999). Production of Cellulase by Solid-State Fermentation. In G. T. Tsao, A. P. Brainard, H. R. Bungay, N. J. Cao, P. Cen, Z. Chen, J. Du, B. Foody, C. S. Gong, P. Hall, N. W. Y. Ho, D. C. Irwin, P. Iyer, T. W. Jeffries, C. M. Ladisch, M. R. Ladisch, Y. Y. Lee, N. S. Mosier, H. M. Mühlemann, … L. Xia (Éds.), *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics* (p. 69-92). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-49194-5_4

Cha, J. W., Piao, M. J., Kim, K. C., Yao, C. W., Zheng, J., Kim, S. M., Hyun, C. L., Ahn, Y. S., & Hyun, J. W. (2014). The Polyphenol Chlorogenic Acid Attenuates UVB-mediated Oxidative Stress in Human HaCaT Keratinocytes. *Biomolecules & Therapeutics*, *22*(2), 136-142. https://doi.org/10.4062/biomolther.2014.006

Chahal, D. S. (1983). Growth Characteristics of Microorganisms in Solid State Fermentation for Upgrading of Protein Values of Lignocelluloses and Cellulase Production. In *Foundations of Biochemical Engineering* (Vol. 207, p. 421-442). AMERICAN CHEMICAL SOCIETY.

https://doi.org/10.1021/bk-1983-0207.ch020

Chan, C.-H., Yusoff, R., Ngoh, G.-C., & Kung, F. W.-L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, *1218*(37), 6213-6225. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040

Chanalia, P., Gandhi, D., Jodha, D., & Singh, J. (2011). Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry : An overview. *Reviews and Research in Medical Microbiology*, *22*(4), 96. https://doi.org/10.1097/MRM.0b013e3283494749

Chandel, A., & Silva, S. S. D. (2013). *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass : Techniques, Applications and Commercialization*. BoD – Books on Demand.

Chandra, M. S., Viswanath, B., & Reddy, B. R. (2010). Optimization of extraction of β-endoglucanase from the fermented bran of Aspergillus niger. *Indian Journal of Microbiology*, *50*(Suppl 1), 122-126. https://doi.org/10.1007/s12088-010-0020-2

Chanioti, S., Liadakis, G., & Tzia, C. (2014). Solid–Liquid Extraction. In T. Varzakas & C. Tzia (Éds.), *Food Engineering Handbook* (Vol. 20143634, p. 253-286). CRC Press. https://doi.org/10.1201/b17803-7

Chatel, G. (2018). How sonochemistry contributes to green chemistry? *Ultrasonics Sonochemistry*, *40*, 117-122. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.029

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. *Ultrasonics Sonochemistry*, *34*, 540-560. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035

Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green Extraction of Natural Products : Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(7), 8615-8627. https://doi.org/10.3390/ijms13078615

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology : Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *18*(4), 813-835. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023

Chen, H. (2013). *Modern Solid State Fermentation : Theory and Practice*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6043-1

Cherif, S., Mnif, S., Hadrich, F., Abdelkafi, S., & Sayadi, S. (2011). A newly high alkaline lipase : An ideal choice for application in detergent formulations. *Lipids in Health and Disease*, *10*, 221. https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-221

Chilosi, G., Aleandri, M. P., Luccioli, E., Stazi, S. R., Marabottini, R., Morales-Rodríguez, C., Vettraino, A. M., & Vannini, A. (2020). Suppression of soil-borne plant pathogens in

growing media amended with espresso spent coffee grounds as a carrier of Trichoderma spp. *Scientia Horticulturae*, *259*, 108666. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108666

Choudhury, P. (2015). Industrial application of lipase : A review. *BioPharm*, *1*, 41-47.

Clifford, M. N., & Willson, K. C. (Éds.). (1985). *Coffee*. Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6657-1

Colla, L. M., Ficanha, A. M. M., Rizzardi, J., Bertolin, T. E., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V. (2015). Production and Characterization of Lipases by Two New Isolates of Aspergillus through Solid-State and Submerged Fermentation. *BioMed Research International*, *2015*, 725959. https://doi.org/10.1155/2015/725959

Conde, T., & Mussatto, S. I. (2016). Isolation of polyphenols from spent coffee grounds and silverskin by mild hydrothermal pretreatment. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *46*(4), 406-409. https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1084514

Contesini, F. J., Melo, R. R. de, & Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases : From production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*(3), 321-334. https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354

Cruz, J.-F., Joseph Hounhouigan, D., Fleurat-Lessard, F., & Troude, F. (2016). *La conservation des grains après récolte*. éditions Quae. https://doi.org/10.35690/978-2-7592-2437-1

Cruz, M. V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V. D., Simões, P., Barreiros, S., & Reis, M. A. M. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource Technology*, *157*, 360-363. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.013

Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P., Morais, S., & Casal, S. (2012). Espresso Coffee Residues : A Valuable Source of Unextracted Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(32), 7777-7784. https://doi.org/10.1021/jf3018854

D

Dahlberg, K. R., & Etten, J. L. V. (1982). Physiology and Biochemistry of Fungal Sporulation. *Annual Review of Phytopathology*, *20*(1), 281-301. https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001433

Dawood, A., & Ma, K. (2020). Applications of Microbial β-Mannanases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *8*, 598630.

https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.598630

de Araújo, F. F., de Paulo Farias, D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications : An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, *338*, 127535. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535

de Camargo, A. C., Regitano-d'Arce, M. A. B., Biasoto, A. C. T., & Shahidi, F. (2016). Enzyme-assisted extraction of phenolics from winemaking by-products : Antioxidant potential and inhibition of alpha-glucosidase and lipase activities. *Food Chemistry*, *212*, 395-402. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.047

de Carvalho, J. T. G., Da Silva Baldivia, D., de Castro, D. T. H., dos Santos, H. F., dos Santos, C. M., Oliveira, A. S., Alfredo, T. M., Vilharva, K. N., de Picoli Souza, K., & dos Santos, E. L. (2020). The immunoregulatory function of polyphenols : Implications in cancer immunity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *85*, 108428. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108428

Delgado, P. A., Vignoli, J. A., Siika-aho, M., & Franco, T. T. (2008). Sediments in coffee extracts : Composition and control by enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, *110*(1), 168-176. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.029

Delgado-Andrade, C., & Morales, F. J. (2005). Unraveling the Contribution of Melanoidins to the Antioxidant Activity of Coffee Brews. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(5), 1403-1407. https://doi.org/10.1021/jf048500p

de Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial α-amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(4), 850-861. https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004

Deswal, D., Khasa, Y. P., & Kuhad, R. C. (2011). Optimization of cellulase production by a brown rot fungus Fomitopsis sp. RCK2010 under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, *102*(10), 6065-6072. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.032

Devgun, M., Nanda, A., & Ansari, S. H. (2012). *COMPARISON OF CONVENTIONAL AND NON CONVENTIONAL METHODS OF EXTRACTION OF HEARTWOOD OF PTEROCARPUS MARSUPIUM ROXB.*

Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial Mannanases : An Overview of Production and Applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, *27*(4), 197-216. https://doi.org/10.1080/07388550701775919

Dhillon, G. S., Oberoi, H. S., Kaur, S., Bansal, S., & Brar, S. K. (2011). Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products*, *34*(1), 1160-1167. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.04.001

Dias, L. M., dos Santos, B. V., Albuquerque, C. J. B., Baeta, B. E. L., Pasquini, D., & Baffi, M. A. (2018). Biomass sorghum as a novel substrate in solid-state fermentation for the production of hemicellulases and cellulases by Aspergillus niger and A. fumigatus. *Journal of Applied Microbiology*, *124*(3), 708-718. https://doi.org/10.1111/jam.13672

Diaz, A. B., Blandino, A., Webb, C., & Caro, I. (2016). Modelling of different enzyme productions by solid-state fermentation on several agro-industrial residues. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(22), 9555-9566. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7629-y

Díaz, A. B., Caro, I., de Ory, I., & Blandino, A. (2007). Evaluation of the conditions for the extraction of hydrolitic enzymes obtained by solid state fermentation from grape pomace. *Enzyme and Microbial Technology*, *41*(3), 302-306. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.02.006

Díaz-Hernández, G. C., Alvarez-Fitz, P., Maldonado-Astudillo, Y. I., Jiménez-Hernández, J., Parra-Rojas, I., Flores-Alfaro, E., Salazar, R., & Ramírez, M. (2022). Antibacterial, Antiradical and Antiproliferative Potential of Green, Roasted, and Spent Coffee Extracts. *Applied Sciences*, *12*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/app12041938

Dibert, K., Cros, E., & Andrieu, J. (1989). Solvent extraction of oil and chlorogenic acid from green coffee part I : Equilibrium data. *Journal of Food Engineering*, *10*(1), 1-11. https://doi.org/10.1016/0260-8774(89)90017-4

Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Molly, K., Van Beek, E., & Vanderbeke, E. (2002). The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition : II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance. *Livestock Production Science*, *76*(1), 1-16. https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00331-1

Donner, M., Gohier, R., & De Vries, H. (2020). A new circular business model typology for creating value from agro-waste. *Science of The Total Environment*, *716*, 137065. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137065

Duchiron, F., & Legin-Copinet, E. (2019). *Fermentation en milieu solide (FMS)*.

Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(5), 1768-1774. https://doi.org/10.1021/jf803011r

Dumas, C., & Charriere-Ladreix, Y. (1979). Etude cytochimique des polyphénols : Généralités concernant les lignines et les sécrétions de tannins et d'aglycones flavoniques. *Bulletin*

de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques, *126*(2), 123-142. https://doi.org/10.1080/01811797.1979.10824384

Durand, A. (1998). La fermentation en milieu solide. *Biofutur*, *1998*(181), 41-43. https://doi.org/10.1016/S0294-3506(98)80171-3

Durand, A. (2003). Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2), 113-125. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00124-9

E

Ebune, A., Al-Asheh, S., & Duvnjak, Z. (1995). Production of phytase during solid state fermentation using Aspergillus ficuum NRRL 3135 in canola meal. *Bioresource Technology*, *53*(1), 7-12. https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00041-C

EC. (2014). *European Commission, 2014a. MEMO, Questions and Answers on the Commission Communication "Towards a Circular Economy" and the Waste Targets Review.*

Egelyng, H., Romsdal, A., Hansen, H. O., Slizyte, R., Carvajal, A. K., Jouvenot, L., Hebrok, M., Honkapää, K., Wold, J. P., Seljåsen, R., & Aursand, M. (2018). Cascading Norwegian co-streams for bioeconomic transition. *Journal of Cleaner Production*, *172*, 3864-3873. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.099

Ekins. (2020). *Managing Environmental and Energy Transitions for Regions and Cities*. OECD. https://doi.org/10.1787/f0c6621f-en

El-Batal, A. I., ElKenawy, N. M., Yassin, A. S., & Amin, M. A. (2015). Laccase production by Pleurotus ostreatus and its application in synthesis of gold nanoparticles. *Biotechnology Reports*, *5*, 31-39. https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.11.001

El-Belghiti, K., & Vorobiev, E. (2004). Mass Transfer of Sugar from Beets Enhanced by Pulsed Electric Field. *Food and Bioproducts Processing - FOOD BIOPROD PROCESS*, *82*, 226-230. https://doi.org/10.1205/fbio.82.3.226.44187

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *35*(11), 1531-1538. https://doi.org/10.1007/s10295-008-0454-2

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Khardziani, T., & Agathos, S. N. (2009). Lignocellulose-degrading enzyme production by white-rot Basidiomycetes isolated from the forests of Georgia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(2), 331-339. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9897-x

Esquivel, P., & Jiménez, V. M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, *46*(2), 488-495. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028

F

Fan, X., Niehus, X., & Sandoval, G. (2012). Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *861*, 471-483. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_27

Favaro, C. P., Baraldi, I. J., Casciatori, F. P., & Farinas, C. S. (2020). β-Mannanase Production Using Coffee Industry Waste for Application in Soluble Coffee Processing. *Biomolecules*, *10*(2), 227. https://doi.org/10.3390/biom10020227

Faye, P. G., Ndiaye, E. M., Ndiaye, B., Cisse, O. I. K., & Ayessou, N. C. (2022). *Effet de la macération, de l'infusion et la décoction sur l'extraction aqueuse des polyphénols des feuilles séchées de Combretum Micranthum*.

Fazilat, A. (2016). *Production, isolation, purification and partial characterization of an extracellular acid protease from Aspergillus niger*.

Fernández-Rodríguez, J., Gordobil, O., Robles, E., González-Alriols, M., & Labidi, J. (2017). Lignin valorization from side-streams produced during agricultural waste pulping and total chlorine free bleaching. *Journal of Cleaner Production*, *142*, 2609-2617. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.10.198

Fischer, A., & Pascucci, S. (2017). Institutional incentives in circular economy transition : The case of material use in the Dutch textile industry. *Journal of Cleaner Production*, *155*, 17-32. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.12.038

Floegel, A., Kim, D.-O., Chung, S.-J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(7), 1043-1048. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008

Fontana, A. R., Antoniolli, A., & Bottini, R. (2013). Grape Pomace as a Sustainable Source of Bioactive Compounds : Extraction, Characterization, and Biotechnological Applications of Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(38), 8987-9003. https://doi.org/10.1021/jf402586f

Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2022). Potential Uses of Spent Coffee Grounds in the Food Industry. *Foods*, *11*(14), Article 14. https://doi.org/10.3390/foods11142064

França, E. D. S., Souza, A. F., Lemos, D. G. D. L., Lins, U. M. D. B. L., Campos-Takaki, G. M. D., Silva, C. A. A. D., & Lima, M. A. B. D. (2022). Bioconversion of coffee ground to lipase by filamentous fungi isolated from the Igarassu River in the State of Pernambuco, Brazil. *Research, Society and Development*, *11*(4), e36011427515. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i4.27515

G

Galanakis, C. M. (2018). *Polyphenols : Properties, Recovery, and Applications*. Woodhead Publishing.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., & Pandey, A. (2006). *Solid Culturing of Bacillus amyloliquefaciens for Alpha Amylase Production*.

Garcia-Bernet, D., & Daboussi, F. (2016). *Bioraffinerie environnementale et les usages en cascade de la biomasse*. https://doi.org/10.15454/1.5137737499806558E12

García-Lomillo, J., & González-SanJosé, M. L. (2017). Applications of Wine Pomace in the Food Industry : Approaches and Functions. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *16*(1), 3-22. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12238

García-Roldán, A., Piriou, L., & Jauregi, P. (2023). Natural deep eutectic solvents as a green extraction of polyphenols from spent coffee ground with enhanced bioactivities. *Frontiers in Plant Science*, *13*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2022.1072592

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—Application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, *2*(2), 113-118. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x

Gawande, P. V., & Kamat, M. Y. (1999). Production of Aspergillus xylanase by lignocellulosic waste fermentation and its application : P. V. GAWANDE AND M. Y. KAMAT. *Journal of Applied Microbiology*, *87*(4), 511-519. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00843.x

Geisendorf, S., & Pietrulla, F. (2018). The circular economy and circular economic concepts-a literature analysis and redefinition. *Thunderbird International Business Review*, *60*(5), 771-782. https://doi.org/10.1002/tie.21924

Geoffry, K., & Achur, R. N. (2018). Optimization of novel halophilic lipase production by Fusarium solani strain NFCCL 4084 using palm oil mill effluent. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *16*(2), 327-334. https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2018.04.003

Germano, S., Pandey, A., Osaku, C. A., Rocha, S. N., & Soccol, C. R. (2003). Characterization and stability of proteases from Penicillium sp. Produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *32*(2), 246-251. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00283-1

Gervais, P., & Molin, P. (2003). The role of water in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2), 85-101. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00122-5

Getachew, A. T., & Chun, B. S. (2017). Influence of pretreatment and modifiers on subcritical water liquefaction of spent coffee grounds : A green waste valorization approach. *Journal of Cleaner Production*, *142*, 3719-3727. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.10.096

Ghildyal, N. P., Ramakrishna, M., Lonsane, B. K., & Karanth, N. G. (1992). Gaseous concentration gradients in tray type solid state fermentors—Effect on yields and productivities. *Bioprocess Engineering*, *8*(1), 67-72. https://doi.org/10.1007/BF00369266

Ghisellini, P., Cialani, C., & Ulgiati, S. (2016). A review on circular economy : The expected transition to a balanced interplay of environmental and economic systems. *Journal of Cleaner Production*, *114*, 11-32. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.007

Gianfreda, L., Xu, F., & Bollag, J.-M. (1999). Laccases : A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, *3*(1), 1-26. https://doi.org/10.1080/10889869991219163

Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., & Ferreira, I. C. F. R. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, *88*, 302-315. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.029

Głowacka, R., Górska, A., Wirkowska-Wojdyła, M., Wołosiak, R., Majewska, E., & Derewiaka, D. (2019). The influence of brewing method on bioactive compounds residues in spent coffee grounds of different roasting degree and geographical origin. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(11), 3008-3014. https://doi.org/10.1111/ijfs.14213

Grajek, W., & Gervais, P. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by Trichoderma viride TS in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *9*(11), 658-662. https://doi.org/10.1016/0141-0229(87)90123-2

Grigoras, C. G., Destandau, E., Fougère, L., & Elfakir, C. (2013). Evaluation of apple pomace extracts as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, *49*, 794-804. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.026

Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications : Focus on food and agroindustries. *OCL*, *24*(4), D403. https://doi.org/10.1051/ocl/2017031

Guerrand, D. (2018). Economics of food and feed enzymes. In *Enzymes in Human and Animal Nutrition* (p. 487-514). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805419-2.00026-5

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., & Chauhan, B. (2003). Microbial α-amylases : A biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, *38*(11), 1599-1616. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00053-0

Gupte, A., & Madamwar, D. (1997). Production of cellulolytic enzymes by coculturing ofAspergillus ellipticus andAspergillus fumigatus grown on bagasse under solid state fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *62*(2), 267-274. https://doi.org/10.1007/BF02788002

H

Haile, M. (2014). Integrated volarization of spent coffee grounds to biofuels. *Biofuel Research Journal*, 65-69. https://doi.org/10.18331/BRJ2015.1.2.6

Haile, S., & Ayele, A. (2022). Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *The Scientific World Journal*, *2022*, 1881305. https://doi.org/10.1155/2022/1881305

Hama, S., Yamaji, H., Fukumizu, T., Numata, T., Tamalampudi, S., Kondo, A., Noda, H., & Fukuda, H. (2007). Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing Rhizopus oryzae cells immobilized within biomass support particles. *Biochemical Engineering Journal*, *34*(3), 273-278. https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.013

Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*.

Haure, M., Nguyen, T. K. C., Cendrès, A., Perino, S., Licandro, H., & Waché, Y. (2022). Glycosidically bound volatile profiles of green and roasted coffee beans and aromatic potential of the spent coffee ground. *European Food Research and Technology*, *248*(8), 2125-2134. https://doi.org/10.1007/s00217-022-04035-6

Hauthal, W. H. (2001). Advances with supercritical fluids [review]. *Chemosphere*, *43*(1), 123-135. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00332-5

Havlikovfi, L., & Mikovi, K. (1985). *Heat Stability of Anthocyanins*.

Heck Jx, Hertz Pf, & Ayub Maz. (2005). Extraction optimization of xylanases obtained by solid-

state cultivation of Bacillus circulans BL53. *Process Biochemistry*, *40*(8), 2891-2895.

Heinz, V., Toepfl, S., & Knorr, D. (2003). Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *4*(2), 167-175. https://doi.org/10.1016/S1466-8564(03)00017-1

Hidayat, R. & Patricia Wulandari. (2021). Methods of Extraction : Maceration, Percolation and Decoction. *Eureka Herba Indonesia*, *2*(1), 73-79. https://doi.org/10.37275/ehi.v2i1.15

Hmidet, N., El-Hadj Ali, N., Haddar, A., Kanoun, S., Alya, S.-K., & Nasri, M. (2009). Alkaline proteases and thermostable α-amylase co-produced by Bacillus licheniformis NH1 : Characterization and potential application as detergent additive. *Biochemical Engineering Journal*, *47*(1), 71-79. https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.005

Hölker, U., & Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation—Are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*, *8*(3), 301-306. https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.04.006

Huang, D.-L., Zeng, G.-M., Feng, C.-L., Hu, S., Zhao, M.-H., Lai, C., Zhang, Y., Jiang, X.-Y., & Liu, H.-L. (2010). Mycelial growth and solid-state fermentation of lignocellulosic waste by white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium under lead stress. *Chemosphere*, *81*(9), 1091-1097. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.029

Hudeckova, H., Neureiter, M., Obruca, S., Frühauf, S., & Marova, I. (2018). Biotechnological conversion of spent coffee grounds into lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, *66*(4), 306-312. https://doi.org/10.1111/lam.12849

Husgafvel, R., Karjalainen, E., Linkosalmi, L., & Dahl, O. (2016). Recycling industrial residue streams into a potential new symbiosis product – The case of soil amelioration granules. *Journal of Cleaner Production*, *135*, 90-96. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.092

Hwang, S. J., Kim, Y.-W., Park, Y., Lee, H.-J., & Kim, K.-W. (2014). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, *63*(1), 81-90. https://doi.org/10.1007/s00011-013-0674-4

I

Iglesias-Carres, L., Mas-Capdevila, A., Bravo, F. I., Aragonès, G., Arola-Arnal, A., & Muguerza, B. (2019). A comparative study on the bioavailability of phenolic compounds from organic and nonorganic red grapes. *Food Chemistry*, *299*, 125092. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125092

Ikasari, L., & Mitchell, D. A. (1996). Leaching and characterization of Rhizopus oligosporus acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(3), 171-175. https://doi.org/10.1016/0141-0229(95)00227-8

Illy, A., & Viani, R. (1995). *Espresso Coffee : The Chemistry of Quality*. Academic Press.

Ingold, C. T. (2012). *The Biology of Fungi*. Springer Science & Business Media.

Iñiguez-Covarrubias, G., Lange, S. E., & Rowell, R. M. (2001). Utilization of byproducts from the tequila industry : Part 1: agave bagasse as a raw material for animal feeding and fiberboard production. *Bioresource Technology*, *77*(1), 25-32. https://doi.org/10.1016/s0960-8524(00)00137-1

Iriondo-DeHond, A., Iriondo-DeHond, M., & del Castillo, M. D. (2020). Applications of Compounds from Coffee Processing By-Products. *Biomolecules*, *10*(9), 1219. https://doi.org/10.3390/biom10091219

J

James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A. E., Amtoft, A., Stajich, J. E., Hosaka, K., Sung, G.-H., Johnson, D., … Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, *443*(7113), 818-822. https://doi.org/10.1038/nature05110

Jarre, M., Petit-Boix, A., Priefer, C., Meyer, R., & Leipold, S. (2020). Transforming the bio-based sector towards a circular economy—What can we learn from wood cascading? *Forest Policy and Economics*, *110*, 101872. https://doi.org/10.1016/j.forpol.2019.01.017

Jenkins, R. W., Stageman, N. E., Fortune, C. M., & Chuck, C. J. (2014). Effect of the Type of Bean, Processing, and Geographical Location on the Biodiesel Produced from Waste Coffee Grounds. *Energy & Fuels*, *28*(2), 1166-1174. https://doi.org/10.1021/ef4022976

Jeong, C.-H., Jeong, H. R., Choi, G. N., Kim, D.-O., Lee, U., & Heo, H. J. (2011). Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from Erigeron annuus leaf. *Chinese Medicine*, *6*(1), 25. https://doi.org/10.1186/1749-8546-6-25

Jha, K., Khare, S. K., & Gandhi, A. P. (1995). Solid-state fermentation of soyhull for the production of cellulase. *Bioresource Technology*, *54*(3), 321-322. https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00154-9

Jiang, X., Chang, M., Jin, Q., & Wang, X. (2015). Application of phospholipase A1 and phospholipase C in the degumming process of different kinds of crude oils. *Process*

Biochemistry, *50*(3), 432-437. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.011

Jørgensen, H., & Pinelo, M. (2017). Enzyme recycling in lignocellulosic biorefineries. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, *11*(1), 150-167. https://doi.org/10.1002/bbb.1724

K

Kamini, N. R., Hemachander, C., Mala, J. G. S., & Puvanakrishnan, R. (1999). Microbial enzyme technology as an alternative to conventional chemicals in leather industry. *Current Science*, *77*(1), 80-86.

Kamsani, N., Salleh, M. Md., Yahya, A., & Chong, C. S. (2016). Production of Lignocellulolytic Enzymes by Microorganisms Isolated from Bulbitermes sp. Termite Gut in Solid-State Fermentation. *Waste and Biomass Valorization*, *7*(2), 357-371. https://doi.org/10.1007/s12649-015-9453-5

Kandra, L. (2003). α-Amylases of medical and industrial importance. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, *666-667*, 487-498. https://doi.org/10.1016/j.theochem.2003.08.073

Kar, B., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (2002). Optimization of physicochemical parameters for gallic acid production by evolutionary operation-factorial design technique. *Process Biochemistry*, *37*(12), 1395-1401. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00020-1

Karam, J., & Nicell, J. A. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *69*(2), 141-153. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199706)69:2<141::AID-JCTB694>3.0.CO;2-U

Karmee, S. K. (2018). A spent coffee grounds based biorefinery for the production of biofuels, biopolymers, antioxidants and biocomposites. *Waste Management*, *72*, 240-254. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.042

Katz, S. N. (1987). Decaffeination of Coffee. In R. J. Clarke & R. Macrae (Éds.), *Coffee : Volume 2 : Technology* (p. 59-71). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3417-7_3

Khairill Anuar M., Z. Mohd Zin, N.H. Juhari, Hasmadi M., K.L. Smedley, & M.K. Zainol. (2020). Influence of pectinase–assisted extraction time on the antioxidant capacity of Spent Coffee Ground (SCG). *Food Research*, *4*(6), 2054-2061. https://doi.org/10.26656/fr.2017.4(6).270

Kirchherr, J., Reike, D., & Hekkert, M. (2017). Conceptualizing the circular economy : An

analysis of 114 definitions. *Resources, Conservation and Recycling*, *127*, 221-232. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.09.005

Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008). Spent Coffee Grounds as a Versatile Source of Green Energy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(24), 11757-11760. https://doi.org/10.1021/jf802487s

Kopjar, M., Jakšić, K., & Piližota, V. (2012). Influence of Sugars and Chlorogenic Acid Addition on Anthocyanin Content, Antioxidant Activity and Color of Blackberry Juice During Storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, *36*(6), 545-552. https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2011.00631.x

Koshijima, T., & Watanabe, T. (2013). *Association Between Lignin and Carbohydrates in Wood and Other Plant Tissues*. Springer Science & Business Media.

Kostenberg, D., & Marchaim, U. (1993). Anaerobic digestion and horticultural value of solid waste from manufacture of instant coffee. *Environmental Technology*, *14*(10), 973-980. https://doi.org/10.1080/09593339309385372

Kourmentza, C., Economou, Ch. N., Tsafrakidou, P., & Kornaros, M. (2018). Spent coffee grounds make much more than waste : Exploring recent advances and future exploitation strategies for the valorization of an emerging food waste stream. *Journal of Cleaner Production*, *172*, 980-992. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.088

Kredics, L., Antal, Z., Szekeres, A., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C., & Nagy, E. (2005). Extracellular proteases of Trichoderma species. A review. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, *52*(2), 169-184. https://doi.org/10.1556/AMicr.52.2005.2.3

Krishna, C. (2005). Solid-State Fermentation Systems—An Overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, *25*(1-2), 1-30. https://doi.org/10.1080/07388550590925383

Kumar, B. A., Amit, K., Alok, K., & Dharm, D. (2018). Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by Aspergillus niger NFCCI 4113. *Research Journal of Biotechnology*, *13*.

Kumar, M., Singh, A., Beniwal, V., & Salar, R. K. (2016). Improved production of tannase by Klebsiella pneumoniae using Indian gooseberry leaves under submerged fermentation using Taguchi approach. *AMB Express*, *6*(1), 46. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0217-9

Kumar, V., Bahuguna, A., Ramalingam, S., & Kim, M. (2021). Developing a sustainable bioprocess for the cleaner production of xylooligosaccharides : An approach towards lignocellulosic waste management. *Journal of Cleaner Production*, *316*, 128332. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128332

Kumaran, S., Sastry, C. A., & Vikineswary, S. (1997). Laccase, cellulase and xylanase activities during growth ofPleurotus sajor-caju on sagohampas. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *13*(1), 43-49. https://doi.org/10.1007/BF02770806

Kwon, E. E., Yi, H., & Jeon, Y. J. (2013). Sequential co-production of biodiesel and bioethanol with spent coffee grounds. *Bioresource Technology*, *136*, 475-480. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.03.052

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), Article 5259. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lago, R., Antoniassi, R., & Freitas, S. (2001). Centesimal composition and amino acids of raw, roasted and spent ground of soluble coffee. *II Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil Vitoria*.

Laguerre, M., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J., Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2009). Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion : The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(23), 11335-11342. https://doi.org/10.1021/jf9026266

Lee, K.-H., Do, H.-K., Kim, D.-Y., & Kim, W. (2021). Impact of chlorogenic acid on modulation of significant genes in dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *583*, 22-28. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.10.057

Levin, L., Herrmann, C., & Papinutti, V. L. (2008). Optimization of lignocellulolytic enzyme production by the white-rot fungus Trametes trogii in solid-state fermentation using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, *39*(1), 207-214. https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.09.004

Lewandowska, U., Fichna, J., & Gorlach, S. (2016). Enhancement of anticancer potential of polyphenols by covalent modifications. *Biochemical Pharmacology*, *109*, 1-13. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.019

Leybros, J., & Frémeaux, P. (1990). Extraction solide-liquide. Aspects théoriques. *Opérations unitaires. Génie de la réaction chimique*. https://doi.org/10.51257/a-v3-j2780

Leyva-López, N., Peraza-Arias, M., Avalos-Soriano, A., Hernández, C., Lizárraga-Velázquez, C. E., & Heredia, J. B. (2021). Polyphenolic Extracts from Spent Coffee Grounds Prevent H2O2-Induced Oxidative Stress in Centropomus viridis Brain Cells. *Molecules*, *26*(20),

6195. https://doi.org/10.3390/molecules26206195

Li, N., & Zong, M.-H. (2010). Lipases from the genus Penicillium : Production, purification, characterization and applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *66*(1), 43-54. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.004

Li, X., Liu, Y., Hou, X., Peng, H., Zhang, L., Jiang, Q., Shi, M., Ji, Y., Wang, Y., & Shi, W. (2013). Chlorogenic Acid Inhibits the Replication and Viability of Enterovirus 71 In Vitro. *PLOS ONE*, *8*(9), e76007. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076007

Lim, S.-H., Ibrahim, D., & Che omar, I. (2011). Lignocellulolytic Materials-as a Raw Material for the Production of Fermentable Sugars via Solid State Fermentation. *Asian Journal of Scientific Research*, *4*. https://doi.org/10.3923/ajsr.2011.53.61

Liu, Y., & Kitts, D. D. (2011). Confirmation that the Maillard reaction is the principle contributor to the antioxidant capacity of coffee brews. *Food Research International*, *44*(8), 2418-2424. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.037

Loli, H., Narwal, S. K., Saun, N. K., & Gupta, R. (2015). Lipases in Medicine : An Overview. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *15*(14), 1209-1216. https://doi.org/10.2174/1389557515666150709122722

Lonsane, B. K. (1985). *Engineering aspects of solid state fermentation*.

Lopes, G. R., Passos, C. P., Rodrigues, C., Teixeira, J. A., & Coimbra, M. A. (2020). Impact of microwave-assisted extraction on roasted coffee carbohydrates, caffeine, chlorogenic acids and coloured compounds. *Food Research International*, *129*, 108864. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108864

López, N., Puértolas, E., Condón, S., Raso, J., & Alvarez, I. (2009). Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, *90*(1), 60-66. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.002

López-Barrera, D. M., Vázquez-Sánchez, K., Loarca-Piña, Ma. G. F., & Campos-Vega, R. (2016). Spent coffee grounds, an innovative source of colonic fermentable compounds, inhibit inflammatory mediators in vitro. *Food Chemistry*, *212*, 282-290. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.175

López-Linares, J. C., García-Cubero, M. T., Coca, M., & Lucas, S. (2021). Efficient biobutanol production by acetone-butanol-ethanol fermentation from spent coffee grounds with microwave assisted dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*, *320*, 124348. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124348

Lou, Z., Wang, H., Zhu, S., Ma, C., & Wang, Z. (2011). Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Chlorogenic Acid. *Journal of Food Science*, *76*(6), M398-M403.

https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02213.x

Lowe, E. A., Moran, S. R., & Holmes, D. B. (1995). *Fieldbook for the Development of Eco-Industrial Parks—Final Report October 1996*.

Luque De Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials : An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, *369*(1-2), 1-10. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5

Luzardo, N. M. M., & Venselaar, J. (2012). Bio-Based Targeted Chemical Engineering Education; Role and Impact of Bio-Based Energy and Resource Development Projects. *Procedia Engineering*, *42*, 214-225. https://doi.org/10.1016/j.proeng.2012.07.412

M

Mabona, N., Aboyade, W., Mollagee, M., & Mguni, L. L. (2018). Effect of moisture content on oil extraction from spent coffee grounds. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, *40*(5), 501-509. https://doi.org/10.1080/15567036.2014.915361

MacArthur, E. (2013). *Rapport_McKinsey-Towards_A_Circular_Economy.pdf*.

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. *Biochemical Engineering Journal*, *60*, 87-90. https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.10.007

Macher, J., & Hygienists, A. C. of G. I. (1999). *Bioaerosols : Assessment and Control*. ACGIH.

Maestre-Reyna, M., Liu, W.-C., Jeng, W.-Y., Lee, C.-C., Hsu, C.-A., Wen, T.-N., Wang, A. H.-J., & Shyur, L.-F. (2015). Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from Lentinus sp. *PLOS ONE*, *10*(4), e0120601. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120601

Maeztu, L., Sanz, C., Andueza, S., De Peña, M. P., Bello, J., & Cid, C. (2001). Characterization of espresso coffee aroma by static headspace GC-MS and sensory flavor profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5437-5444. https://doi.org/10.1021/jf0107959

Maillard, M.-N., & Berset, C. (1995). Evolution of Antioxidant Activity during Kilning : Role of Insoluble Bound Phenolic Acids of Barley and Malt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*(7), 1789-1793. https://doi.org/10.1021/jf00055a008

Manso, T., Lores, M., & de Miguel, T. (2021). Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *Antibiotics*, *11*(1), 46.

https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046

Mansor, A., Ramli, M. S., Abdul Rashid, N. Y., Samat, N., Lani, M. N., Sharifudin, S. A., & Raseetha, S. (2019). Evaluation of selected agri-industrial residues as potential substrates for enhanced tannase production via solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *20*, 101216. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101216

Marín, M., Sánchez, A., & Artola, A. (2019). Production and recovery of cellulases through solid-state fermentation of selected lignocellulosic wastes. *Journal of Cleaner Production*, *209*, 937-946. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.264

Massaya, J., Prates Pereira, A., Mills-Lamptey, B., Benjamin, J., & Chuck, C. J. (2019). Conceptualization of a spent coffee grounds biorefinery : A review of existing valorisation approaches. *Food and Bioproducts Processing*, *118*, 149-166. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.08.010

Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2018). Bio-refinery approach for spent coffee grounds valorization. *Bioresource Technology*, *247*, 1077-1084. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.106

McCusker, R. R., Goldberger, B. A., & Cone, E. J. (2006). Caffeine Content of Energy Drinks, Carbonated Sodas, and Other Beverages. *Journal of Analytical Toxicology*, *30*(2), 112-114. https://doi.org/10.1093/jat/30.2.112

McNutt, J., & He, Q. (Sophia). (2019). Spent coffee grounds : A review on current utilization. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *71*, 78-88. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.11.054

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. *Brazilian Journal of Microbiology*, *34*, 245-248. https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000300013

Mesías, M., & Delgado-Andrade, C. (2017). Melanoidins as a potential functional food ingredient. *Current Opinion in Food Science*, *14*, 37-42. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.007

Mestanza, M., Mori-Culqui, P. L., & Chavez, S. G. (2023). Changes of polyphenols and antioxidants of arabica coffee varieties during roasting. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1078701. https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1078701

Miao, M., & Xiang, L. (2020). Chapter Three—Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. In G. Du (Éd.), *Advances in Pharmacology* (Vol. 87, p. 71-88). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.apha.2019.12.002

Milagres, A. M. F., Santos, E., Piovan, T., & Roberto, I. C. (2004). Production of xylanase by Thermoascus aurantiacus from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. *Process Biochemistry*, *39*(11), 1387-1391. https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00272-3

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Ministerie van Landbouw. (2007). *Government Vision on the Bio-based Economy in the Energy Transition*. Nature, and Food Quality; The Hague: LNV.

Minussi, R. C., Pastore, G. M., & Durán, N. (2002). Potential applications of laccase in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *13*(6), 205-216. https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00155-3

Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2007). Phenols removal in musts : Strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *45*(3), 102-107. https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.004

Mitchell, D., Luz, L., & Krieger, N. (2011). Bioreactors for Solid-State Fermentation. *Comprehensive Biotechnology*, *2*, 347-360. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00107-0

Mitidieri, S., Souza Martinelli, A. H., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2006). Enzymatic detergent formulation containing amylase from Aspergillus niger : A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, *97*(10), 1217-1224. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.022

Mohammadian Haftcheshmeh, S., Khosrojerdi, A., Aliabadi, A., Lotfi, S., Mohammadi, A., & Momtazi-Borojeni, A. A. (2021). Immunomodulatory Effects of Curcumin in Rheumatoid Arthritis : Evidence from Molecular Mechanisms to Clinical Outcomes. In S. H. F. Pedersen (Éd.), *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (p. 1-29). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/112_2020_54

Mokrani, A., & Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (Prunus persica L.) fruit. *Separation and Purification Technology*, *162*, 68-76. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043

Molin, P., Gervais, P., Lemière, J. P., & Davet, T. (1992). Direction of hyphal growth : A relevant parameter in the development of filamentous fungi. *Research in Microbiology*, *143*(8), 777-784. https://doi.org/10.1016/0923-2508(92)90106-x

Monari, S., Ferri, M., Vannini, M., Sisti, L., Marchese, P., Ehrnell, M., Xanthakis, E., Celli, A., & Tassoni, A. (2020). Cascade strategies for the full valorisation of Garganega white grape

pomace towards bioactive extracts and bio-based materials. *PLOS ONE*, *15*(9), e0239629. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239629

Monente, C., Bravo, J., Vitas, A. I., Arbillaga, L., De Peña, M. P., & Cid, C. (2015). Coffee and spent coffee extracts protect against cell mutagens and inhibit growth of food-borne pathogen microorganisms. *Journal of Functional Foods*, *12*, 365-374. https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.006

Mongkholrattanasit, R., Nakpathom, M., & Vuthiganond, N. (2021). Eco-dyeing with biocolorant from spent coffee ground on low molecular weight chitosan crosslinked cotton. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *20*, 100389. https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100389

Montoya, S., Orrego, C. E., & Levin, L. (2012). Growth, fruiting and lignocellulolytic enzyme production by the edible mushroom Grifola frondosa (maitake). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(4), 1533-1541. https://doi.org/10.1007/s11274-011-0957-2

Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., & Coimbra, M. A. (2012). Coffee melanoidins : Structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, *3*(9), 903. https://doi.org/10.1039/c2fo30048f

Motta, F. F., Andrade, C. C., & Santana, M. H. (2013). A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan : Classification, Characterization and Applications. In A. Chandel (Éd.), *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass—Techniques, Applications and Commercialization*. InTech. https://doi.org/10.5772/53544

Mourtzinos, I., & Goula, A. (2019). Polyphenols in Agricultural Byproducts and Food Waste. In *Polyphenols in Plants* (p. 23-44). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00002-5

Mukherjee, A. K., Borah, M., & Rai, S. K. (2009). To study the influence of different components of fermentable substrates on induction of extracellular α-amylase synthesis by Bacillus subtilis DM-03 in solid-state fermentation and exploration of feasibility for inclusion of α-amylase in laundry detergent formulations. *Biochemical Engineering Journal*, *43*(2), 149-156. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.09.011

Murota, K., Nakamura, Y., & Uehara, M. (2018). Flavonoid metabolism : The interaction of metabolites and gut microbiota. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *82*(4), 600-610. https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1444467

Murray, A., Skene, K., & Haynes, K. (2017). The Circular Economy : An Interdisciplinary Exploration of the Concept and Application in a Global Context. *Journal of Business Ethics*, *140*(3), 369-380. https://doi.org/10.1007/s10551-015-2693-2

Murthy, P. S., Madhava Naidu, M., & Srinivas, P. (2009). Production of α-amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *84*(8), 1246-1249. https://doi.org/10.1002/jctb.2142

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012a). Production and Application of Xylanase from Penicillium sp. Utilizing Coffee By-products. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2), 657-664. https://doi.org/10.1007/s11947-010-0331-7

Murthy, P. S., & Naidu, M. M. (2012b). Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds from Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(3), 897-903. https://doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z

Mussatto, S. I. (2006). Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J Chem Technol Biotechnol*, 7.

Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. *Separation and Purification Technology*, *83*, 173-179. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2011.09.036

Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P. A., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011). A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, *83*(2), 368-374. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.07.063

Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Carneiro, L. M., & Teixeira, J. A. (2012). Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. *Applied Energy*, *92*, 763-768. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.020

Mussatto, S. I., Machado, E. M. S., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011). Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(5), 661-672. https://doi.org/10.1007/s11947-011-0565-z

Muthuswamy, S., & Rupasinghe, H. P. V. (2007). Fruit phenolics as natural antimicrobial agents : Selective antimicrobial activity of catechin, chlorogenic acid and phloridzin. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, *5*(3-4), 81-85.

N

Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography. A*, *1054*(1-2), 95-111.

Nagendra chari, K. L., Manasa, D., Srinivas, P., & Sowbhagya, H. B. (2013). Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from ginger (Zingiber officinale Roscoe). *Food*

Chemistry, *139*(1-4), 509-514. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.099

Navya, P. N., & Pushpa, S. M. (2013). Production, statistical optimization and application of endoglucanase from Rhizopus stolonifer utilizing coffee husk. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *36*(8), 1115-1123. https://doi.org/10.1007/s00449-012-0865-3

Navya P N, Roopali Bhoite, & Pushpa Murthy. (2012). Improved β-glucosidase production from Rhizopus stolonifer utilizing coffee husk. *International Journal of Current Research*, *4*, 123-129.

Nazzaro, F., Fratianni, F., De Feo, V., Pimentel, T. C., Coppola, R., & Cruz, A. G. (2022). Chapter 13—Polyphenols applications in food industry sector. In M. E. Pintado, J. M. A. Saraiva, & E. M. da C. Alexandre (Éds.), *Technologies to Recover Polyphenols from AgroFood By-products and Wastes* (p. 301-336). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85273-9.00002-8

Nenadis, N., & Tsimidou, M. Z. (2010). 14—Assessing the activity of natural food antioxidants. In E. A. Decker (Éd.), *Oxidation in Foods and Beverages and Antioxidant Applications* (p. 332-367). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1533/9780857090447.2.332

Nguyen, V.-T., Vo, T.-D.-H., Nguyen, T.-B., Dat, N. D., Huu, B. T., Nguyen, X.-C., Tran, T., Le, T.-N.-C., Duong, T.-G.-H., Bui, M.-H., Dong, C.-D., & Bui, X.-T. (2022). Adsorption of norfloxacin from aqueous solution on biochar derived from spent coffee ground : Master variables and response surface method optimized adsorption process. *Chemosphere*, *288*, 132577. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132577

Noury, P. (2016). *Dosage en microplaque du statut total en substances antioxydantes par la méthode du TEAC*. 13.

Nunes, F. M., & Coimbra, M. A. (2010). Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. *Phytochemistry Reviews*, *9*(1), 171-185. https://doi.org/10.1007/s11101-009-9151-7

Nunes, F. M., Cruz, A. C. S., & Coimbra, M. A. (2012). Insight into the Mechanism of Coffee Melanoidin Formation Using Modified “in Bean” Models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(35), 8710-8719. https://doi.org/10.1021/jf301527e

O

Oak, M.-H., Auger, C., Belcastro, E., Park, S.-H., Lee, H.-H., & Schini-Kerth, V. B. (2018). Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols : Role of the endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, *122*, 161-170. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.018

Obruca, S., Petrik, S., Benesova, P., Svoboda, Z., Eremka, L., & Marova, I. (2014). Utilization of oil extracted from spent coffee grounds for sustainable production of polyhydroxyalkanoates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(13), 5883-5890. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5653-3

Odegard, I., Croezen, H., & Bergsma, G. (2012). *Cascading of Biomass. 13 Solutions for a Sustainable Bio-based Economy. Making Better Choices for Use of Biomass Residues, By-products and Wastes* (p. 97) [Technical Report]. Delft. https://cedelft.eu/publications/cascading-of-biomass13-solutions-for-a-sustainable-bio-based-economy/

O'Donoghue, A. J., Mahon, C. S., Goetz, D. H., O'Malley, J. M., Gallagher, D. M., Zhou, M., Murray, P. G., Craik, C. S., & Tuohy, M. G. (2008). Inhibition of a Secreted Glutamic Peptidase Prevents Growth of the Fungus Talaromyces emersonii∗. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(43), 29186-29195. https://doi.org/10.1074/jbc.M802366200

Oestreich-Janzen, S. H. (2019). Chemistry of Coffee. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (p. B9780124095472027864). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.02786-4

Oliveira, F., Salgado, J. M., Abrunhosa, L., Pérez-Rodríguez, N., Domínguez, J. M., Venâncio, A., & Belo, I. (2017). Optimization of lipase production by solid-state fermentation of olive pomace : From flask to laboratory-scale packed-bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *40*(7), 1123-1132. https://doi.org/10.1007/s00449-017-1774-2

Oliveira, L. S., & Franca, A. S. (2015). An Overview of the Potential Uses for Coffee Husks. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (p. 283-291). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00031-0

Olsen, H. S., & Falholt, P. (1998). The role of enzymes in modern detergency. *Journal of Surfactants and Detergents*, *1*(4), 555-567. https://doi.org/10.1007/s11743-998-0058-7

Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(12), 4299-4315. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2

Otero, P., López-Martínez, M. I., & García-Risco, M. R. (2019). Application of pressurized liquid extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and phenols from Laminaria ochroleuca collected in Galicia (NW Spain). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *164*, 86-92. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.09.057

Oyenuga, A. A., & Bhamidimarri, R. (2007). *Upcycling ideas for Sustainable Construction and Demolition Waste Management : Challenges, Opportunities and Boundaries*. *6*(3).

P

Pagliano, G., Ventorino, V., Panico, A., Romano, I., Pirozzi, F., & Pepe, O. (2019). Anaerobic Process for Bioenergy Recovery From Dairy Waste : Meta-Analysis and Enumeration of Microbial Community Related to Intermediates Production. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03229

Pandey, A. (2002). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*.

Pandya, J. J., & Gupte, A. (2012). Production of xylanase under solid-state fermentation by Aspergillus tubingensis JP-1 and its application. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *35*(5), 769-779. https://doi.org/10.1007/s00449-011-0657-1

Pannu, J. S., & Kapoor, R. K. (2014). *MICROBIAL LACCASES: A MINI-REVIEW ON THEIR PRODUCTION, PURIFICATION AND APPLICATIONS*.

Panusa, A., Zuorro, A., Lavecchia, R., Marrosu, G., & Petrucci, R. (2013). Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(17), 4162-4168. https://doi.org/10.1021/jf4005719

Papadaki, E., Kontogiannopoulos, K. N., Assimopoulou, A. N., & Mantzouridou, F. Th. (2020). Feasibility of multi-hydrolytic enzymes production from optimized grape pomace residues and wheat bran mixture using Aspergillus niger in an integrated citric acid-enzymes production process. *Bioresource Technology*, *309*, 123317. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123317

Pardilhó, S., Cotas, J., Pacheco, D., Gonçalves, A. M. M., Bahcevandziev, K., Pereira, L., Figueirinha, A., & Dias, J. M. (2023). Valorisation of marine macroalgae waste using a cascade biorefinery approach : Exploratory study. *Journal of Cleaner Production*, *385*, 135672. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135672

Park Y., Kang S., Lee J., Hong S., & Kim S. (2002). Xylanase production in solid state fermentation by Aspergillus niger mutant using statistical experimental designs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *58*(6), 761-766. https://doi.org/10.1007/s00253-002-0965-0

Passos, C. P., & Coimbra, M. A. (2013). Microwave superheated water extraction of polysaccharides from spent coffee grounds. *Carbohydrate Polymers*, *94*(1), 626-633. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.088

Patel, K., & Dudhagara, P. (2020). Compatibility testing and enhancing the pulp bleaching process by hydrolases of the newly isolated thermophilic Isoptericola variabilis strain UD-6. *Biocatalysis and Biotransformation*, *38*(2), 144-160.

https://doi.org/10.1080/10242422.2019.1711067

Peng, L., Jia, X., Wang, Y., Zhu, H., & Chen, Q. (2010). Ultrasonically Assisted Extraction of Rutin from Artemisia selengensis Turcz : Comparison with Conventional Extraction Techniques. *Food Analytical Methods*, *3*(3), 261-268. https://doi.org/10.1007/s12161-009-9113-0

Pérez-Sariñana, B. Y., & Saldaña-Trinidad, S. (2017). Chemistry and Biotransformation of Coffee By-Products to Biofuels. In J. N. Latosinska & M. Latosinska (Éds.), *The Question of Caffeine*. InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.68598

Peshev, D., Mitev, D., Peeva, L., & Peev, G. (2018). Valorization of spent coffee grounds – A new approach. *Separation and Purification Technology*, *192*, 271-277. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.10.021

Pettinato, M., Casazza, A. A., Ferrari, P. F., Palombo, D., & Perego, P. (2019). Eco-sustainable recovery of antioxidants from spent coffee grounds by microwave-assisted extraction : Process optimization, kinetic modeling and biological validation. *Food and Bioproducts Processing*, *114*, 31-42. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2018.11.004

Philippoussis, A., Diamantopoulou, P., Papadopoulou, K., Lakhtar, H., Roussos, S., Parissopoulos, G., & Papanikolaou, S. (2011). Biomass, laccase and endoglucanase production by Lentinula edodes during solid state fermentation of reed grass, bean stalks and wheat straw residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(2), 285-297. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0458-8

Picot-Allain, C., Mahomoodally, M. F., Ak, G., & Zengin, G. (2021). Conventional versus green extraction techniques—A comparative perspective. *Current Opinion in Food Science*, *40*, 144-156. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009

Pinelo, M., Tress, A. G., Pedersen, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2007). Effect of Cellulases, Solvent Type and Particle Size Distribution on the Extraction of Chlorogenic Acid and Other Phenols from Spent Coffee Grounds. *American Journal of Food Technology*, *2*(7), 641-651. https://doi.org/10.3923/ajft.2007.641.651

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.-S., & Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing : A review. *Food Control*, *31*(2), 593-606. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.039

Pinjing, H., Fan, L., Hua, Z., & Liming, S. (2013). *Recent Developments in the Area of Waste as a Resource, with Particular Reference to the Circular Economy as a Guiding Principle*. https://doi.org/10.1039/9781849737883-00144

Pitt, W. G., Husseini, G. A., & Staples, B. J. (2004). Ultrasonic drug delivery – a general review. *Expert Opinion on Drug Delivery*, *1*(1), 37-56. https://doi.org/10.1517/17425247.1.1.37

Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, *30*(1), 37-44. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014

Q

Quiroz-Castañeda, R. E., Balcázar-López, E., Dantán-González, E., Martinez, A., Folch-Mallol, J., & Martínez Anaya, C. (2009). Characterization of cellulolytic activities of Bjerkandera adusta and Pycnoporus sanguineus on solid wheat straw medium. *Electronic Journal of Biotechnology*, *12*(4), 5-6. https://doi.org/10.4067/S0717-34582009000400005

R

Raghavarao, K. S. M. S., Ranganathan, T. V., & Karanth, N. G. (2003). Some engineering aspects of solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *13*(2), 127-135. https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00125-0

Raimbault, M. (1979). *Protéines d'organismes pluri-cellulaires : Les champignons filamenteux, procédés industriels.*

Rajagopalan, G., & Krishnan, C. (2008). α-Amylase production from catabolite derepressed Bacillus subtilis KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresource Technology*, *99*(8), 3044-3050. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.001

Rajesh Banu, J., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Dinesh Kumar, M., Preethi, Atabani, A. E., & Kumar, G. (2020). Biorefinery of spent coffee grounds waste : Viable pathway towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, *302*, 122821. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122821

Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009). Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*, *115*(1), 79-85. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.063

Ramos, L., Kristenson, E. M., & Brinkman, U. A. T. (2002). Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, *975*(1), 3-29. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01336-5

Rapport de l'Assemblé Nationale. (2022). *Rapport de l'Assemblé Nationale* (4830).

Rathod, N. B., Elabed, N., Punia, S., Ozogul, F., Kim, S.-K., & Rocha, J. M. (2023). Recent Developments in Polyphenol Applications on Human Health : A Review with Current

Knowledge. *Plants*, *12*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/plants12061217

Ratnayake, W. M. N., Hollywood, R., O'Grady, E., & Stavric, B. (1993). Lipid content and composition of coffee brews prepared by different methods. *Food and Chemical Toxicology*, *31*(4), 263-269. https://doi.org/10.1016/0278-6915(93)90076-B

Ravindran, R., Williams, G. A., & Jaiswal, A. K. (2019). Spent Coffee Waste as a Potential Media Component for Xylanase Production and Potential Application in Juice Enrichment. *Foods*, *8*(11), 585. https://doi.org/10.3390/foods8110585

Ravindranath, R., Khan, R. Y. A., Obi Reddy, T., Thirumala Rao, S. D., & Reddy, B. R. (1972). Composition and characteristics of Indian coffee bean, spent grounds and oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *23*(3), 307-310. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740230306

Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial Proteases Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00110

Reddy, N. S., Nimmagadda, A., & Rao, K. R. S. S. (2003). An overview of the microbial α-amylase family. *African Journal of Biotechnology*, *2*(12), Article 12. https://doi.org/10.4314/ajb.v2i12.14896

Regalado, C., García-Almendárez, B. E., Venegas-Barrera, L. M., Téllez-Jurado, A., Rodríguez-Serrano, G., Huerta-Ochoa, S., & Whitaker, J. R. (2000). Production, partial purification and properties of β-mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(9), 1343-1350. https://doi.org/10.1002/1097-0010(200007)80:9<1343::AID-JSFA651>3.0.CO;2-#

Reike, D., Vermeulen, W. J. V., & Witjes, S. (2018). The circular economy : New or Refurbished as CE 3.0? — Exploring Controversies in the Conceptualization of the Circular Economy through a Focus on History and Resource Value Retention Options. *Resources, Conservation and Recycling*, *135*, 246-264. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.08.027

Renaud, B. (2019). Les coproduits de l'industrie agroalimentaire au regard des politiques publiques : Bioéconomie, économie circulaire, gaspillage alimentaire. In *Le Déméter 2019* (p. 277-296). IRIS éditions; Cairn.info. https://doi.org/10.3917/iris.abis.2019.01.0277

Report on Industrial Enzymes Market, grandviewresearch. (2022). *Industrial Enzymes MARKET ANALYSIS, 2018-2030*.

Ribeiro, H. M., Allegro, M., Marto, J., Pedras, B., Oliveira, N. G., Paiva, A., Barreiros, S.,

Gonçalves, L. M., & Simões, P. (2018). Converting Spent Coffee Grounds into Bioactive Extracts with Potential Skin Antiaging and Lightening Effects. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *6*(5), 6289-6295. https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b00108

Robinson, J. P., Kingman, S. W., Snape, C. E., Shang, H., Barranco, R., & Saeid, A. (2009). Separation of polyaromatic hydrocarbons from contaminated soils using microwave heating. *Separation and Purification Technology*, *69*(3), 249-254. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2009.07.024

Rocha, F. T. B., Brandão-Costa, R. M. P., Neves, A. G. D., Cardoso, K. B. B., Nascimento, T. P., Albuquerque, W. W. C., & Porto, A. L. F. (2021). Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774 : Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, *93*, e20200867. https://doi.org/10.1590/0001-3765202120200867

Rochín-Medina, J. J., Ramírez, K., Rangel-Peraza, J. G., & Bustos-Terrones, Y. A. (2018). Increase of content and bioactivity of total phenolic compounds from spent coffee grounds through solid state fermentation by Bacillus clausii. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(3), 915-923. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2998-5

Rodrigues, R., Oliveira, M. B. P. P., & Alves, R. C. (2023). Chlorogenic Acids and Caffeine from Coffee By-Products : A Review on Skincare Applications. *Cosmetics*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/cosmetics10010012

Rodríguez-Valencia, N., Duque Orrego, H., Jaramillo-Cardona, C. M., & Quintero-Yepes, L. (2022). Adopción del beneficio ecológico del café en Colombia. *Avances Técnicos Cenicafé*, *543*, 1-12. https://doi.org/10.38141/10779/0543

Rosenthal, A., Pyle, D. L., & Niranjan, K. (1996). Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme and Microbial Technology*, *19*(6), 402-420. https://doi.org/10.1016/S0141-0229(96)80004-F

Rostagno, M. A., & Prado, J. M. (2013). *Natural Product Extraction : Principles and Applications*. Royal Society of Chemistry.

Roussos, S., Lonsane, B. K., Raimbault, M., & Vinegria-Gonzaez, G. (Éds.). (1997). *Advances in solid state fermentation : Proceedings of the 2nd International Symposium on Solid State Fermentation, FMS-95, Montpellier, France*. Kluwer Academic Publishers.

Rutkowska, M., Namieśnik, J., & Konieczka, P. (2017). Chapter 10—Ultrasound-Assisted Extraction. In F. Pena-Pereira & M. Tobiszewski (Éds.), *The Application of Green Solvents in Separation Processes* (p. 301-324). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805297-6.00010-3

S

Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., & Mastrocola, D. (2009). Effect of roasting degree, equivalent thermal effect and coffee type on the radical scavenging activity of coffee brews and their phenolic fraction. *Journal of Food Engineering*, *90*(1), 74-80. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.06.005

Şahin, S., Aybastıer, Ö., & Işık, E. (2013). Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from Artemisia absinthium using response surface methodology. *Food Chemistry*, *141*(2), 1361-1368. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.003

Salim, A. A., Grbavčić, S., Šekuljica, N., Stefanović, A., Jakovetić Tanasković, S., Luković, N., & Knežević-Jugović, Z. (2017). Production of enzymes by a newly isolated Bacillus sp. TMF-1 in solid state fermentation on agricultural by-products : The evaluation of substrate pretreatment methods. *Bioresource Technology*, *228*, 193-200. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.081

Samaniego Sánchez, C., Troncoso González, A. M., García-Parrilla, M. C., Quesada Granados, J. J., López García de la Serrana, H., & López Martínez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, *593*(1), 103-107. https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.04.037

Sanches-Silva, A., Testai, L., Nabavi, S. F., Battino, M., Pandima Devi, K., Tejada, S., Sureda, A., Xu, S., Yousefi, B., Majidinia, M., Russo, G. L., Efferth, T., Nabavi, S. M., & Farzaei, M. H. (2020). Therapeutic potential of polyphenols in cardiovascular diseases : Regulation of mTOR signaling pathway. *Pharmacological Research*, *152*, 104626. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104626

Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2017). Chlorogenic Acid : Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome. *Molecules*, *22*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/molecules22030358

Santana-Gálvez, J., Villela Castrejón, J., Serna-Saldívar, S. O., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2020). Anticancer potential of dihydrocaffeic acid : A chlorogenic acid metabolite. *CyTA - Journal of Food*, *18*(1), 245-248. https://doi.org/10.1080/19476337.2020.1743762

Santos, H. M., Lodeiro, C., & Capelo-Martínez, J. (2008). The Power of Ultrasound. In J. Capelo-Martínez (Éd.), *Ultrasound in Chemistry* (1re éd., p. 1-16). Wiley. https://doi.org/10.1002/9783527623501.ch1

Santos, S. A. O., Villaverde, J. J., Silva, C. M., Neto, C. P., & Silvestre, A. J. D. (2012). Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark. *The Journal of Supercritical Fluids*, *71*, 71-79. https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.07.004

Sargantanis, J., Karim, M. N., Murphy, V. G., Ryoo, D., & Tengerdy, R. P. (1993). Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, *42*(2), 149-158. https://doi.org/10.1002/bit.260420202

Sarquis, M. I. de M., Oliveira, E. M. M., Santos, A. S., & Costa, G. L. da. (2004). Production of L-asparaginase by filamentous fungi. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *99*(5), 489-492. https://doi.org/10.1590/s0074-02762004000500005

Sasaki, K., Alamed, J., Weiss, J., Villeneuve, P., López Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., & Decker, E. A. (2010). Relationship between the physical properties of chlorogenic acid esters and their ability to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, *118*(3), 830-835. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.070

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *45*(4), 287-306. https://doi.org/10.1080/1040869059096

Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, *61*(1), 263-289. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315

Schmidt, O., & Czeschlik, D. (2006). *Wood and tree fungi : Biology, damage, protection, and use*. Springer.

Schrader, K., Kiehne, A., Engelhardt, U. H., & Gerhard Maier, H. (1996). Determination of Chlorogenic Acids with Lactones in Roasted Coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *71*(3), 392-398. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199607)71:3<392::AID-JSFA597>3.0.CO;2-X

Scott, W. J. (1953). Water Relations of Staphylococcus Aureus At 30°C. *Australian Journal of Biological Sciences*, *6*(4), 549-564. https://doi.org/10.1071/bi9530549

Scully, D., Jaiswal, A., & Abu-Ghannam, N. (2016). An Investigation into Spent Coffee Waste as a Renewable Source of Bioactive Compounds and Industrially Important Sugars. *Bioengineering*, *3*(4), 33. https://doi.org/10.3390/bioengineering3040033

Seidel, V. (2012). Initial and Bulk Extraction of Natural Products Isolation. In S. D. Sarker & L. Nahar (Éds.), *Natural Products Isolation* (Vol. 864, p. 27-41). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_2

Seo, H. S., & Park, B. H. (2019). Phenolic compound extraction from spent coffee grounds for

antioxidant recovery. *Korean Journal of Chemical Engineering*, *36*(2), 186-190. https://doi.org/10.1007/s11814-018-0208-4

Shah, S., Sharma, S., & Gupta, M. N. (2004). Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil. *Energy & Fuels*, *18*(1), 154-159. https://doi.org/10.1021/ef030075z

Shang, Y.-F., Xu, J.-L., Lee, W.-J., & Um, B.-H. (2017). Antioxidative polyphenolics obtained from spent coffee grounds by pressurized liquid extraction. *South African Journal of Botany*, *109*, 75-80. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.12.011

Sharma, A., Gupta, V., Khan, M., Balda, S., Gupta, N., Capalash, N., & Sharma, P. (2017). Flavonoid-rich agro-industrial residues for enhanced bacterial laccase production by submerged and solid-state fermentation. *3 Biotech*, *7*(3), 200. https://doi.org/10.1007/s13205-017-0836-0

Shinwari, K. J. (2021). Chapter 4—Emerging technologies for the recovery of bioactive compounds from saffron species. In C. M. Galanakis (Éd.), *Saffron* (p. 143-182). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821219-6.00004-X

Shivanna, G. B., & Venkateswaran, G. (2014). Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. *The Scientific World Journal*, *2014*, e392615. https://doi.org/10.1155/2014/392615

Shrestha, P., Rasmussen, M., Khanal, S. K., Pometto, A. L. I., & van Leeuwen, J. (Hans). (2008). Solid-Substrate Fermentation of Corn Fiber by Phanerochaete chrysosporium and Subsequent Fermentation of Hydrolysate into Ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(11), 3918-3924. https://doi.org/10.1021/jf0728404

Shukor, H., Abdeshahian, P., Al-Shorgani, N. K. N., Hamid, A. A., Rahman, N. A., & Kalil, M. S. (2016). Enhanced mannan-derived fermentable sugars of palm kernel cake by mannanase-catalyzed hydrolysis for production of biobutanol. *Bioresource Technology*, *218*, 257-264. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.084

Silva, C. F., Batista, L. R., Abreu, L. M., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2008). Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (Coffea arabica) fermentation. *Food Microbiology*, *25*(8), 951-957. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.07.003

Simões, J., Nunes, F. M., Domingues, M. R., & Coimbra, M. A. (2013). Extractability and structure of spent coffee ground polysaccharides by roasting pre-treatments. *Carbohydrate Polymers*, *97*(1), 81-89. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.067

Singh Nee' Nigam, P., & Pandey, A. (Éds.). (2009). *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9942-7

Singh, S., & Bajaj, B. K. (2016). Bioprocess optimization for production of thermoalkali-stable protease from Bacillus subtilis K-1 under solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *46*(7), 717-724. https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1135455

Singh, S. K. (2017). Ex situ Conservation of Fungi : A Review. In T. Satyanarayana, S. K. Deshmukh, & B. N. Johri (Éds.), *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology* (p. 543-562). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_27

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *44*(1), 13-18. https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019

Sirkin, ted, & ten Houten, M. (1994). *The Cascade Chain A Theory and Tool for Achieving Resource Sustainability with Applications for Product Design* (3e éd., Vol. 10). Resources, Conservation and Recycling. https://www-sciencedirect-com.ressources-electroniques.univ-lille.fr/science/article/pii/0921344994900167

Smeets, P. J. A. M. (2010). *Expedition agroparks : Research by design into sustainable development and agriculture in the network society*. Wageningen Academic Publishers.

Sofía Torres-Valenzuela, L., Andrea Serna-Jiménez, J., & Martínez, K. (2020). Coffee By-Products : Nowadays and Perspectives. In D. Toledo Castanheira (Éd.), *Coffee—Production and Research*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.89508

Solomakou, N., Loukri, A., Tsafrakidou, P., Michaelidou, A.-M., Mourtzinos, I., & Goula, A. M. (2022). Recovery of phenolic compounds from spent coffee grounds through optimized extraction processes. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, *25*, 100592. https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100592

Soto-Hernández, M., Tenango, M. P., & García-Mateos, R. (2017). *Phenolic Compounds : Biological Activity*. BoD – Books on Demand.

Souza, P. M., Aliakbarian, B., Filho, E. X. F., Magalhães, P. O., Junior, A. P., Converti, A., & Perego, P. (2015). Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from Aspergillus foetidus. *International Journal of Biological Macromolecules*, *81*, 17-21. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043

Sowbhagya, H. B., & Chitra, V. N. (2010). Enzyme-assisted extraction of flavorings and colorants from plant materials. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*(2), 146-161. https://doi.org/10.1080/10408390802248775

Spigno, G., Tramelli, L., & De Faveri, D. M. (2007). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, *81*(1), 200-208. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.021

Spiller, G. (1997). *Caffeine*. CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420050134

Steudler, S., Werner, A., & Walther, T. (2019). It Is the Mix that Matters : Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. In S. Steudler, A. Werner, & J. J. Cheng (Éds.), *Solid State Fermentation : Research and Industrial Applications* (p. 51-81). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/10_2019_85

Stuart, D. M., Mitchell, D. A., Johns, M. R., & Litster, J. D. (1999). Solid-state fermentation in rotating drum bioreactors : Operating variables affect performance through their effects on transport phenomena. *Biotechnology and Bioengineering*, *63*(4), 383-391. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19990520)63:4<383::aid-bit1>3.0.co;2-n

Sung, W. S., & Lee, D. G. (2010). Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure and Applied Chemistry*, *82*(1), 219-226. https://doi.org/10.1351/PAC-CON-09-01-08

Sunna, A., & Antranikian, G. (1997). Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*, *17*(1), 39-67. https://doi.org/10.3109/07388559709146606

Sutter, S. (2017). *Valorisation du tourteau de colza par fermentation en milieu solide pour une application en alimentation animale*.

T

Tabak, H. H., & Cooke, W. B. (1968). Growth and metabolism of fungi in an atmosphere of nitrogen. *Mycologia*, *60*(1), 115-140.

Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2007). Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials : A review. *BioResources*, *2*(4), 707-738. https://doi.org/10.15376/biores.2.4.707-738

Taifouris, M., Corazza, M. L., & Martín, M. (2021). Integrated Design of Biorefineries Based on Spent Coffee Grounds. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *60*(1), 494-506. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c05246

Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters : A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/ijms150915638

Tejirian, A., & Xu, F. (2011). Inhibition of enzymatic cellulolysis by phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*, *48*(3), 239-247.

https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.11.004

Teuber, L., Osburg, V.-S., Toporowski, W., Militz, H., & Krause, A. (2016). Wood polymer composites and their contribution to cascading utilisation. *Journal of Cleaner Production*, *110*, 9-15. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.009

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*(6-7), 669-675. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003

Thomas, L., Larroche, C., & Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, *81*, 146-161. https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013

Tinikul, R., Chenprakhon, P., Maenpuen, S., & Chaiyen, P. (2018). Biotransformation of Plant-Derived Phenolic Acids. *Biotechnology Journal*, 1700632. https://doi.org/10.1002/biot.201700632

Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound : A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *71*, 100-109. https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.013

Torres-Pitarch, A., Hermans, D., Manzanilla, E. G., Bindelle, J., Everaert, N., Beckers, Y., Torrallardona, D., Bruggeman, G., Gardiner, G. E., & Lawlor, P. G. (2017). Effect of feed enzymes on digestibility and growth in weaned pigs : A systematic review and meta-analysis. *Animal Feed Science and Technology*, *233*, 145-159. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.04.024

U

Uçkun Kiran, E., Trzcinski, A. P., Ng, W. J., & Liu, Y. (2014). Enzyme Production from Food Wastes Using a Biorefinery Concept. *Waste and Biomass Valorization*, *5*(6), 903-917. https://doi.org/10.1007/s12649-014-9311-x

Usmani, Z., Sharma, M., Gaffey, J., Sharma, M., Dewhurst, R. J., Moreau, B., Newbold, J., Clark, W., Thakur, V. K., & Gupta, V. K. (2022). Valorization of dairy waste and by-products through microbial bioprocesses. *Bioresource Technology*, *346*, 126444. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126444

Uzun, U., Demirci, E., & Akatin, M. Y. (2018). Purification and characterization of Rhizoctonia solani AG-4 strain ZB-34 α-amylase produced by solid-state fermentation using corn bran. *Turkish Journal of Biochemistry*, *43*(3), 257-267. https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0159

V

Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann, T. J., Rajagopalan, K., & Sharma, B. K. (2013). Complete Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil, and Biochar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, *1*(10), 1286-1294. https://doi.org/10.1021/sc400145w

Venil, C., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). Solid state fermentation for production of L – asparaginase in rice bran by Serratia marcescens SB08. *The Internet Journal of Microbiology*, *7*(1). https://doi.org/10.5580/1d06

Venkata Mohan, S., Nikhil, G. N., Chiranjeevi, P., Nagendranatha Reddy, C., Rohit, M. V., Kumar, A. N., & Sarkar, O. (2016). Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy : Critical review and future perspectives. *Bioresource Technology*, *215*, 2-12. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.130

Vergara-Salinas, J. R., Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., Agosin, E., & Pérez-Correa, J. R. (2012). Effects of Temperature and Time on Polyphenolic Content and Antioxidant Activity in the Pressurized Hot Water Extraction of Deodorized Thyme (Thymus vulgaris). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(44), 10920-10929. https://doi.org/10.1021/jf3027759

Vicaria, J. M., Herrera-Márquez, O., Serrano-Haro, M., Vidal, A., Jurado, E., & Jiménez-Pérez, J. L. (2022). Optimization of surfactants formulations to stabilise proteases and amylases. *Chemical Engineering Science*, *260*, 117858. https://doi.org/10.1016/j.ces.2022.117858

Vignoli, J. A., Bassoli, D. G., & Benassi, M. T. (2011). Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee : The influence of processing conditions and raw material. *Food Chemistry*, *124*(3), 863-868. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.008

W

Wang, L., Pan, X., Jiang, L., Chu, Y., Gao, S., Jiang, X., Zhang, Y., Chen, Y., Luo, S., & Peng, C. (2022). The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry : A Review. *Frontiers in Nutrition*, *9*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.943911

Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2012). Roasting Process

of Coffee Beans as Studied by Nuclear Magnetic Resonance : Time Course of Changes in Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(4), 1005-1012. https://doi.org/10.1021/jf205315r

Wessel, D., & Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, *138*(1), 141-143. https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6

White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., Innis, M., Gelfand, D., & Sninsky, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *Pcr Protocols : A Guide to Methods and Applications,* (Vol. 31, p. 315-322).

Wijaya, H., Sasaki, K., Kahar, P., Quayson, E., Rachmadona, N., Amoah, J., Hama, S., Ogino, C., & Kondo, A. (2020). Concentration of Lipase from Aspergillus oryzae Expressing Fusarium heterosporum by Nanofiltration to Enhance Transesterification. *Processes*, *8*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/pr8040450

Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by Serratia marcescens. *Journal of Bacteriology*, *138*(3), 663-670. https://doi.org/10.1128/jb.138.3.663-670.1979

Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., Aguilar-Zárate, P., Ascacio-Valdés, J. A., Cruz, K., Reyes-Luna, C., Rodríguez, R., & Cristóbal N, A. (2017). *Chapter 5—Extraction of Bioactive Phenolic Compounds by Alternative Technologies*.

Wu, C., Zhang, F., Li, L., Jiang, Z., Ni, H., & Xiao, A. (2018). Novel optimization strategy for tannase production through a modified solid-state fermentation system. *Biotechnology for Biofuels*, *11*(1), 92. https://doi.org/10.1186/s13068-018-1093-0

Wu, K.-J., Chang, C.-F., & Chang, J.-S. (2007). Simultaneous production of biohydrogen and bioethanol with fluidized-bed and packed-bed bioreactors containing immobilized anaerobic sludge. *Process Biochemistry*, *42*, 1165-1171. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.05.012

X

Ximenes, E., Kim, Y., Mosier, N., Dien, B., & Ladisch, M. (2011). Deactivation of cellulases by phenols. *Enzyme and Microbial Technology*, *48*(1), 54-60. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.006

Xu, J., Dai, L., Gui, Y., Yuan, L., Ma, J., & Zhang, C. (2020). *Efficient fractionation, enzymatic hydrolysis and lithium-sulfur cathode*. 10.

Y

Yagüe, S., Terrón, M. C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G. C., & González, A. E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete Coriolopsis gallica monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *14*(10), 905-910. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000530)14:10<905::AID-RCM963>3.0.CO;2-7

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., & Matar, C. (2018). The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, *10*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/nu10111618

Yeoh, L., & Ng, K. S. (2022). Future Prospects of Spent Coffee Ground Valorisation Using a Biorefinery Approach. *Resources, Conservation and Recycling*, *179*, 106123. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.106123

Yi, J., Li, S., Wang, C., Cao, N., Qu, H., Cheng, C., Wang, Z., Wang, L., & Zhou, L. (2019). Potential applications of polyphenols on main ncRNAs regulations as novel therapeutic strategy for cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *113*, 108703. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108703

Yilmazer, C., Germec, M., & Turhan, I. (2021). Solid-state fermentation for the production of a recombinant β-mannanase from Aspergillus fumigatus expressed in Aspergillus sojae grown on renewable resources. *Journal of Food Processing and Preservation*, *45*(8), e14584. https://doi.org/10.1111/jfpp.14584

Yoon, L. W., Ang, T. N., Ngoh, G. C., & Chua, A. S. M. (2014). Fungal solid-state fermentation and various methods of enhancement in cellulase production. *Biomass and Bioenergy*, *67*, 319-338. https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.05.013

Yuliyanti, A., Manullang, M., & Ilmi, M. (2021). The effect of water content and carbon source addition on lipase production from Aspergillus aculeatus Ms.11 using spent coffee ground. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *948*, 012055. https://doi.org/10.1088/1755-1315/948/1/012055

Z

Zabaniotou, A., & Kamaterou, P. (2019). Food waste valorization advocating Circular Bioeconomy—A critical review of potentialities and perspectives of spent coffee

grounds biorefinery. *Journal of Cleaner Production*, *211*, 1553-1566. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.230

Zarrinbakhsh, N., Wang, T., Rodriguez-Uribe, A., Misra, M., & Mohanty, A. K. (2016). Characterization of Wastes and Coproducts from the Coffee Industry for Composite Material Production. *BioResources*, *11*(3), 7637-7653. https://doi.org/10.15376/biores.11.3.7637-7653

Zeng, G., Yu, M., Chen, Y., Huang, D., Zhang, J., Huang, H., Jiang, R., & Yu, Z. (2010). Effects of inoculation with Phanerochaete chrysosporium at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting. *Bioresource Technology*, *101*(1), 222-227. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.08.013

Zhang, H., & Sang, Q. (2015). Production and extraction optimization of xylanase and β-mannanase by Penicillium chrysogenum QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochemical Engineering Journal*, *97*, 101-110. https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.02.014

Zhao, D., Zhang, X., Wang, Y., Na, J., Ping, W., & Ge, J. (2020). Purification, biochemical and secondary structural characterisation of β-mannanase from Lactobacillus casei HDS-01 and juice clarification potential. *International Journal of Biological Macromolecules*, *154*, 826-834. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.157

Zimmermann, B., & Gleichenhagen, M. (2011). *The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea : How to get most out of it*. *124*, 1543-1548. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.009

Zuorro. (2013). INFLUENCE OF EXTRACTION CONDITIONS ON THE RECOVERY OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS FROM SPENT COFFEE GROUNDS. *American Journal of Applied Sciences*, *10*(5), 478-486. https://doi.org/10.3844/ajassp.2013.478.486

Zuorro, A., & Lavecchia, R. (2012). Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production*, *34*, 49-56. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2011.12.003

Zuorro & Lavecchia. (2011). Polyphenols and energy recovery from spent coffee grounds. *Chemical Engineering Transactions*, *25*, 285-290. https://doi.org/10.3303/CET1125048

Annexes

Tableau 1. Réponses observées et prédites par le modèle pour les 19 essais du plan expérimental de production du cocktail enzymatique sur marc frais appauvri

n°	*Paramètres (Valeur codée)*			*L* *U/g dm*		*M* *mU/g dm*		*G* *mU/g dm*	
	H	*D*	*I*	*observée*	*prédite*	*observée*	*prédite*	*observée*	*prédite*
1	-1	-1	-1	15,30	14,43	385,10	362,08	101,26	99,97
2	1	-1	-1	32,38	33,24	619,12	610,02	166,41	160,85
3	-1	1	-1	16,33	15,54	162,93	187,01	75,75	74,83
4	1	1	-1	36,47	38,10	672,44	688,23	141,85	148,93
5	-1	-1	1	19,35	18,61	485,81	461,91	121,95	114,95
6	1	-1	1	35,31	36,99	823,51	791,31	196,97	197,98
7	-1	1	1	22,89	22,93	284,38	285,36	109,97	115,61
8	1	1	1	43,28	45,06	853,14	868,04	210,47	211,85
9	-1	0	0	25,48	27,84	482,85	504,71	114,14	117,71
10	1	0	0	54,26	48,31	909,42	920,02	200,19	196,28
11	0	-1	0	44,79	43,86	556,91	645,12	135,84	148,68
12	0	1	0	51,11	48,44	651,70	595,95	156,22	143,04
13	0	0	-1	48,92	48,08	553,95	546,18	99,60	100,29
14	0	0	1	56,40	53,65	645,78	686,00	140,26	139,24
15	0	0	0	51,24	53,49	743,53	708,63	146,03	141,00
16	0	0	0	48,71	53,49	758,34	708,63	138,41	141,00
17	0	0	0	55,18	53,49	681,32	708,63	141,59	141,00
18	0	0	0	53,95	53,49	702,06	708,63	145,82	141,00
19	0	0	0	51,17	53,49	722,80	708,63	132,45	141,00
	Std. Dev.			2,55	3,41	30,97	48,43	5,57	8,59

Std. Dev = écart-type

Tableau 2. Analyse ANOVA du plan d'expérience des conditions de culture pour la production du cocktail enzymatique sur du marc frais appauvri

	L			M			G		
	Mean square	*F-value*	*p-value*	*Mean square*	*F-value*	*p-value*	*Mean square*	*F-value*	*p-value*
Modèle	394,27	33,83	< 0,0001	71091,26	30,31	< 0,0001	2381,04	32,28	< 0,0001
M	1047,41	89,86	< 0,0001	4,31E+05	183,83	< 0,0001	15430,77	209,22	< 0,0001
D	52,67	4,52	0,0625	6045,16	2,58	0,1429	79,29	1,08	0,3268
I	77,48	6,65	0,0298	48873,77	20,84	0,0014	3792,93	51,43	< 0,0001
M*D	7,02	0,6026	0,4575	32074,07	13,67	0,0049	87,3	1,18	0,3049
M*I	0,0933	0,008	0,9307	3318,08	1,41	0,2647	245,09	3,32	0,1016
D*I	5,13	0,4403	0,5236	1,1	0,0005	0,9832	332,63	4,51	0,0627
M^2	649,08	55,69	< 0,0001	38,24	0,0163	0,9012	699,21	9,48	0,0132
D^2	147,09	12,62	0,0062	21202,78	9,04	0,0148	64,6	0,876	0,3737
I^2	18,81	1,61	0,2358	23395,75	9,97	0,0116	1232,08	16,71	0,0027
R^2		0,9713			0,9681			0,97	
Adj. R^2		0,9426			0,9361			0,9399	
Pred. R^2		0,8522			0,7957			0,7489	
Adeq Pr		15,8332			20,8618			21,9922	

NB : Mean square : Moyenne carrée ; Adj. R^2 = R^2 ajusté ; Pred.R^2 = R^2 prédit

Le modèle polynomial du deuxième ordre pour l'activité de la lipase était exprimé par l'Équation 1, pour l'activité de l'endo-β-1,4-mannanase par l'Équation 2 et pour l'activité de l'endo-β-1,4-glucanase par l'Équation 3.

(Equation 1) $Y_L = +53,49 + 10,23\ M + 2,29\ D + 2,78\ I + 0,94\ M*D - 0.11\ M*I + 0,8\ D*I - 15,41\ M^2 - 7,34\ D^2 - 2,62\ I^2$

(Equation 2) $Y_M = +708,63 + 207,66\ M - 24.59\ D + 69,91\ I + 63,32\ M*D + 20,37\ M*I - 0,37\ D*I + 3,74\ M^2 - 88,09\ D^2 - 92,53\ I^2$

(Equation 3) $Y_G = +141 + 39,28\ M - 2,82\ D + 19,48\ I + 3,3\ M*D + 5,54\ M*I + 6,45\ D*I + 16\ M^2 + 4,86\ D^2 - 21,23\ I^2$



Figure 1. Photo de la colonisation par *Penicillium solitum* du marc de café frais appauvri (5 g dans un Erlenmeyer de 50 mL) après 7 jours de fermentation à 25°C, à une humidité de 75% et avec un inoculum de 10^7 spores/g. A : vue latérale ; B : vue de dessous

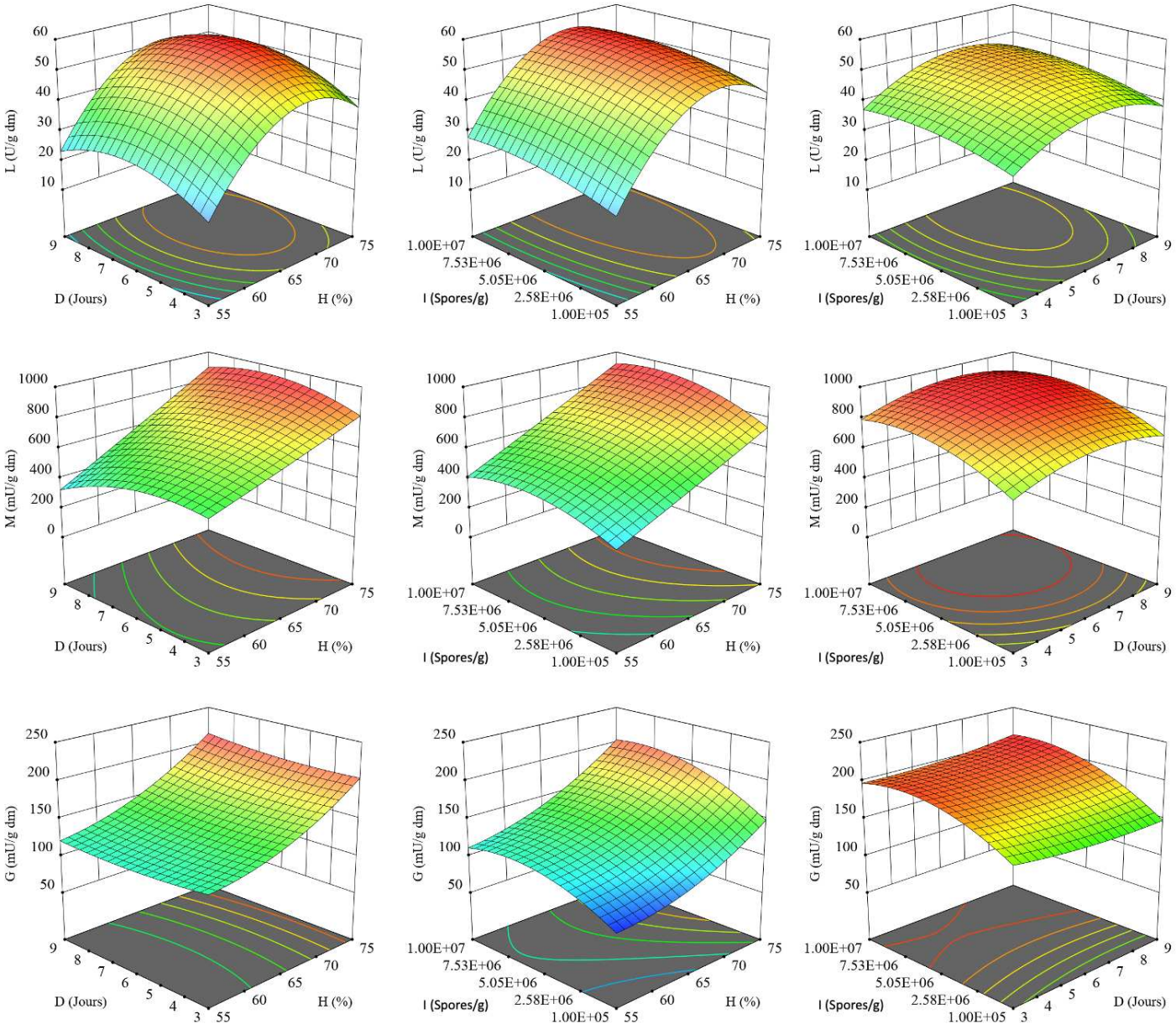

Figure 2. Surfaces de réponse des trois activités étudiées du cocktail produit sur marc frais appauvri par *Penicillium solitum*. Les valeurs des paramètres fixes non affichés sont les valeurs optimisées obtenues section 4.2 du chapitre 3 : 74,9% d'humidité, une durée de fermentation de 7,2 jours et un inoculum de 8,1x10^6 spores/g