

# **Caractérisation d'un extrait de café vert en vue du développement d'une boisson à vertu énergisante**

Ing. N. LEBEAU  
Ing. C. SAUSSEZ  
Dr Ir V. JERKOVIC  
CERISIC – Mons

*Le présent projet a pour objectif la mise au point d'un extrait végétal à partir d'une mouture de café vert et, à partir de cet extrait, la formulation d'une boisson énergisante. L'article rédigé fait état du projet à mi-parcours et présente les étapes mises en place en vue d'obtenir un extrait de café vert concentré, limpide et stable.*

*Mots clefs : café vert, caféine, boisson énergisante, extrait végétal, acide chlorogénique, antioxydant*

*This project is about the development of a vegetal extract from ground green coffee and the formulation of an energy drink from this extract. This article talks about the progression of the project who is at its mid-point. The different steps will be shown to obtain a concentrated, clear and stable green coffee extract.*

*Key words : green coffee, caffeine, energy drink, vegetal extract, chlorogenic acid, antioxidant*

## 1. Introduction

Le projet CAVENAT est un projet FIRST Haute École développé au CERISIC, le Centre d'Études et de Recherche des catégories agronomique, paramédicale et technique de la Haute École Louvain en Hainaut. Ce projet vise le développement d'une boisson énergisante à partir d'une mouture de café vert.

Le café est une boisson très populaire. En Belgique, c'est l'équivalent d'un peu plus de 1,1 milliard (2014) de dollars US de café vert qui sont importés par an [1] ce qui positionne la Belgique en cinquième position sur la liste des plus grands importateurs de café.

Le café, pour être consommé, est traditionnellement torréfié, moulu et infusé. Cette préparation a vu son côté marketing exploité de long en large avec, par exemple, l'apparition, cette dernière décennie, des pads et autres capsules de café. Mais qu'en est-il de la préparation en tant que telle ?

Le but du projet est de revenir aux origines du café en exploitant le café vert brut, sans torréfaction, afin de développer une nouvelle boisson. Cette boisson exploiterait le café en tant que source énergisante, grâce à la caféine présente, mais également en tant que source d'antioxydants grâce aux nombreux polyphénols et acides-phénols que le café vert contient [2].

L'élaboration de l'extrait est réalisée à l'aide d'un outil initialement prévu pour le brassage : le Braumeister. L'extraction à l'aide du Braumeister est optimisée afin d'extraire le maximum de composés d'intérêts de la mouture de café vert. Trois paramètres sont envisagés afin d'atteindre cet objectif : la température, le pH ainsi que la présence ou l'absence d'un gaz inerte en vue de protéger l'extrait de l'oxydation.

Une fois ces paramètres optimisés, une problématique est apparue : la formation progressive d'un trouble au froid, observée lors de la conservation de l'extrait. Cet article aborde la nature de ce trouble ainsi que la méthode mise en place pour l'éliminer.

## **2. Partie bibliographique et développement de méthodes d'analyses**

### **2.1. Le café vert**

Le café vert est l'état du grain n'ayant pas subi de torréfaction. La torréfaction est un processus thermique appliqué au grain de café. Ce processus a lieu à haute température, entre 200 et 300 °C pendant une vingtaine de minutes, et apporte au café ses arômes torréfiés. Lors de ce processus, un grand nombre de molécules sont décomposées. Certaines de ces molécules ont des propriétés bioactives [3].

Trois molécules bioactives retiennent l'intérêt quant à l'utilisation du café vert :

- La caféine : elle est à l'origine de la propriété énergisante du café. Elle est présente à une teneur comprise entre 0,5 et 3,5% de la masse sèche.
- La trigonelline : cette molécule fait l'objet d'études multiples et montre des effets bénéfiques dans de nombreuses maladies tels que le diabète et des maladies du système nerveux central [4]. Elle représente environ 1% de la masse sèche.
- L'acide chlorogénique : c'est un acide-phénol dont la propriété principale est son pouvoir antioxydant important [5].

De ces trois molécules bioactives, la trigonelline et l'acide chlorogénique sont en grande partie dégradés lors de la torréfaction. L'extraction à partir de la mouture de café vert est mise en œuvre en vue de récupérer ces molécules et de les valoriser dans un extrait végétal d'abord et dans une boisson ensuite.

Ces trois molécules bioactives identifiées, une méthode de dosage est envisagée en vue de suivre la concentration de ces différents composés. Ces dosages sont réalisés grâce à une méthode HPLC.

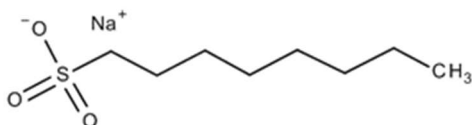
### **2.2. Méthode de quantification par HPLC-UV**

Lors de recherches bibliographiques visant à déterminer une méthode de dosage de la caféine, de la trigonelline et des acides chlorogéniques, une technique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été identifiée pour séparer et doser ces trois composés. La technique HPLC étant maîtrisée au CERISIC, ce choix a été retenu. La technique de chromatographie appliquée ici est dite de l'« ion pairing » ou appariement d'ions [6].

*Principe :*

Cette technique permet de séparer sur une colonne de phase inverse (colonne apolaire) à la fois des composés polaire et apolaire.

L'« ion pairing » joue sur l'ajout, dans la phase mobile, d'un sel possédant une partie polaire et apolaire. Un des sels répondant à cette exigence est le sel de sodium de l'acide octane sulfonique (figure 1).



*Figure 1 : formule du sel de sodium de l'acide octane sulfonique*

Lorsque la phase mobile contenant ce sel est délivrée sur une colonne de phase inverse, la partie linéaire des ions octane-sulfonique interagit avec la phase stationnaire de la colonne. Cette dernière est alors remaniée de façon provisoire afin de pouvoir interagir avec des molécules polaires, mais également apolaires. En effet, tous les sites de la phase stationnaire ne sont pas saturés par le sel, ce qui permet de garder une liberté d'interactions entre la phase stationnaire et les molécules apolaires. L'acide chlorogénique et ses isomères sont détectés à 220 nm et la trigonelline et la caféine sont détectés à 320 nm. Les résultats sont traités par l'intermédiaire d'une droite d'étalonnage réalisée à l'aide des standards correspondant aux trois composés : la caféine, la trigonelline et l'acide chlorogénique.

### **2.3. Quantification par la méthode du Biuret**

Il est nécessaire de préciser que 8 à 12 % de la masse sèche du café se trouve être des protéines et des peptides [7]. Une partie de ces protéines, suite à l'extraction aqueuse, se retrouve en solution dans l'extrait. La méthode du Biuret permet de quantifier ces protéines en solutions.

La méthode du Biuret est une méthode permettant de quantifier, à l'aide d'une droite d'étalonnage, la concentration en protéine présente dans une solution. La méthode est basée sur l'interaction qui peut exister entre un ion cuivrique et les protéines. L'importance de leur interaction est quantifiée selon une méthode colorimétrique et mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

*Principe :*

Lorsqu'un ion cuivrique se trouve en milieu alcalin en présence de protéines, un complexe se forme entre l'ion cuivrique et les doublets non liants des azotes aminés présents au niveau des protéines. Le complexe formé est de couleur violette (absorbance maximale à 540 nm) tandis que l'ion seul présente une coloration bleue, n'interférant pas avec l'absorbance du complexe. Le réactif mis en œuvre pour la réaction est le réactif de Gornall. Ce dernier est une solution alcaline qui se compose de sulfate de cuivre pentahydraté, de tartrate sodico potassique et d'iodure de potassium [8].

L'inconvénient de cette technique est qu'elle est peu sensible, elle ne réagit qu'aux concentrations importantes de protéines (de l'ordre du gramme par litre) et elle est soumise à des interférences avec, notamment, les polyphénols. L'avantage de cette méthode est qu'elle est peu spécifique et qu'elle réagit donc de la même façon pour l'ensemble des protéines.

Le café vert est une source de composés phénoliques dont les acides chlorogéniques sont les représentant majoritaires. Dès lors, il s'avère nécessaire de préparer l'échantillon d'extrait de café vert afin d'en supprimer ces composés phénoliques. La méthode retenue pour séparer les composés phénoliques des protéines est l'extraction sur phase solide C18 (solid phase extraction en anglais, acronyme : SPE). Le principe est celui de la chromatographie préparative : les composés apolaires sont retenus sur une phase stationnaire apolaire de type C18 (chaînes de 18 carbones permettant de retenir les composés apolaires sur la phase solide). Au contraire, les composés polaires, entre autres les protéines solubles dans le cas de l'extrait, sont élués à travers la phase solide sans être retenus. Cette méthode permet ainsi de récupérer les protéines solubles présentes dans l'extrait et de les doser par la suite par la méthode du Biuret.

### **3. Obtention de l'extrait végétal**

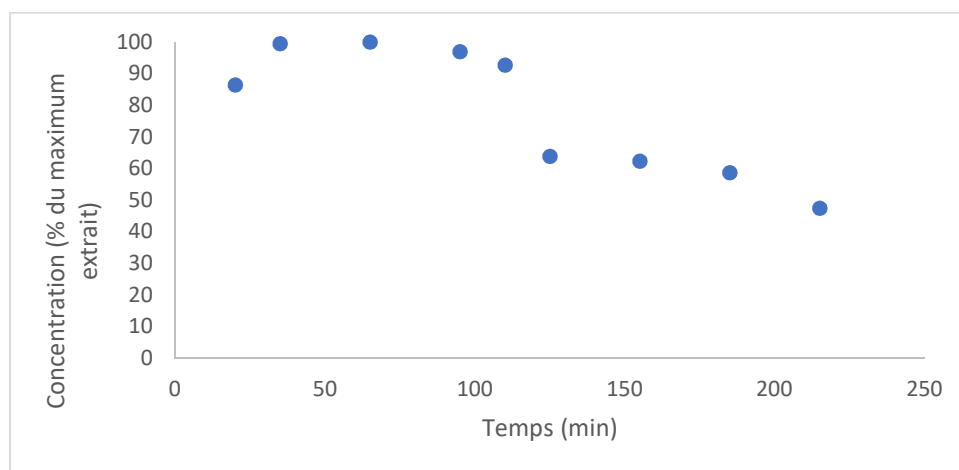
#### **3.1. Optimisation de l'extraction végétale**

*Évaluation de l'extraction en fonction de la présence de gaz inerte*

Différentes cinétiques d'extractions ont été réalisées. Celles-ci permettent d'analyser le comportement des molécules d'intérêts au cours de l'extraction. Elles permettent de mettre en évidence différentes grandeurs d'importances : la concentration maximale atteignable avec un jeu de paramètres donnés, la durée de l'extraction afin d'atteindre cette valeur maximale ainsi que la détérioration potentielle de molécules d'intérêt.

### Cinétique d'extraction sans gaz inerte

Une première cinétique d'extraction a été réalisée sans bullage d'azote, et ce afin de vérifier une hypothèse : l'oxygène présent dans l'eau d'extraction ainsi que dans l'atmosphère du Braumeister peut nuire à l'extraction de certaines molécules d'intérêts. Seul le graphique de la cinétique d'extraction de l'acide chlorogénique (figure 2) est présenté, mais les autres composés présentent une allure de courbe similaire.



*Figure 2 : Cinétique d'extraction de l'acide chlorogénique au cours du temps en absence de gaz inerte*

Cette cinétique d'extraction, pour un jeu de paramètres donné en milieu non protégé, montre que, après une heure, la concentration maximale en acide chlorogénique est atteinte et qu'une dégradation progressive a lieu à partir de ce moment. Si une dégradation a lieu à partir du moment où la concentration maximale est atteinte, il est très probable que cette dégradation ait déjà lieu pendant la phase montante de l'extraction. Une partie de l'acide chlorogénique est déjà perdue.

### Cinétique d'extraction avec bullage d'azote au sein de l'eau d'extraction

L'objectif est donc de protéger l'extrait. Le bullage d'azote a été choisi comme première approche (figure 3). Mis à part ce bullage, les autres paramètres sont inchangés.

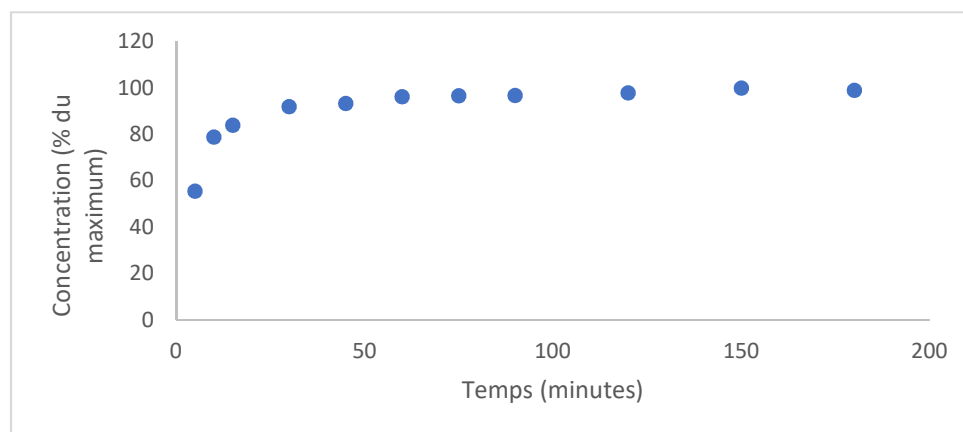


Figure 3 : Cinétique d'extraction de l'acide chlorogénique au cours du temps en présence de gaz inerte

La conclusion qui se dégage de cette extraction est qu'il n'y a plus de dégradation des composés avec le bullage d'azote. En conséquence de quoi, une concentration plus importante d'acide chlorogénique, mais également des autres composés d'intérêts, est atteignable en protégeant l'extrait de l'oxydation. L'hypothèse de départ, prônant la dégradation des acides chlorogéniques sans protection contre l'oxydation, est vérifiée. L'utilisation de l'azote pour protéger l'extrait est conservée.

#### *Évaluation de l'extraction en fonction de la température à un pH donné*

Les paramètres de cette expérience sont les suivants :

- Le pH : il est abaissé à l'aide d'acide citrique.
- Le temps d'extraction : il est fixé suite aux cinétiques d'extractions réalisées.
- Le volume d'eau introduit.
- La quantité de mouture de café vert introduite
- Le bullage à l'azote afin de préserver l'extrait de l'oxydation.

En réalisant neuf expériences sur un même lot de café vert (3 expériences pour 3 températures testées : T1, T2 et T3 où  $T1 < T2 < T3$ ), une valeur moyenne de concentration des différents analytes a pu être définie et avec elle, des valeurs d'écart-type, et ce pour les trois températures testées. Les valeurs d'écart-types représentent donc l'influence de la méthode d'extraction, de la méthode de préparation des échantillons et de l'analyse HPLC réalisée. Les résultats sont illustrés à la figure 4 pour un analyte, la trigonelline.

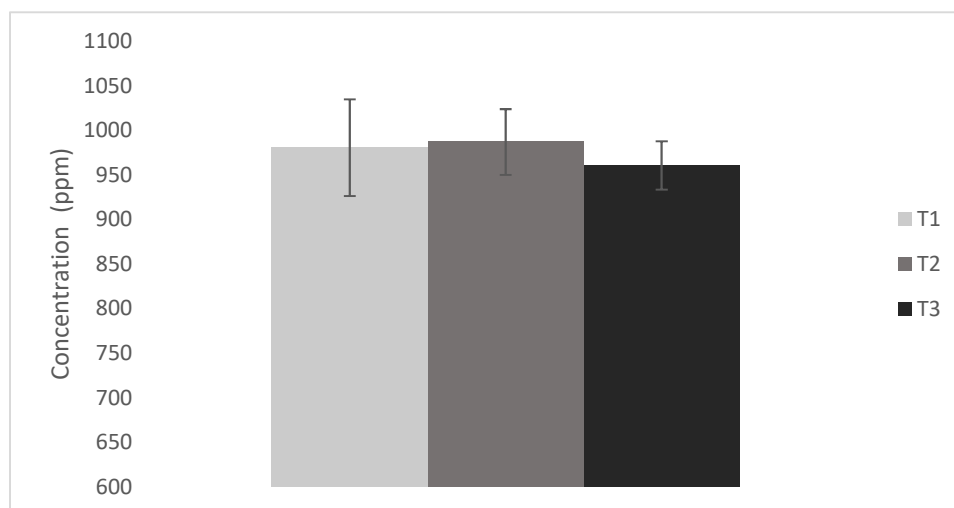


Figure 4 : graphique de la concentration moyenne en trigonelline : test de 3 températures d'extractions

Une étude visuelle des graphiques indique que l'ensemble des résultats, en considérant les écarts-types, se trouvent dans la même gamme de concentration. Une analyse statistique de ces résultats permet de confirmer cette observation, une analyse de la variance par la loi normale (ANOVA) est réalisée. Un test T de Student permet par la suite de montrer que les moyennes ne sont pas significativement différentes les unes des autres.

La conclusion qui se dégage de ces différents tests et observations est que la variation de température n'a pas d'impact sur la concentration en analytes : la température la plus faible évaluée, T1, est suffisante que pour extraire le maximum de composés de la mouture de café vert. Cette température sera donc retenue pour l'ensemble des extractions réalisées ultérieurement.

*Évaluation de l'extraction en fonction du pH à une température donnée :*

La même démarche est entreprise afin de visualiser l'influence du pH de l'eau d'extraction sur les concentrations finales d'analytes d'intérêts : Les paramètres fixés pour cette expérience sont :

- La température : elle est maintenue à T1 suite aux tests sur la température.
- Le temps d'extraction : il est fixé à la suite des cinétiques d'extractions réalisées.
- Le volume d'eau introduit.
- La quantité de mouture de café vert introduite.
- Le bullage à l'azote afin de préserver l'extrait de l'oxydation.



De la même manière que pour la température, neuf expériences sur un même lot de café vert (3 expériences pour 3 pH testés : un pH acide, un neutre et un dernier basique) ont été réalisées et les valeurs moyennes de concentration des différents analytes ont pu être définies et avec elles, des valeurs d'écart-types. Ces valeurs d'écart-types représentent donc l'influence de la méthode d'extraction, de la méthode de préparation des échantillons et de l'analyse HPLC réalisée. Les résultats sont illustrés à la figure 5 pour un analyte, la trigonelline.

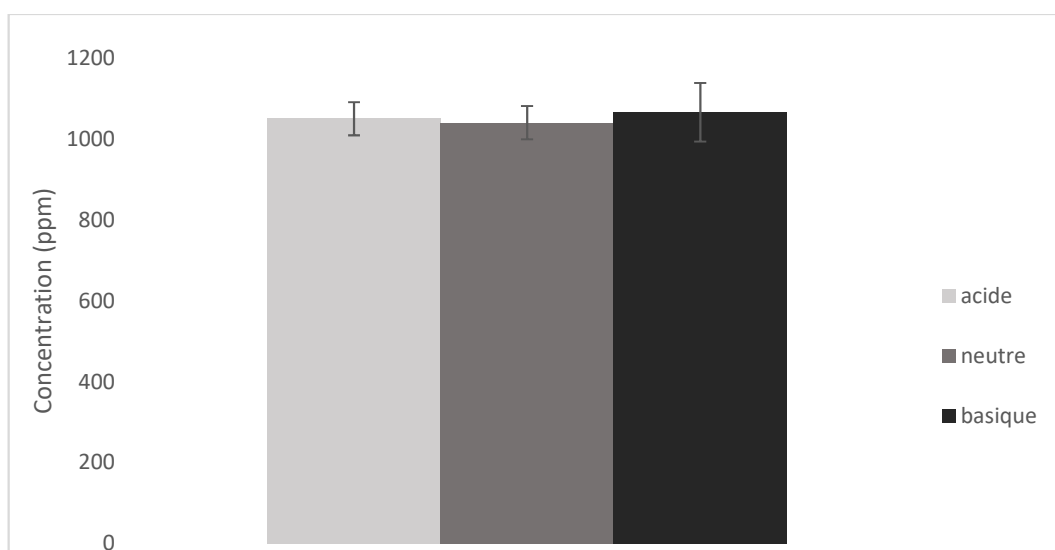


Figure 5 : Graphique de la concentration moyenne en trigonelline : test de 3 pH d'extractions

Comme dans le cas de la température, les valeurs ne divergent ni concernant les moyennes ni sur l'importance de leurs écarts-types. Les mêmes tests statistiques (ANOVA et T de Student) ont été réalisés afin d'appuyer ces résultats. Ces deux tests permettent de dire que les trois moyennes ne sont pas significativement différentes.

Ainsi, comme pour la température, le pH n'influence pas significativement l'extraction des différents composés d'intérêts (ces différents tests ont été réalisés également pour la caféine et les acides chlorogéniques).

Le pH de travail peut donc être défini comme celui le plus à même de répondre aux exigences du futur produit. Un pH acide permet de limiter le développement de moisissures et de certaines bactéries [9] dont des pathogènes tel que Salmonella. C'est pourquoi un pH acide sera utilisé pour la suite des extractions.

### 3.2. Le trouble au froid

#### *Nature du trouble au froid*

L'extrait obtenu, ce dernier est conservé à 4°C. Lors de cette conservation, un trouble, formant progressivement un dépôt, apparaît. Des recherches bibliographiques ont eu lieu afin d'identifier la nature de ce dépôt et ont mis au jour le fait que la présence de protéine dans l'extrait pouvait être responsable de la précipitation, et ce en interagissant avec les polyphénols présents. Cette hypothèse est tirée de travaux traitant de la formation de sédiments réversibles et irréversibles dans le thé vert [10]. Certains de ces sédiments (réversibles) sont formés de polyphénols, de caféine, de protéines et d'autres substances minérales.

L'hypothèse formulée est celle d'une casse protéique. En effet, le café contient de 8 à 12 % de protéines [7]. La partie soluble de ces dernières est donc susceptible de passer en solution lors de l'extraction. Or le café vert contient également des tannins et autres composés phénoliques susceptibles de précipiter les protéines, expliquant la formation de ce trouble. Différents tests ont été mis en place afin de définir sa nature.

#### 1) Déstabilisation du pH

Un premier moyen de visualiser la présence de protéines dans une solution consiste à modifier le pH de cette dernière. Les protéines ont leur maximum de solubilité à un pH bien précis. Ce pH est nommé point isoélectrique d'une protéine. Au point isoélectrique, la protéine est sous sa forme zwitterionique, sa forme neutre, elle est ainsi solvatée de manière maximale. Lorsque le pH est modifié de ce point isoélectrique, la protéine perd en solvatation, ce qui provoque la déstabilisation de la solution, la précipitation des protéines.

#### **Protocole expérimental :**

Ce test est mis en œuvre en ajoutant, dans le cas du café vert, un acide à l'extrait. Cet acide est de l'acide lactique alimentaire à 80 % W/V. Le pH de la solution est modifié jusqu'à atteindre le pH acide sélectionné. En effet, malgré la mise à pH de l'eau d'extraction, en fin de processus, l'extrait présente un pH plus élevé qu'au départ et peut être abaissé.

### Observations :

Lorsque le pH de l'extrait est modifié, il est observable que la solution présente une déstabilisation et une nette précipitation. Cette précipitation ne prouve pas pour autant que les protéines soient en cause de la déstabilisation observée dans l'extrait frais, mais elle vient alimenter la réflexion dans ce sens.

Une donnée supplémentaire vient appuyer cette hypothèse : l'analyse des composés d'intérêts par HPLC. Le traitement des données de cette analyse (illustré à la figure 6) montre que malgré la précipitation due à l'acidification, les concentrations des différents composés d'intérêts restent inchangées ou varient de manière non significative. Ceci démontre que ni les alcaloïdes (caféine et trigonelline) ni les acides-phénols (les acides chlorogéniques) ne sont impliqués dans cette précipitation.

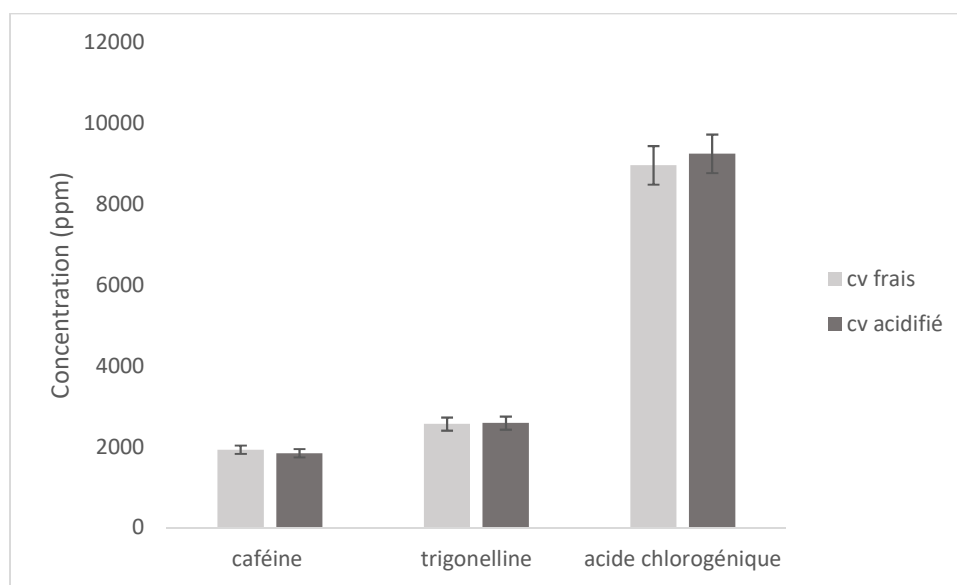


Figure 6 : Concentration des différents composés d'intérêts : échantillon de café vert frais et acidifié

### 2) Précipitation à l'acide tannique

Une deuxième manière de révéler la présence de protéines consiste en l'ajout d'acide tannique. En effet, les tannins réagissent avec les protéines et précipitent. Les interactions tannin/protéines dans l'extrait sont d'ailleurs une hypothèse quant à l'existence du trouble dans l'extrait frais.

**Principe :**

L'acide tannique, molécule formée d'acide gallique et de glucose, est un polyphénol faisant partie de la famille des tannins. Cette molécule, comme les autres tannins, a la capacité de précipiter les protéines en solution. La précipitation a lieu suite aux interactions qui peuvent exister entre tannins et protéines. Ces interactions sont de types pont hydrogène et de Van Der Waals (liaison hydrophobe). Ces liaisons provoquent ainsi la formation d'un complexe protéines/tannins qui précipite.

Cependant, les recherches bibliographiques ont montré que les polyphénols, dont l'acide tannique, peuvent réaliser des complexes également avec les alcaloïdes [11] dont font partie la caféine et la trigonelline. La précipitation induite par l'ajout d'acide tannique implique donc également la précipitation de caféine et de trigonelline. La formation du précipité ne permet donc pas directement de mettre en évidence la présence de protéine.

**Manipulations et Observations :**

La réaction est réalisée en ajoutant 250 µl d'acide tannique à 30% W/V à 10 ml d'extrait de café vert. Un second ajout de 250 µl est réalisé après centrifugation et élimination du culot.

La mise en œuvre de la réaction permet de constater la formation quasi instantanée d'un précipité. Ce précipité, comme dit précédemment, est non seulement un précipité formé par l'acide tannique et les protéines, mais également par les alcaloïdes que sont la trigonelline et la caféine.

Cependant, des tests à différentes températures ont été réalisés. L'hypothèse de travail est qu'en fonction de la température, l'acide tannique va préférentiellement précipiter la caféine ou les protéines. L'analyse HPLC du surnageant est alors réalisée et les résultats analysés (figure 7).

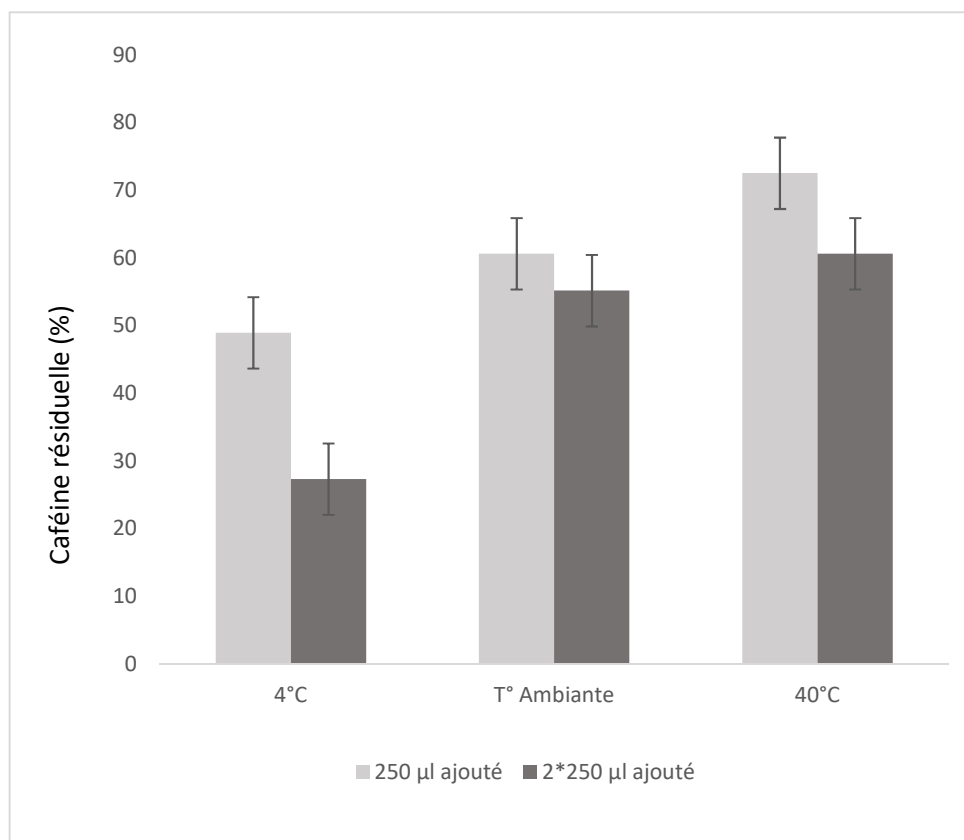


Figure 7 : Pourcentage de caféine résiduelle suite à différents tests de précipitation à l'acide tannique sur l'extrait de café vert

La caféine réagit avec l'acide tannique, et ce de manière différente en fonction de la température du milieu réactionnel (figure 7). La caféine perd, à faible température, plus de 50 % de sa concentration initiale suite à l'ajout de l'acide tannique. Il est à noter qu'après ce premier ajout, une clarification de l'extrait est observée. Un second ajout permet de clarifier d'autant plus l'extrait en enregistrant cependant de nouvelles pertes en alcaloïdes.

En conclusion, une précipitation a bien lieu lorsque l'acide tannique est ajouté à l'extrait de café vert. Précipitation qui entraîne également une clarification de l'extrait. Malheureusement, cette précipitation emporte avec elle une quantité non négligeable d'alcaloïdes. Aucune méthode permettant la différenciation entre le précipité protéique présumé et d'alcaloïdes n'a été mise en place.

### *Élimination du trouble : la filtration tangentielle*

En conservant l'hypothèse de départ, à savoir l'origine protéique du trouble, une des possibilités pour le supprimer consiste en une filtration tangentielle, plus précisément, en une microfiltration. Les recherches bibliographiques ont démontré que les protéines solubles majoritairement présentes dans le café vert se retrouvent sous forme hexamérique, ayant un poids moléculaire de plus de 300 kDa [12]. À partir de cette donnée, le seuil de coupure de la membrane nécessaire à la filtration de l'extrait végétal est connu.

#### **Observations :**

La première observation est que la filtration tangentielle une fois réalisée permet d'obtenir un extrait limpide. Cette clarification est due au fait que l'ensemble des molécules en suspension ont été retenues sur la membrane ainsi que l'ensemble de la fraction des composés solubles supérieurs à 300 kDa, environ 0,3  $\mu\text{m}$ , dont une grande partie des protéines contenues dans le café vert.

Au-delà de la clarification, il est nécessaire de vérifier que l'extrait reste stable dans le temps et que la filtration réalisée est bien suffisante à neutraliser l'apparition du trouble. Une conservation à 4 °C a été réalisée pendant 1 semaine, aucun dépôt n'est à déplorer et l'extrait conserve sa limpidité. L'extrait est ensuite analysé par HPLC en vue de définir si la filtration a eu un effet quelconque sur les molécules d'intérêt de l'extrait (figure 8).

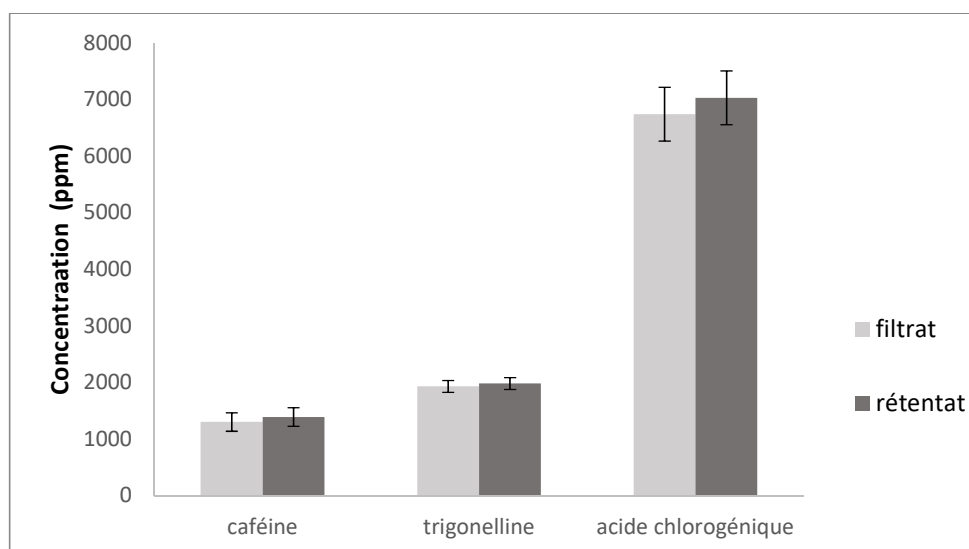


Figure 8 : Concentrations des composés d'intérêts dans le rétentat et le perméat de la filtration tangentielle de l'extrait de café vert acidifié

La figure 8 indique que les concentrations des composés d'intérêts ne varient pas en fonction de l'échantillon rétentat/perméat. Cela indique que la membrane n'a pas d'influence sur le transfert des molécules d'intérêts, en effet celles-ci sont plus petites que le seuil de coupure de la membrane. L'ensemble des composés d'intérêt est bien préservé. Concernant la quantification des protéines restantes dans l'extrait, la réaction au Biuret est mise en œuvre.

Les échantillons traités par la méthode au Biuret sont de deux types. Le premier est l'extrait de café vert acidifié. Cet extrait est déjà en partie dépourvu de ses protéines solubles au vu de la déstabilisation qui a eu lieu. Le passage sur colonne SPE permet ainsi de traiter un échantillon qui contient uniquement les protéines solubles restant dans l'extrait. Le second échantillon est une partie d'un filtrat de microfiltration de l'extrait acidifié. Cet échantillon est évalué dans le but de vérifier ce qui peut subsister malgré la microfiltration. Les résultats sont exprimés au tableau 1, selon la construction d'une droite d'étalonnage réalisée à l'aide d'albumine de blanc d'œuf.

	Absorbance	Équivalent d'albumine (g/l)
Filtrat de la filtration tangentielle	0,053	0,7
Extrait de café vert acidifié	0,134	2,4

*Tableau 1 : Evaluation de la quantité de protéine exprimée en équivalent en albumine contenu dans deux échantillons (Méthode au Biuret)*

Des protéines sont bien présentes en solution. Le dosage des protéines dans l'extrait frais est cependant nécessaire pour constater l'atténuation qui a lieu entre l'extrait frais et acidifié d'une part et l'extrait frais et filtré tangentiellement d'autre part. La bibliographie rapporte la présence de 8 à 12 % de protéine dans le café vert. Cette proportion rapportée à la masse de café vert engagée dans l'extraction induit une concentration de 16 g/l de protéines. Certaines de ces protéines étant insolubles, d'autres ayant été précipitées par la déstabilisation du pH, la concentration de 2,4 g/l dans l'extrait acidifié est faible, mais donc explicable. La filtration quant à elle, joue bien son rôle et retient les particules en suspension dans le rétentat ainsi que 70 % des protéines qui restent solubles dans le milieu.

#### 4. Perspectives et conclusion

Le développement de l'extrait de café vert à partir de sa mouture est en bonne voie. L'extraction est réalisée de manière optimale et l'extrait est à l'heure actuelle stable au niveau de la formation d'un précipité.

La réalisation en triplicata des tests d'extraction a permis de mettre en évidence le fait que l'extraction des composés bioactifs, pour une heure d'extraction, n'était pas influencée ni par la température ni par le pH d'extraction. Les conditions les plus favorables énergétiquement ainsi que pour la conservation de l'extrait ont donc été retenues. Cependant, l'apparition d'un trouble au froid est à déplorer.

L'identification du trouble au froid grâce à la mise en place de différents tests, a permis de le définir comme un trouble d'origine protéique. Dès lors, une solution de microfiltration a pu être mise en œuvre afin d'éliminer les protéines et les particules en suspension présentes dans le milieu. Le perméat de cette filtration est un extrait limpide prêt à être utilisé sous forme de concentré en molécules bioactives en vue de formuler une boisson.

Dans le même temps, d'autres aspects du projet sont explorés, mais n'ont pas encore abouti à des résultats clairs et précis.

La stabilisation microbiologique de l'extrait est testée. En effet, il est nécessaire qu'il soit stabilisé microbiologiquement afin de ne pas subir d'altération au cours de sa conservation. Deux conservateurs ont été sélectionnés de par leur utilisation courante en industrie agroalimentaire : le sorbate de potassium et le benzoate de sodium. Les concentrations mises en œuvre permettent d'empêcher tout développement microbien. Cependant, la piste d'un traitement thermique n'est pas écartée. Ce dernier permettrait en effet de valoriser un extrait ou une boisson sans conservateur.

Une fois l'extrait stabilisé microbiologiquement, il est nécessaire de s'assurer de sa stabilité dans le temps. Une étude de vieillissement est réalisée dans cet objectif avec comme but la détermination d'une date limite de durabilité pour l'extrait. Une méthode permettant de pallier l'inconvénient majeur du vieillissement naturel, le temps, est la réalisation d'un vieillissement accéléré. Cette étude permettra d'évaluer plus rapidement certaines caractéristiques des différentes formulations qui seront testées pour le développement de la boisson.

Un des objectifs de valorisation du projet est de pouvoir promouvoir le potentiel antioxydant de la boisson. Dans le but de quantifier ce pouvoir antioxydant, le développement de la méthode ORAC a été réalisé à l'UMons. La méthode est dorénavant prête et l'évaluation du pouvoir antioxydant de divers échantillons, mais n'a pu être testée jusqu'à présent.



## 5. Sources

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations, « Statistical Pocketbook: Coffee 2015 »
- [2] Oxana Babova, Andrea Occhipinti, Massimo E. Maffei : « Chemical partitioning and antioxidant capacity of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) of different geographical origin » *Phytochemistry* 123, 2016, p. 33-39
- [3] Maria Leticia Galluzzi Bizzo, Adriana Farah, Julie Ann Kemp, Luiza Berguinins Scancetti : « Highlights in the History of Coffee Science Related to Health » *Coffee in Health and Disease Prevention*, 2015, chapter 2, p. 11-17
- [4] J. Zhou, L. Chan and S. Zhou : « Trigonelline : A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Diabetes and Central Nervous System Disease », *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19, p. 3523-3531
- [5] Nicoli, M.C.; Anese, M.; Manzocco, L.; Lerici, C.R. : « Antioxidant properties of coffee brews in relation to the roasting degree » *Lebensm. Wiss. Technol.* 1997, 30, p. 292–297.
- [6] Kana Arai et. Al.: « Simultaneous determination of trigonelline, caffeine, chlorogenic acid and their related compounds in instant coffee Samples by HPLC using an acid mobile phase containing octane sulfonate », *Analytical Sciences*, août 2015, 31, p. 831-835
- [7] Satish K. Garg, « Green coffee bean », *Nutraceuticals, Efficacy, safety and toxicity*, 2016, p. 653–667
- [8] Basil T. Doumas, David D. Bayse, Richard J. Carter, Basil T. Doumas, David D. Bayse, Richard J. et al. : « A Candidate Reference Method for Determination of Total Protein in Serum I. Development and Validation », *CLIN. CHEM.* 27/10,1981, p. 1642-1650
- [9] Azeredo, D.R.P., Alvarenga, V., Sant'Ana, A.S. & Sabaa Sru, A.U.O.: « An overview of microorganisms and factors contributing for the microbial stability of carbonated soft drinks », *Food Research International*, 2016, 82, p. 136-144
- [10] Yong-Quan Xu, Xiong-Fei Hu, Ping Tang & al. : « The major factors influencing the formation of sediments in reconstituted green tea infusion », *Food Chemistry*, 2015, 172, p. 831–835
- [11] S Oestreich-Janzen : « Caffeine : Characterization and Properties », *Encyclopedia of Food and Health*, 2016, p. 556-572
- [12] Sandra M.T Baù, Paulo MAzzafera and Luiz G.S.Antoro, « Seed storage proteins in coffee », *Revista Brasileira de fisiologia vegetal*, 2001,13, p. 33-40