

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>3</b>
2.1. L'ANACARDIER, LA NOIX ET LA POMME CAJOU .....	3
2.1.1. <i>Les produits de l'Anacardier</i> .....	4
2.1.2. <i>Production de cajou dans le monde et au Brésil</i> .....	5
2.1.3. <i>L'anacardier nain précoce</i> .....	8
2.2. LES CAROTÉNOÏDES .....	10
2.2.1. <i>Principales caractéristiques</i> .....	10
2.2.2. <i>Le cajou comme source de caroténoïdes</i> .....	12
2.2.3. <i>Le marché mondial des caroténoïdes</i> .....	14
2.3. PROCÉDÉS DE SÉPARATION BAROMEMBRANAIRES .....	15
2.3.1. <i>Concepts initiaux</i> .....	15
2.3.2. <i>Microfiltration tangentielle</i> .....	15
2.3.3. <i>Classification des membranes</i> .....	17
2.3.4. <i>Colmatage et nettoyage des membranes</i> .....	18
2.4. PURIFICATION PAR DIAFILTRATION .....	20
2.5. PROCÉDÉS D'EXTRACTION DES CAROTÉNOÏDES À PARTIR DE VÉGÉTAUX .....	22
<b>3. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>26</b>
3.1. MATIÈRE PREMIÈRE .....	26
3.2. INSTALLATIONS PILOTES .....	26
3.2.1. <i>Presse à vis</i> .....	26
3.2.2. <i>Pilote de microfiltration tangentielle</i> .....	28
3.3. DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE .....	30
3.3.1. <i>Étude de l'extraction</i> .....	33
3.3.2. <i>Optimisation des paramètres opératoires les plus influents</i> .....	35
3.4. CONDUITE DES ESSAIS DE MICROFILTRATION TANGENTIELLE .....	36
3.4.1. <i>Essais de microfiltration sans concentration</i> .....	36
3.4.2. <i>Concentration des caroténoïdes par microfiltration</i> .....	36
3.4.3. <i>Purification par diafiltration</i> .....	37
3.5. MÉTHODES D'ANALYSES DE LA MATIÈRE PREMIÈRE ET DES PRODUITS .....	38
3.5.1. <i>Analyse chromatographique des caroténoïdes</i> .....	38
3.5.2. <i>Autres analyses</i> .....	40
<b>4. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS .....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.</b>

4.1. CARACTÉRISATION DES PROFILS CAROTÉNOÏDIQUES DE POMME CAJOU ET DES EXTRAITS OBTENUS	<b>ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.</b>
4.2. OPTIMISATION DE L'OPÉRATION D'EXTRACTION PAR PRESSAGE COUPLÉE À UNE MACÉRATION ENZYMATIQUE .....	<b>60</b>
4.2.1. <i>Criblage des facteurs les plus influents</i> .....	<b>60</b>
4.2.2 - <i>Optimisation des facteurs les plus influents</i> .....	<b>64</b>
4.2.3. <i>Étude de l'extraction à cycles de pressage successifs</i> .....	<b>68</b>
4.3. CONCENTRATION PAR MICROFILTRATION ET PURIFICATION PAR DIAFILTRATION DES EXTRAITS DE CAROTÉNOÏDES .....	<b>70</b>
4.3.1. <i>Concentration par microfiltration</i> .....	<b>70</b>
4.3.2. <i>Purification par diafiltration</i> .....	<b>78</b>
4.3.3. <i>Proposition d'un outil prévisionnel</i> .....	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>87</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>90</b>
<b>ANNEXE 1 : PATENTE DE INVENÇÃO.....</b>	<b>97</b>

**Chapitre I**  
**Introduction**

## **1. INTRODUCTION**

Ces travaux de recherche s'insèrent dans le cadre général de la valorisation des sous-produits des industries brésiliennes de jus de fruits. Ils s'intéressent plus spécifiquement à l'utilisation des résidus fibreux générés lors de la production industrielle de jus de pommes de cajou, les faux fruits de l'anacardier.

Au Brésil, l'anacardier est actuellement considéré comme une ressource agricole d'une grande importance socio-économique notamment dans la région du Nordeste. La production brésilienne annuelle est d'environ 220 000 t de noix de cajou (le vrai fruit de l'anacardier). Elle s'accompagne d'une production de  $2 \times 10^6$  t de pommes cajou qui correspond en fait aux pédoncules hypertrophiés des noix. Ces pommes de cajou sont considérées comme une matière première d'intérêt économique car elles servent à produire un jus de fruit largement consommé au Brésil. La pomme de cajou est utilisée pour la production de jus brut, de jus concentrés et de nectars, consommés en l'état ou mélangés avec d'autres jus de fruits.

Au Nord-Est du Brésil, les usines de transformation de jus de pommes cajou, ont couramment des capacités de traitement de 50 à 100 t.h<sup>-1</sup> de pommes. Les sous-produits solides générés par l'extraction du jus sont considérés comme des déchets qui ne sont actuellement pas valorisés. Pourtant, ces sous-produits présentent, de par leur composition, un potentiel intéressant pour la production d'extraits fonctionnels à forte valeur ajoutée.

Dans ce contexte, l'étude menée durant cette thèse s'intéressera spécifiquement à la mise au point d'un procédé permettant de valoriser la fraction caroténoïdique contenue dans les résidus d'extraction de jus de pomme cajou. Elle se base sur des travaux préliminaires réalisés par l'Embrapa en 2001 sur le potentiel de ce matériel végétal comme source de caroténoïdes (ABREU, 2001) et sur des travaux portant sur l'intérêt des technologies membranaires pour l'obtention d'extraits naturels réalisés au Cirad (DHUIQUE-MAYER *et al.*, 2005).

L'objectif est l'obtention d'extraits enrichis en caroténoïdes utilisables dans le secteur agroalimentaire comme colorant naturel jaune. Afin de proposer un procédé « propre » qui dégrade le moins possible les caractéristiques fonctionnelles des caroténoïdes, nous avons choisi de nous orienter vers un entraînement à l'eau (« extraction aqueuse ») assisté par des enzymes et associée à un procédé baromembranaire. Les caroténoïdes étant des composés liposolubles associé aux débris cellulaires solides, la microfiltration peut être mise en œuvre

pour les concentrer. Leur purification peut ensuite être obtenue par diafiltration. Ce procédé a été choisi car il n'utilise pas de solvant organique et ne nécessite pas de hautes températures.

Notre travail a consisté à évaluer la faisabilité du procédé, à mesurer son impact sur la composition en caroténoïdes des produits et finalement, à rechercher les conditions opératoires optimales de traitement. En terme analytique, l'approche choisie se base sur la détermination complète des profils en caroténoïdes de la matière première et des produits par chromatographie liquide haute performance. L'optimisation des conditions d'extraction est réalisée en mobilisant des plans d'expériences. Un premier plan de criblage est utilisé pour identifier les conditions opératoires les plus influentes qui sont ensuite optimisées via un second plan d'expériences. Les performances du procédé sont caractérisées d'une part par rapport à la concentration en caroténoïdes des extraits et d'autre part, par rapport à la densité de flux de perméat durant l'étape de microfiltration. Enfin, la purification des caroténoïdes par diafiltration est abordée et un modèle basé sur des bilans matières est proposé afin de prévoir l'effet du procédé sur la qualité des extraits.

Le premier chapitre de ce mémoire regroupe les données bibliographiques sur la matière première utilisée et son importance socio-économique au Brésil. Y sont également abordés quelques points sur les caroténoïdes et les procédés baromembranaires. Le second chapitre présente le matériel végétal traité, les installations pilotes mises en œuvre et l'ensemble des méthodologies suivies au cours de ce travail. Le dernier chapitre se structure en 3 parties. La première partie est consacrée à la caractérisation complète du profil caroténoïdique de la matière première et à l'impact du procédé sur ce profil (ce premier travail est présenté sous la forme d'une publication). La seconde partie traite de l'optimisation de l'opération d'extraction aqueuse via des plans d'expériences. Enfin, la dernière partie se focalise sur la concentration des extraits par microfiltration et leur purification par diafiltration.

L'ensemble de ce travail a donné lieu à la demande de brevet intitulé « *Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides* » déposée le 26 avril 2012 à l'Institut Brésilien de la Propriété Industrielle sous le numéro BR 10 2012 009761 3 (texte intégral présenté en annexe).

**Chapitre II :**  
**SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE**

### **2.1. L'Anacardier, la noix et la pomme cajou**

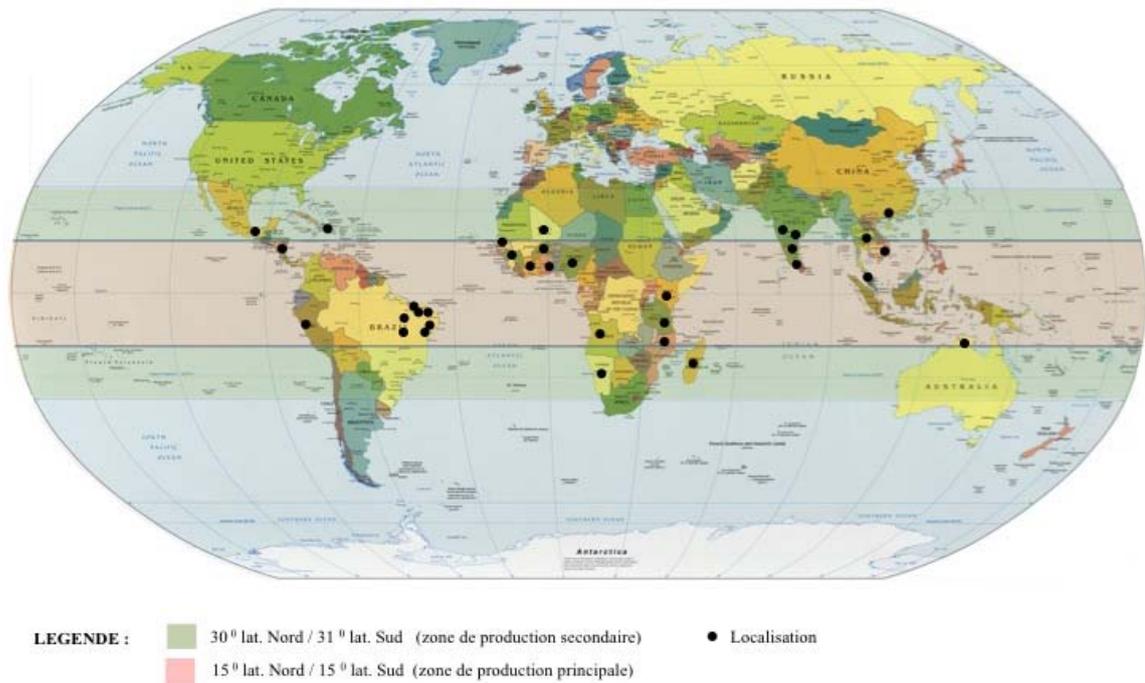
L'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) est un arbre de taille moyenne, xérophYTE et rustique, typique du climat tropical. Cette plante appartient à la famille des *Anacardiaceae* et son origine a été localisée sur la côte nord-est du territoire brésilien. Aujourd'hui elle est répandue dans plusieurs pays d'Afrique, en Inde et en Amérique Centrale (LIMA, 1998). L'anacardier est considéré comme une des cultures agricoles les plus importantes dans les régions tropicales. Cette culture occupe une surface estimée à 4 103 562 km<sup>2</sup> dans le monde, avec comme principal produit la noix de cajou (FAOSTAT, 2012).

En 1587, dans son livre "Traité descriptif du Brésil", le chercheur portugais Gabriel SOARES DE SOUSA décrit l'utilisation de la noix pour sa valeur médicinale, attirant l'attention sur l'intérêt de l'huile de cajou. L'origine brésilienne de l'anacardier est admise par presque tous les auteurs et le centre d'origine et de dispersion est sans doute la côte nord-est brésilienne. En effet, quand les colons sont arrivés dans le pays, ils y trouvèrent déjà les anacardiers. Il n'y a pas d'informations sur ce fruit durant la domination espagnole dans les îles Caraïbes et certaines parties des Amériques Centrale et du Sud. Le nom cajou provient de la langue indigène locale parlée au Brésil, le "Tupy". Le nom original dans cette langue était "aca-yu", qui signifie fruit jaune (LIMA, 1998).

L'histoire connue du cajou au Brésil a commencé avec la publication d'un naturaliste français nommé André THEVET en 1558, qui en a parlé dans son livre "Singularités de la France Antarctique" en faisant la première illustration de l'anacardier et de ses fruits. Un autre moine français au Brésil en 1557, Jean LERY, a également décrit le fruit du cajou dans son livre "Voyage au Pays du Brésil". Le premier écrivain portugais à décrire le cajou a été Pedro GANDAVO, en 1576, qui a comparé la noix de cajou à de savoureuses amandes. Le cajou s'est ensuite progressivement répandu dans le Nord-Est du pays. Actuellement, le Brésil est un des premiers producteurs mondiaux. Il a toutefois été récemment distancé dans le domaine de la production des noix de cajou par la Côte d'Ivoire et le Vietnam (FAOSTAT, 2012 ; SORO *et al.*, 2011).

Les colonisateurs ont introduit le cajou en Inde, commençant ainsi sa propagation à travers le monde y compris en Afrique, où il a trouvé des conditions favorables pour son développement. Il est actuellement réparti sur les côtes est et ouest du continent. On peut

dire qu'aujourd'hui la zone où se trouve le cajou est délimitée entre les latitudes 30° Nord et 31° Sud (Figure 1). On le trouve à l'état sauvage ou cultivé de manière intensive dans de nombreux pays (LIMA, 1998 ; EMBRAPA, 1999).



**Figure 1 :** Distribution mondiale de la production de noix de cajou et principaux pays producteurs.

Au Brésil, la nécessité de développer, d'organiser la culture de l'anacardier et de l'industrialiser est devenue une priorité à cause de son importance socio-économique. Cette culture génère environ 150 000 emplois, en particulier dans la région du Nord-Est, où le revenu *per capita* reste faible par rapport aux régions les plus développées du sud et sud-est du pays (LEITE et PAULA PESSOA, 2002 ; IBGE, 2009).

### *2.1.1. Les produits de l'Anacardier*

Le cajou ou "caju" est composé de deux parties distinctes : la noix, qui correspond au vrai fruit au sens botanique, et son pédoncule (Figure 2). Le pédoncule floral hypertrophié qui supporte la noix est appelé pomme de cajou ou pomme cajou. On considère que la partie la plus importante, du point de vue économique au niveau de la filière de production, est la noix. Cette noix est commercialisée sous forme d'amande et est largement exportée en

Europe et aux États-Unis. Le pédoncule floral, qui possède une coloration variant du jaune au rouge est utilisé dans l'industrie des jus de fruits.

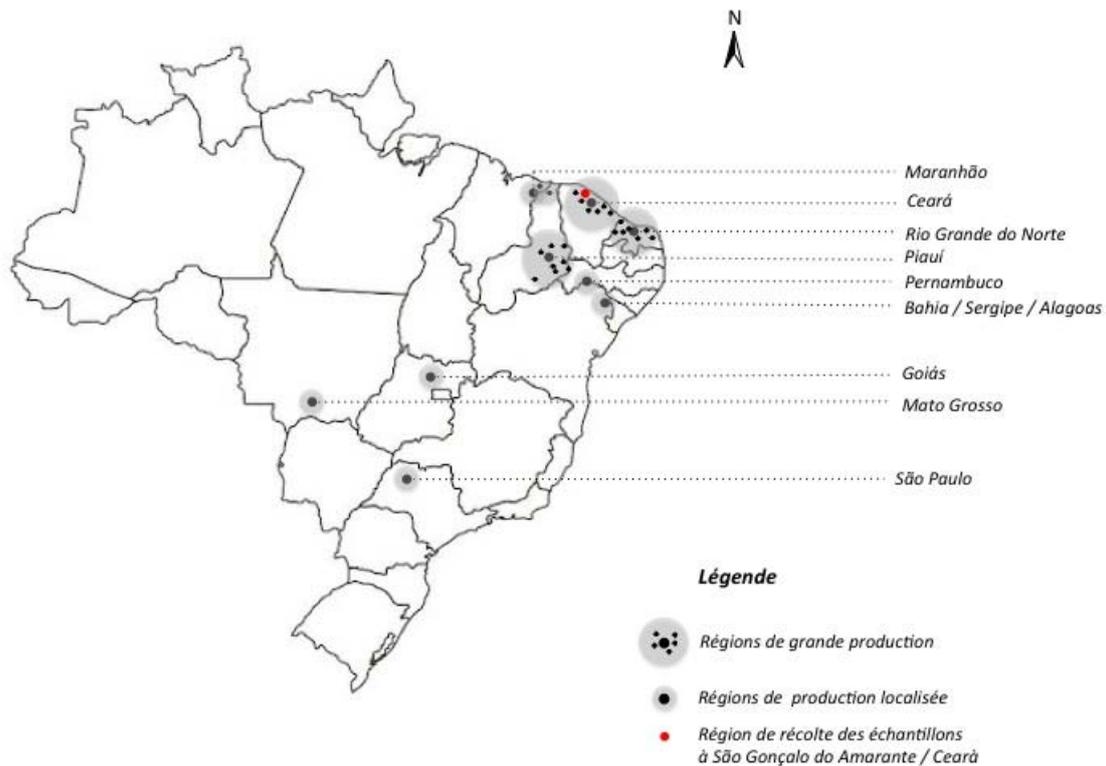


**Figure 2 :** Pomme et noix de cajou à maturité, clone CCP 76.

D'après FILGUEIRAS *et al.* (2002) et LAUTIE *et al.* (2001), les pommes de cajou à maturité présentent un pH de 3,5 à 4,5, une humidité entre 845 à 904 g.kg<sup>-1</sup>, une acidité entre 2,2 à 5,9 g.kg<sup>-1</sup> (acide malique), un extrait sec soluble de 98 à 140 g.kg<sup>-1</sup>, de 77 à 132 g.kg<sup>-1</sup> de sucres totaux, entre 1 390 et 3 000 mg.kg<sup>-1</sup> de vitamine C et de 2,7 à 7,2 g.kg<sup>-1</sup> de composés phénoliques.

### *2.1.2. Production de cajou dans le monde et au Brésil*

La production annuelle moyenne de noix de cajou au Brésil est d'environ 220 000 t selon les données officielles de la FAO (FAOSTAT, 2012) et de l'Institut Brésilien de Géographie et Statistique (IBGE, 2009). Cette production occupe une surface de 750 000 ha. La distribution géographique des plantations d'anacardiens au Brésil est présentée sur la Figure 3. Plus de 90% de la production est située dans les états du Ceara, Piauí et Rio Grande do Norte.



**Figure 3 :** Distribution géographique de la production de cajou au Brésil.

En considérant que la pomme cajou représente environ 9 fois la masse de la noix, la production brésilienne de pommes de cajou peut donc être évaluée à 2 millions de tonnes par an (AGRIANUAL, 2010). Toutefois, une grande partie de ces « fruits » est perdue aux champs, en raison de divers facteurs liés à la récolte, à la logistique de distribution et à la périssabilité du produit. Il existe des controverses dans l'estimation des pertes de ce fruit et les informations ne sont pas toujours fiables sur l'ensemble de la filière de production. Divers produits artisanaux tels que le jus clarifié (appelé « cajouina »), les confitures, les aliments pour animaux et la consommation *in natura* ne sont pas référencés par les organismes officiels de contrôle de la production. Les pertes sont néanmoins estimées de 80 à 90% au niveau de la pré et post récolte.

Les estimations officielles de production de cajou dans le monde sont disponibles dans le rapport annuel de la FAO (Tableau 1).

**Tableau 1** : Répartition de la production de noix de cajou dans le monde en 2009.  
(FAOSTAT 2010).

Pays Producteur	Production (t.an <sup>-1</sup> )	Superficie exploitée (ha)	Rendement annuel moyen (t.ha <sup>-1</sup> )
<b>Monde</b>	<b>3.350.929</b>	<b>4.103.562</b>	<b>0,82</b>
Viet Nam	958.000	340.800	2,81
Inde	695.000	893.000	0,78
Nigéria	580.761	330.000	1,76
Côte d'Ivoire	246.383	660.000	0,37
<b>Brésil</b>	<b>220.505</b>	<b>758.085</b>	<b>0,29</b>
Indonésie	145.000	310.000	0,47
Philippines	111.993	27.428	4,08
Tanzanie	79.100	80.000	0,99
Mozambique	67.846	60.000	1,13
Guinée-Bissau	64.653	212.000	0,30
Bénin	49.487	215.000	0,23
Thaïlande	38.184	24.536	1,56
Ghana	35.647	62.000	0,57
Malaisie	10.335	7.549	1,37
Kenya	8.381	30.000	0,28
Sri Lanka	6.770	21.840	0,31
Madagascar	6.072	16.500	0,37
Sénégal	4.031	16.200	0,25
El Salvador	3.380	3.834	0,88
Burkina Faso	3.168	9.100	0,35
Mali	2.873	9.000	0,32
Mexique	2.719	1.420	1,91
Pérou	2.350	350	6,71
Honduras	1.851	1.387	1,33
Angola	1.667	2.800	0,60
République Dominicaine	1.283	6.114	0,21
Guinée	1.260	1.800	0,70
Bélize	1.080	698	1,55
Chine	591	1.621	0,36
Togo	559	500	1,12

Les pertes importantes de pommes cajou à chaque récolte sont principalement dues à une combinaison de facteurs tout au long de la filière de production :

- un système agricole basé sur des arbres de grandes tailles, avec une récolte difficile des fruits,
- la nature très périssable du pédoncule à l'état de maturité complète qui ne peut se conserver que quelques heures à température ambiante,
- le coût du travail et de la main-d'œuvre pour la récolte,
- une saison concentrée sur seulement trois mois dans l'année.

Ainsi, l'amélioration de la compétitivité de la filière de production de cajou passe par une phase d'adaptation vers un système plus moderne et productif, fondé sur la mise en place

d'anacardiens d'une taille plus faible (variétés naines), avec une productivité plus élevée et qui doivent être adaptés à un système de récolte mécanisé. Plusieurs travaux décrivent cette nécessaire réorientation de la production, en prenant mieux en compte l'aspect agronomique, avec la mise en place de variétés naines précoces (LEITE et PAULA PESSOA, 2002 ; SILVA NETO, 2003).

### *2.1.3. L'anacardier nain précoce*

La superficie plantée d'anacardiens nains précoces a augmenté significativement dans la dernière décennie au Nordeste du Brésil. Elle est estimée à 50 000 ha (IBGE, 2009). La faible hauteur des arbres, la gestion et les pratiques agricoles facilite la récolte. Les anacardiens nains précoces présentent une meilleure résistance à la sécheresse. Leur productivité est plus élevée que celle des anacardiens communs. Le rendement moyen de production de noix de cajou est voisin de 1 200 kg.ha<sup>-1</sup>.an<sup>-1</sup> soit, dans des conditions climatiques normales, environ 9 fois plus en pommes de cajou (PAIVA & BARROS, 2004). L'intérêt croissant pour l'utilisation du pédoncule, à la fois pour la consommation en frais et pour le secteur agroindustriel, a contribué à l'augmentation de la production (ROSSETI et AQUINO, 2002 ; MOURA, 2005).

Les clones d'anacardiens nains précoces sont issus, pour la plupart, des travaux développés par la recherche agronomique de l'Embrapa au Brésil, qui a mis sur le marché des clones plus adaptés à la demande de la filière. On procède actuellement au remplacement des grands anacardiens traditionnels par des plants greffés plus faciles à manipuler aux champs.

Parmi les variétés les plus adaptées et cultivées par les producteurs et paysans brésiliens, le clone CCP 76 (Figure 4) a montré une grande productivité et un rapport pédoncule/noix favorable à la production de pommes cajou. La couleur rouge de la pomme est très attrayante pour l'industrie et pour la commercialisation en frais, le principal problème restant toujours la forte périssabilité du produit (MOURA, 2003).



**Figure 4 :** Anacardiers nains précoces CCP 76 dans un champ expérimental de l’Embrapa (Pacajus, Ceará, Brésil).

La consommation de pommes de cajou fraîches est en augmentation au Brésil depuis le lancement des clones d’anacardiers CCP 06, CCP 09, CCP 76 et CCP 1001, mais aussi d’autres clones (BRS 50 et BRS 51) provenant des travaux de recherche de l’Embrapa (BARROS *et al.*, 2002).

Les industries des jus de pomme cajou installées dans la région nord-est du Brésil ont une capacité de transformation très importante (jusqu’à 100 t.h<sup>-1</sup>), en raison d’une campagne de récolte très courte. La durée de la campagne varie entre 90 et 100 jours. Elle s’échelonne habituellement de mi-juin à mi-septembre dans l’état de *Piauí*, puis se décale dans l’état du *Ceará* et se termine dans les états de *Rio Grande do Norte* et de *Bahia*.

Dans la transformation industrielle de la pomme de cajou en jus de fruit, le rendement d’extraction est de 80 à 85%. Les résidus fibreux de presse, qui représentent donc 20 à 25%, sont considérés comme un sous-produit industriel d’intérêt limité (alimentation animale) et polluant. La réduction de ces déchets et leur valorisation pour l’obtention de produits à haute valeur ajoutée représentent un enjeu non négligeable pour la filière de production de cajou (ABREU, 2001 ; AZEREDO *et al.*, 2006).

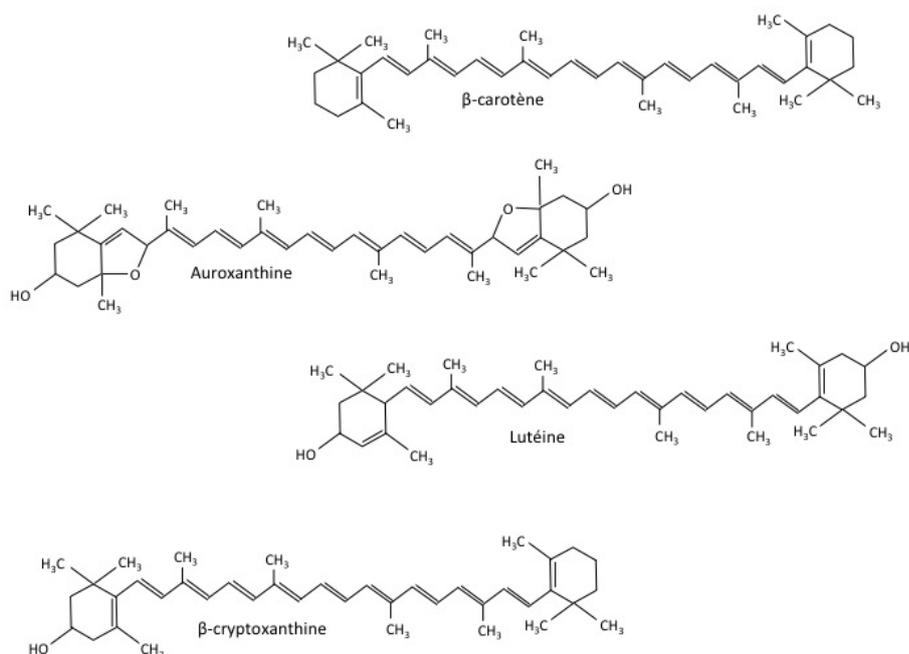
Le développement de nouveaux produits à partir de pommes de cajou peut contribuer à en réduire les pertes. Divers nouveaux produits ont ainsi déjà été proposés tels que des extraits

colorants (ABREU, 2001 ; AZEREDO *et al.*, 2006) ou des jus de fruit clarifiés (SILVA NETO, 2003 ; ABREU *et al.*, 2005 ; CASTRO *et al.*, 2006).

## **2.2. Les caroténoïdes**

### **2.2.1. Principales caractéristiques**

Les caroténoïdes sont des composés liposolubles présents dans tous les tissus photosynthétiques des plantes supérieures. Leur structure comprenant de nombreuses doubles liaisons conjuguées, ces composés absorbent tous dans le visible. Leur couleur varie du jaune au rouge violacé. Ces pigments naturels sont toujours associés à la photosynthèse. De part leurs insaturations, ils possèdent aussi des propriétés antioxydantes. Certains d'entre eux sont provitaminiques A. On les trouve en quantité importante dans de nombreux fruits et légumes tels que les carottes, tomates, melons, mangues, etc. Le principal caroténoïde trouvé dans les végétaux est le  $\beta$ -carotène (RODRIGUEZ-AMAYA, 2009 ; THANE & REDDY, 1997 ; VAN BOEKEL *et al.*, 2010). D'autres composés comme l' $\alpha$ -carotène, le lycopène, la lutéine et la zéaxanthine sont également communs. Les structures chimiques de quelques molécules de caroténoïdes sont présentées sur la Figure 5.

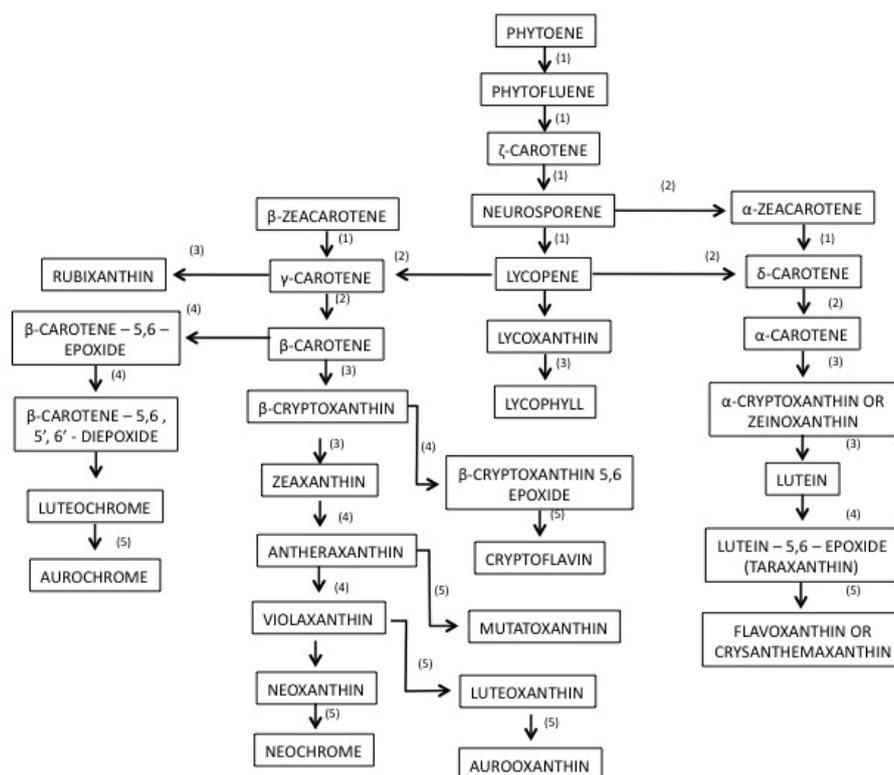


**Figure 5** : Structures chimiques de quelques caroténoïdes.

On peut considérer, parmi les caroténoïdes présents dans les fruits et autres végétaux, que six d'entre eux ont des effets bénéfiques démontrés sur la santé : l' $\alpha$ , le  $\beta$ , le  $\gamma$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine qui possèdent une activité provitaminique A ; la lutéine, le lycopène et la zéaxanthine qui ont une activité antioxydante prévenant les maladies dégénératives comme le cancer et les maladies cardiovasculaires. L'action de la lutéine et de la zéaxanthine a été prouvée pour obtenir une diminution du risque de dégénérescence maculaire et de la cataracte (LANDRUMA et BONEY, 2001 ; RAO et RAO, 2007 ; RODRIGUEZ-AMAYA, 2009).

Les procédés thermiques, les oxydations et l'exposition à la lumière sont les principales causes de perte des caroténoïdes dans les produits transformés (THANE & REDDY, 1997). Les caroténoïdes sont des molécules qui peuvent se modifier facilement. Le schéma de la Figure 6 présente les voies possibles de modifications des caroténoïdes à partir du précurseur de base, le phytoène (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

Leur faible solubilité dans l'eau est le problème majeur pour l'obtention des caroténoïdes à partir des fruits et des tissus végétaux. Cette faible solubilité peut être attribuée à leur hydrophobicité et à leur forme cristalline, lorsqu'ils sont associés aux chromoplastes. Toutefois, lorsque ces caroténoïdes sont associés à des chloroplastes, leur solubilité dans l'eau est plus élevée, en raison de leur association avec une lipoprotéine (VAN BOEKEL *et al.*, 2010).



**Figure 6 :** Schéma général des possibles voies de modification des caroténoïdes.

Réactions de 1) dessaturation, 2) cyclisation, 3) hydroxylation, 4) époxydation, 5) réarrangement époxy-furanoxyde.

En guise de bilan, les caroténoïdes sont donc considérés comme un groupe de composés essentiels pour la santé humaine, très réactifs et facilement dégradés par des facteurs liés à l'environnement ou à leur manipulation durant la transformation industrielle des produits d'origine végétale (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.* 2009).

### 2.2.2. Le cajou comme source de caroténoïdes

Plusieurs études scientifiques ont été menées sur la pomme de cajou et ses produits dérivés pour identifier leurs propriétés bénéfiques pour la santé humaine. Les propriétés antioxydantes et nutritionnelles ont été par exemple étudiées, avec l'identification de nombreux composés phénoliques, des caroténoïdes et de la vitamine C (ASSUNCAO et MERCADANTE, 2003a/b ; BICALHO *et al.*, 2000 ; BRITO *et al.*, 2007 ; MESTRES *et al.*, 2009). Le Tableau 2 présente la composition en caroténoïdes de quelques pommes cajou et produits dérivés en fonction de leur origine.

**Tableau 2** : Composition en caroténoïdes de diverses pommes de cajou et produits obtenus à partir de pomme de cajou. (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.* 2009).

Description de la pomme de cajou ou du produit dérivé	Provenance	Caroténoïde (mg.kg <sup>-1</sup> )					
		α-carotène	β-carotène	β-cryptoxanthine	Lutéine	Zéaxanthine	Violaxanthine
Allongé rouge	Piauí	0,3	0,8 0,7 (E)	0,7 0,6 (E)	-	-	0,1
Allongé jaune	São Paulo	0,3	0,5 0,4 (E)	0,1 (E)	0,1	-	-
Allongé jaune	Piauí	0,2	0,6 0,5 (E)	0,6 0,5 (E)	tr	tr	0,1
Ronde rouge	Piauí	0,1	0,2 0,2 (E)	0,7 0,6 (E)	tr	tr	0,1
Pulpe congelée 4 marques	-	0,3	1,0 0,8 (E)	0,5 0,4 (E)	tr	-	-
Jus bouteille 2 marques	-	tr	0,8 0,7 (E)	0,5	-	-	-
Jus concentré 5 marques	-	0,1	0,6 0,5 (E)	0,1 (E)	tr	-	-
Jus concentré sucré, 1 marque	-	tr	0,1 (E)	0,1 (E)	tr	-	-
Jus prêt à boire, 1 marque	-	tr	0,1 (E)	tr (E)	tr	-	-

\* Rq: tr = traces

ABREU (2001) et AZEREDO *et al.* (2006) ont montré qu'il est possible d'obtenir des extraits aqueux enrichis en caroténoïdes à partir des résidus industriels de la production de jus de pomme de cajou. Les résultats montrent que, à condition d'être concentré, l'extrait présente un fort potentiel industriel.

Dans leur étude des caroténoïdes de pommes de cajou provenant de différentes origines géographiques (São Paulo et Piauí), ASSUNCAO et MERCADANTE (2003b) ont identifié des profils diversifiés en caroténoïdes. Dans tous les cas ils ont identifiés le β-carotène, la β-cryptoxanthine, le α-carotène et le 13-cis-β-carotène. Bien que ces auteurs observent un important pourcentage en caroténoïdes provitaminique dans le profil, les teneurs sont faibles et la pomme cajou fraîche n'est pas considérée comme une bonne source nutritionnelle de caroténoïdes provitaminiques A

### 2.2.3. Le marché mondial des caroténoïdes

Les études scientifiques sur les caroténoïdes qui démontrent leurs intérêts pour la santé humaine sont d'ores et déjà mises à profit par les agriculteurs pour sélectionner, par exemple, des variétés de goyaves et de tomates à teneur élevée en lycopène. Les industries agro-alimentaires comme les industries pharmaco-cosmétiques peuvent s'approvisionner en matières premières riches en caroténoïdes et choisir des conditions de stockage et des procédés de transformation adéquats pour maintenir leur potentiel nutritionnel. Il est ainsi possible d'élaborer des produits à plus forte valeur ajoutée sur un marché mondial en croissance constante (RODRIGUEZ-AMAYA, 2009).

Les principaux caroténoïdes commercialisés pour des applications à l'échelle industrielle sont l'astaxanthine, le  $\beta$ -carotène, la canthaxanthine et, dans une moindre mesure, le lycopène, la lutéine, la zéaxanthine, l'apo-caroténal et leurs esters. Les principales applications concernent le renforcement de la couleur du saumon, du jaune d'œuf, de certaines boissons et de pâtes alimentaires. Selon le rapport annuel du BCC RESEARCH – *Market Forecasting for carotenoids* report (MARZ, 2011), le marché mondial pour caroténoïdes dans les divers domaines d'application en 2007 a été estimé à 766 millions USD. Avec un taux de croissance annuel d'environ 2,3% par an, ce marché devrait atteindre 919 millions USD en 2015. L'industrie alimentaire utilise largement le  $\beta$ -carotène comme supplément nutritionnel et comme colorant alimentaire. Le marché américain est actuellement le principal consommateur de  $\beta$ -carotène pour ce type d'application industrielle (MARZ, 2011).

Le marché des extraits de caroténoïdes obtenus à partir de procédés biotechnologiques, de tissus végétaux ou animaux, possède des taux de croissance différents selon le type de caroténoïde. Les prix sont également variables en fonction de la composition des extraits. Les extraits enrichis en lutéine (CROMBIE, 2004) pour la production à l'échelle industrielle par des grandes entreprises au niveau mondial, par exemple, possèdent une valeur ajoutée importante à cause de leur coloration jaune intense et de leurs possibles applications comme supplément nutritionnel (MARZ, 2011).

## **2.3. Procédés de séparation baromembranaires**

### *2.3.1. Concepts initiaux*

Début 1970, une nouvelle catégorie de procédés utilisant des membranes synthétiques comme barrière sélective séparant deux phases a été introduite dans le domaine des procédés industriels, en complément aux procédés classiques de séparation (MULDER, 1991 ; HARBERT *et al.*, 2003). Les membranes retiennent partiellement ou totalement certaines des espèces présentes dans les phases. La phase qui traverse la membrane est appelée perméat alors que celle retenue par la membrane est appelé rétentat. Cette catégorie de procédés a fait l'objet de nombreuses études en comparaison avec les techniques de séparation conventionnelles comme la distillation, la filtration frontale, l'absorption, l'échange d'ions, la centrifugation, l'extraction par solvant ou la cristallisation (BIMBENET, 2002).

Les procédés membranaires sont généralement mis en œuvre dans des conditions peu agressives pour le produit. Les faibles températures utilisées permettent la préservation des composés thermosensibles tels que les vitamines, colorants et autres composés antioxydants. Ces procédés présentent également d'autres avantages, à savoir une bonne efficacité énergétique, une sélectivité élevée et une simplicité de fonctionnement. Ils sont également facilement adaptables à différentes échelles de production (MULDER, 1991 ; VAILLANT *et al.*, 2008 ; HARBERT *et al.*, 2003 ; MORESI & LO PRESTI, 2004). Leur utilisation à l'échelle industrielle est croissante pour le traitement d'une gamme de plus en plus diversifiée de produits.

Les industries agro-alimentaires utilisent les technologies membranaires dans divers domaines. L'utilisation des membranes dans ce secteur industriel a pris une ampleur considérable depuis une trentaine d'année. Le marché des membranes est actuellement intéressant et attractif pour les entreprises qui travaillent avec des produits innovants. Ce marché présente actuellement un taux de croissance de 7 à 10% par an (HUMPHREY & KELLER, 2001 ; HARBERT *et al.*, 2003; GUILLON, 2009).

### *2.3.2. Microfiltration tangentielle*

Parmi les procédés membranaires disponibles, il existe des procédés qui utilisent un gradient de pression comme force motrice pour faire circuler un fluide à travers une

membrane permselective, généralement poreuse. Ils sont nommés procédés baromembranaires. Comme en filtration classique, la séparation est obtenue principalement en fonction de la taille des espèces en mélange. Selon le diamètre de pore moyen des membranes, il est possible de séparer des espèces particulières ou solubles. Ces procédés sont alors classés en différents types : microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration et osmose inverse (Tableau 3).

Les paramètres opératoires qui influencent le plus les performances de ces procédés sont la pression transmembranaire (différence de pression moyenne de part et d'autre de la membrane), la température et la vitesse tangentielle (AIMAR *et al.*, 2006).

**Tableau 3** : Caractéristiques générales des procédés de séparation baromembranaires.

<b>Procédé</b>	<b>Membrane</b>	<b>Gamme ΔP</b> Energie	<b>Espèces retenues</b>	
<b>Microfiltration</b> <b>MF</b> (< 1900)	Poreuse 0,1 – 5 μm	0,1 – 3 bar <i>1 – 10 kWh.m<sup>-3</sup></i>	<i>Cellules, bactéries, levures, grains d'amidon, globules lipidiques, etc.</i>	<i>Séparations Particulaires</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Clarification</li> <li>•Stérilisation</li> </ul>
<b>Ultrafiltration</b> <b>UF</b> (1930)	Poreuse 10 – 100 nm	1 – 10 bar <i>2 – 20 kWh.m<sup>-3</sup></i>	<i>Polyosides, protéines, tanins, virus, colloïdes, etc..</i>	
<b>Nanofiltration</b> <b>NF</b> (1990)	±Poreuse 1 – 10 nm	10 – 30 bar <i>8 – 80 kWh.m<sup>-3</sup></i>	<i>Sucres, polyphénols, composés d'arome, etc.</i>	<i>Séparations Moléculaires</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>•Purification eau</li> <li>•Concentration</li> <li>•fractionnement stérilisation.</li> </ul>
<b>Osmose Inverse</b> <b>OI</b> (1960) (Hyperfiltration)	Dense	20 – 100 bar <i>20 – 200 kWh.m<sup>-3</sup></i>	<i>Sels.</i>	

La microfiltration tangentielle permet la séparation de microparticules, de bactéries ou de gouttelettes en suspension dans un liquide (BIMBENET *et al.*, 2002; HARBERT *et al.*, 2003). Elle est très utilisée pour la clarification des jus de fruit et autres boissons, pour la concentration de suspensions ou le traitement des eaux.

VAILLANT (2000) indique que la microfiltration tangentielle peut permettre une pasteurisation à froid quand des diamètres de pores inférieurs ou égaux à 0,2  $\mu\text{m}$  sont utilisés. Dans le cas du traitement d'un jus de fruit pulpeux, le perméat clarifié et stérilisé peut être remélangé avec le rétentat pasteurisé afin de reconstituer un jus de meilleure qualité sensorielle et nutritionnelle par rapport au jus pasteurisé standard.

Dans le domaine des jus de fruits, le couplage de la filtration membranaire avec un traitement enzymatique préliminaire est fréquent. Il s'agit de réduire la charge colmatante des jus qui est responsable de la chute du flux de perméat ( $J_p$ ). Ces prétraitements enzymatiques présentent aussi l'avantage de diminuer la viscosité de la phase aqueuse en dégradant les polyosides solubles. Les enzymes généralement utilisées sont des pectinases, cellulases, amylases et hémicellulases. Dans le commerce, il existe de nombreux mélanges enzymatiques qui ont leur spécificité pour diverses applications. Les procédés de clarification utilisant des membranes et un prétraitement enzymatique s'avèrent actuellement compétitifs par rapport aux méthodes traditionnelles, ce qui représente une réelle alternative pour les jus de fruits tropicaux (VAILLANT, 2001). Il existe dans la littérature de très nombreuses études démontrant l'intérêt des procédés de séparation par membrane pour clarifier, concentrer et stériliser à froid les jus de fruits et autres extraits végétaux tropicaux (MATTA, 1999 ; RODRIGUES, 2001 ; VAILLANT, 2000 ; DAMASCENO, 2002 ; CISSE *et al.*, 2005). Certains auteurs ont travaillé sur les produits dérivés de la pomme de cajou comme les jus clarifiés (ABREU *et al.*, 2005 ; CAMPOS *et al.*, 2002 ; COURI *et al.*, 2002 ; CASTRO *et al.*, 2007). Dans tous les cas, les perméats obtenus par microfiltration tangentielle sont limpides et incolores, indiquant la rétention totale des caroténoïdes. D'autres travaux ont montré que le lycopène contenu dans des jus pulpeux de pastèque et de goyave reste dans le rétentat. Ainsi la microfiltration permet de concentrer le lycopène, car il est retenu par la membrane (VAILLANT, 2000). Dans son étude de la microfiltration de jus d'orange sur membrane céramique, DHUIQUE-MAYER *et al.* (2005) confirment l'absence de caroténoïdes dans le perméat final.

L'ensemble de ces résultats montre clairement qu'il est possible d'utiliser la microfiltration tangentielle pour séparer les caroténoïdes contenus dans un extrait aqueux de résidus fibreux de pomme cajou.

### 2.3.3. Classification des membranes

Les membranes présentent fréquemment une structure asymétrique. Elles sont alors constituées d'un support macroporeux qui lui confère sa résistance mécanique, sur lequel

est déposée une fine couche filtrante active. Une large gamme de matériaux peut être utilisée pour la fabrication des membranes. Les matériaux membranaires peuvent être schématiquement classés en quatre catégories. La première catégorie de membranes (membranes de première génération) est constituée de cellulose ou de dérivés cellulosiques. Leur durée de vie et leur résistance physico-chimique sont limitées. L'acétate de cellulose, par exemple, ne peut être utilisé à une température supérieure à 30°C et le pH doit être situé entre 2 et 8. Elles sont peu résistantes au chlore et sont sensibles aux attaques microbiennes. La deuxième génération de membranes est constituée de polymères synthétiques comme, par exemple, les polyamides, le fluorure de polyvinylidène (PVDF) ou les polysulfones. Ces membranes présentent une meilleure résistance par rapport à celles de première génération (HARBERT *et al.*, 2003 ; BIMBENET *et al.*, 2002, PORTER, 1990). Les membranes de troisième génération sont produites à partir de matériaux inorganiques comme des oxydes métalliques (zircone, alumine, silice) ou en acier inoxydable. Avec ces matériaux, des porosités variées peuvent être obtenues avec un bon contrôle de la distribution en taille des pores (HARBERT *et al.*, 2003). Ces membranes peuvent être stérilisées à haute température (au-delà de 150°C) et supportent des pH compris entre 1 et 14. Elles peuvent donc être soumises à des conditions sévères de nettoyage et désinfection. Grâce à leur stabilité chimique et thermique, elles occupent aujourd'hui une place significative dans les industries agroalimentaires. Leur coût est plus élevé que les membranes organiques. Néanmoins, elles peuvent être utilisées en continu pendant plusieurs années et le coût d'entretien/remplacement est faible. Il est enfin possible de mentionner une quatrième génération de membranes à base de fibres de carbone (GIRARD & FUKUMOTO, 2000).

Les membranes sont disposées dans un module membranaire. Ces modules sont disponibles dans le commerce dans différentes configurations et surfaces de filtration. Ils peuvent être plans, spiralés, tubulaires ou en fibres creuses. Le choix de la géométrie dépend notamment de la viscosité du perméat, du type de membrane et de la qualité du produit à obtenir (BIMBENET *et al.*, 2002).

### 2.3.4. Colmatage et nettoyage des membranes

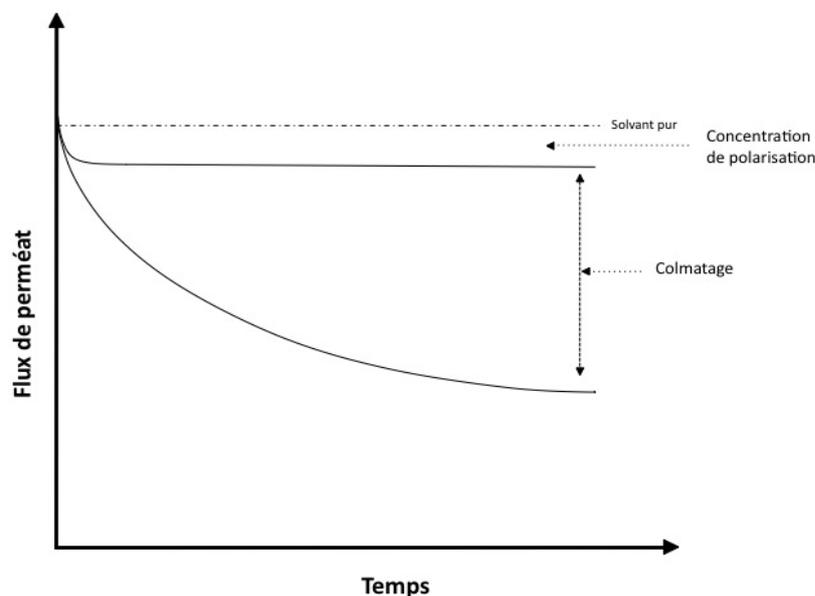
Même en configuration tangentielle, il existe une accumulation de matière au voisinage de la surface filtrante et/ou dans les pores de la membrane. Ce phénomène connu sous le nom de colmatage, est observé dans la grande majorité des applications de microfiltration et d'ultrafiltration. Il contribue à augmenter la résistance hydraulique du système ce qui a pour

conséquence de diminuer les performances de l'opération. Il peut également modifier significativement la sélectivité de la membrane (MAUREL, 2009, MATTA *et al.*, 2009). D'après HARBERT *et al.* (2003).

Les principaux phénomènes qui contribuent au colmatage des membranes sont :

- a) adsorption des solutés à la surface de la membrane et/ou à l'intérieur des pores via des interactions physico-chimiques avec le matériau membranaire ;
- b) obstruction des pores par des molécules ou des particules en suspension (colmatage interne) ;
- c) dépôt de matière sur la surface de la membrane formant une couche de colmatage dynamique (colmatage externe).

Ces phénomènes de colmatage sont considérés comme totalement ou partiellement irréversibles. Ils sont dynamiques, c'est à dire qu'ils évoluent dans le temps. Associés au phénomène de polarisation en concentration, ils se traduisent par une chute de la densité de flux de perméat au cours de la filtration (Figure 7).



**Figure 7** : Impact du colmatage et de la polarisation sur la densité de flux de perméat dans un procédé classique de microfiltration ou d'ultrafiltration tangentielle.

Dans le cadre d'une utilisation industrielle, il est important de minimiser l'occurrence des phénomènes de colmatage, car ils réduisent la productivité et peuvent altérer la qualité du

produit final. Il est possible de limiter ces phénomènes en jouant sur les conditions opératoires (vitesse tangentielle, pression transmembranaire, promoteurs de turbulences, rétrolavages) et en nettoyant périodiquement les membranes. Des nettoyages périodiques sont généralement conduits dans des conditions spécifiques de température et de pH. L'efficacité du nettoyage est vérifiée grâce à des mesures de perméabilité hydraulique (PALL CORPORATION, 2007). L'efficacité du nettoyage est considérée satisfaisante lorsque la perméabilité hydraulique expérimentale atteint au moins 80% de celle d'une membrane neuve. Les produits de nettoyages tels que la soude et quelques acides forts (acides nitrique et phosphorique) peuvent être utilisés. Quand le colmatage est très important, des agents oxydants forts, tels que l'hypochlorite de sodium sont nécessaires pour améliorer l'efficacité du nettoyage. Dans ce cas, il est nécessaire que le pH de la solution de nettoyage soit supérieur à 10 afin de protéger les composants en acier inoxydable de l'unité de filtration. Chaque application nécessite une étude spécifique pour l'optimisation du protocole de nettoyage. La durée de vie utile d'une membrane est directement liée aux soins et à l'efficacité des procédures de nettoyage mises en œuvre pendant toute la durée de son utilisation.

### **2.4. Purification par diafiltration**

Pour augmenter la pureté de macrosolutés dans une solution, il est possible d'utiliser la diafiltration qui correspond à un mode alternatif de fonctionnement des systèmes baromembranaires (YEE *et al.*, 2007). La diafiltration consiste à purifier un composé retenu par une membrane en diluant le rétentat avec du solvant. Il s'agit donc d'une sorte de rinçage des composés retenus par la membrane. Cette opération permet d'éliminer sélectivement les composés non retenus par la membrane qui sont généralement de dimensions plus petites que le composé d'intérêt (KRAWCZYC *et al.*, 2008 ; YEE *et al.*, 2007). La diafiltration peut-être mise en œuvre sur tous les types de membrane de filtration : micro-, ultra- et nano-filtration.

La diafiltration peut être réalisée à volume constant ou à volume variable, en continu ou en discontinu. A volume constant, la quantité de solvant ajoutée, appelé diavolume (DV), est égale au volume de perméat extrait. Dans ce cas il n'y a pas de concentration en cours de diafiltration. Dans le cas où le volume de solvant ajouté est inférieur au volume de perméat extrait, il y a une concentration simultanée lors de la diafiltration (ZEMAN & ZYDNEY, 1996).

A l'échelle industrielle, la consommation de solvant peut être limitée en utilisant un procédé de diafiltration à contre courant. Dans ce cas, une partie du perméat est utilisée comme liquide de diafiltration. Une plus grande surface membranaire est alors nécessaire pour compenser l'utilisation de solvant pur (LIPNIZKI *et al.*, 2002).

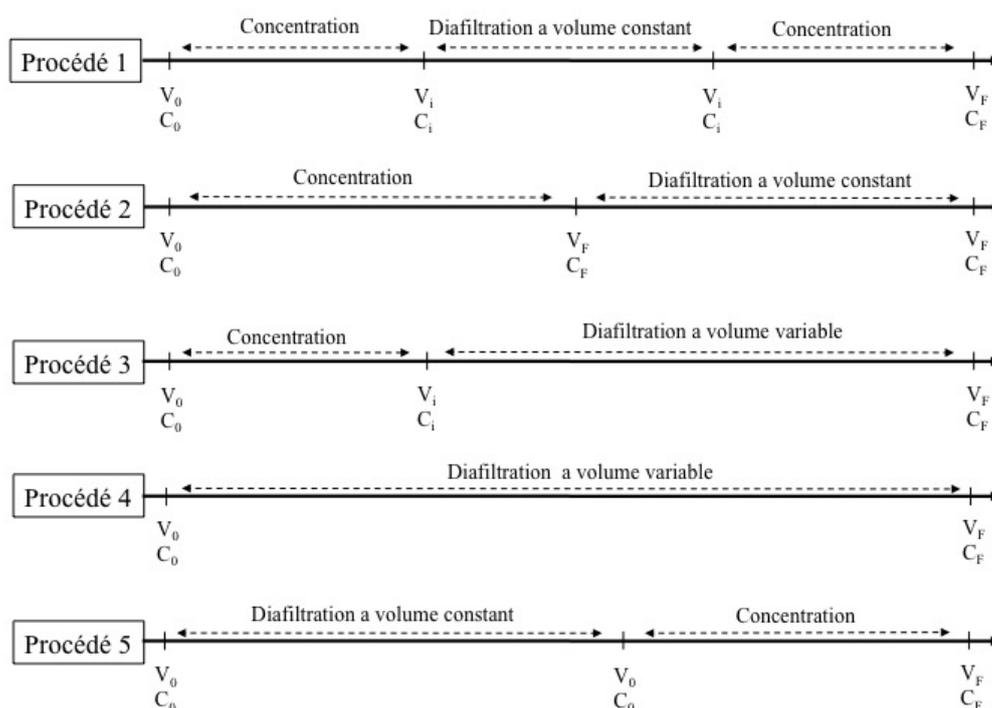
L'ajout de solvant lors de la diafiltration a souvent un effet positif sur le flux de perméat, puisque cette opération favorise une diminution de la viscosité du rétentat (BARBA *et al.*, 2001 ; BASSO *et al.*, 2009).

La purification d'un composé d'intérêt par diafiltration à volume constant (DFVC) est souvent couplée à une concentration préalable de ce composé.

Le procédé se déroule par exemple en trois phases successives (DUTRE et TRAGARDH, 1994) :

- une concentration préliminaire des composés d'intérêt,
- une étape intermédiaire de purification par diafiltration,
- une dernière étape de concentration pour augmenter la teneur du rétentat en composé d'intérêt.

Dans le cas de la diafiltration à volume variable (DFVV), l'eau est ajoutée au rétentat à un débit inférieur au débit de perméat. Le composé retenu est donc purifié et concentré simultanément. Cette procédure a été largement étudiée, car c'est une configuration qui utilise moins d'eau que la diafiltration à volume constant (KRISTIĆ *et al.*, 2004, FOLEY 2006). La Figure 8 présente les options et les moyens de conduire un procédé de concentration par membranes couplé à un système de diafiltration.



**Figure 8 :** Quelques exemples de procédures possibles de mise en œuvre de diafiltration.

V : volume du rétentat, C : concentration dans le rétentat, 0 : initial, I : intermédiaire, F : final.

L'obtention et la purification par diafiltration de macromolécules d'intérêt nutritionnel/fonctionnel ont fait l'objet de nombreuses études dans les domaines alimentaire et biomédical (ultrafiltration). On peut citer par exemple les travaux de GUADIX *et al.* (2004) qui s'intéressent à la production de lactosérum par diafiltration ou CHEANG & ZYDNEY (2004) qui utilisent l'ultrafiltration pour séparer l' $\alpha$ -lactalbumine et la  $\beta$ -lactoglobuline.

### **2.5. Procédés d'extraction des caroténoïdes à partir de végétaux**

Comme d'autres molécules hydrophobes, l'extraction des caroténoïdes est généralement réalisée par extraction solide/liquide à l'aide de solvants organiques apolaires. Ce procédé a un impact négatif sur la qualité finale du produit (traces de solvant) et sur l'environnement (KEMPER, 2005). Cela a motivé l'étude de procédés alternatifs qui combinent par exemple une extraction par pression et un entrainement à l'eau. Il s'agit alors d'extraire les caroténoïdes intrinsèquement localisés à l'intérieur de la structure fibreuse sous la forme d'une suspension de couleur jaune intense (ABREU, 2001 ; AZEREDO *et al.*, 2006). Des prétraitements de déstructuration cellulaire sont parfois recommandés pour faciliter la

libération des caroténoïdes et obtenir de meilleurs rendements : macération enzymatique (cellulases, hémicellulases et pectinases), congélation, etc. (AZEREDO *et al.* 2006 ; DELGADO-VARGAS *et al.*, 2000 ; ROSENTHAL *et al.* 1996).

Les procédés industriels d'extraction et de purification de caroténoïdes d'origine végétale ont fait l'objet de nombreux travaux pour être utilisés soit comme colorant soit comme antioxydant ou provitamine A. Plusieurs brevets ou demandes de brevet ont été déposés dans ce domaine.

Le brevet français WO 053530 (BIDAU, 2002) propose un procédé d'extraction et de concentration de caroténoïdes à partir de carottes. Les carottes sont préalablement lavées et broyées. Le broyat obtenu est blanchi (85-105°C / 2-10 min) et soumis à un second broyage. Il s'agit d'obtenir un broyat très fin dont la taille des particules est de l'ordre de 200 µm. Ce micro-broyage facilite l'éclatement cellulaire et permet une libération des micro-granules contenant les caroténoïdes. Le produit est alors acidifié avec de l'acide citrique, acétique ou ascorbique puis soumis à une liquéfaction enzymatique. L'étape d'acidification constituerait un moyen efficace de stabilisation des caroténoïdes en diminuant considérablement les possibilités d'isomérisation au cours du traitement thermique ultérieur. La liquéfaction consiste à ajouter au broyat des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques. Elle est réalisée pendant 2 à 3 h, à un pH compris entre 4 et 5 et à une température de 40 à 60°C. L'extrait acidifié obtenu est alors concentré par microfiltration tangentielle puis diafiltré. L'opération est réalisée sur membranes minérales jusqu'à un facteur de réduction volumique entre 1,5 et 2. La diafiltration est réalisée avec un à deux volumes d'eau. Elle permet d'éliminer environ 70% de la matière sèche soluble (sucres et des minéraux) présente dans le matériel et, de cette façon, d'augmenter la pureté des caroténoïdes dans le rétentat. L'extrait est ensuite soumis à un traitement thermique pour inactiver les enzymes et le stabiliser microbiologiquement (flash-pasteurisation, 90-110°C / 1-2 min). Il est alors congelé à -20°C puis décongelé à 4°C. Cette étape est nommée « cryoconcentration ». Elle permet de produire une séparation de phases qui sont ensuite facilement séparées par centrifugation à basse vitesse. En y ajoutant des antioxydants, les concentrés obtenus ont une très bonne stabilité et peuvent être conservés à température ambiante pendant au moins 250 jours à l'abri de la lumière et de l'oxygène. Au final, le procédé décrit permet d'éliminer 85% de la matière sèche initiale des carottes et de

concentrer globalement les caroténoïdes d'environ 20 fois. Le rendement d'extraction est généralement supérieur à 90% par rapport au contenu initial en caroténoïdes des carottes.

Le brevet PI 0507797-4 (ZIMMER, 2006) décrit un procédé et un équipement pour réaliser la diafiltration de jus de fruits épais. Ce procédé peut donc être utilisé pour concentrer et purifier les caroténoïdes contenus dans les jus de fruits. Durant la filtration on ajoute un premier flux d'eau comme fluide de lavage et ensuite un second flux en utilisant le perméat obtenu.

Le document WO 2004094350 (CROMBIE LANCE, 2004) décrit un procédé d'extraction des caroténoïdes à partir de matières végétales par fluide supercritique. Il s'agit d'une extraction fractionnée par CO<sub>2</sub> supercritique réalisée entre 100 et 1200 bar et entre 31 et 75°C. Elle est réalisée en deux étapes. La première extraction permet d'obtenir préférentiellement le  $\beta$ -carotène et la seconde, une concentration plus faible en  $\beta$ -carotène mais avec des quantités importantes de lutéine et autres xanthophylles (zéaxanthine, astaxanthine, capsorubine, cryptoxanthine). Le procédé permet de récupérer entre 10 et 60% du  $\beta$ -carotène initialement présent dans la matière première. De la même façon, le brevet PI 0605425-0 (MEIRELES *et al.*, 2007) décrit un procédé pour l'extraction et la purification de caroténoïdes à partir notamment de rocou (bixine). Ce procédé comprend une étape d'extraction au CO<sub>2</sub> supercritique suivi d'une purification par chromatographie d'adsorption sur colonne. L'extracteur et la colonne peuvent être montés en série.

La récupération des caroténoïdes à partir de micro-algues (*Dunaliella salina*) est décrite dans le brevet WO 98/28082 (SCOTT & SCOTT, 1998). Les algues sont produites sur des supports sphériques. Après mise en suspension, une agitation vigoureuse dans une boucle de circulation (de 3,5 à 13,5 bar) permet de rompre les cellules algales. Les solides sont ensuite concentrés par adsorption sur bulles (fractionnement de mousse). Si une plus grande concentration est souhaitée, le concentré d'algues peut être microfiltré (microfiltration tangentielle), sans perte significative de caroténoïdes dans le perméat. Le brevet intègre également la possibilité d'utiliser divers procédés d'extraction des caroténoïdes à partir du concentré d'algues : extraction par divers solvants ou huiles comestibles.

Le brevet EP 1051918A1 (DAURY et JULLERAT, 2000) décrit un procédé d'extraction des caroténoïdes et autres composés antioxydants (tocophérols, acide folique, etc.) à partir de végétaux divers (tomate, carotte, abricot, goyave, pastèque, melon, papaye, mangue,

épinard et piments). Dans ce procédé, les végétaux sont préalablement lavés et désinfectés dans une solution d'éthanol à 70%. Le produit est ensuite broyé avec 20 à 100% d'eau éventuellement en atmosphère inerte. Le broyat obtenu est incubé pendant une durée de 5 min à 24 h à une température inférieure à 20°C. Cette étape permet la dégradation des structures cellulaires par l'action des enzymes endogènes. Elle facilite l'extraction des caroténoïdes. L'extrait est alors soumis à un bref traitement thermique (70 à 120°C durant 5 s). Les caroténoïdes sont finalement séparés par décantation, centrifugation ou filtration. L'extrait obtenu peut contenir 1 à 10% de caroténoïdes en base sèche et de 0,005% à 0,5% d'autres composés antioxydants. Il peut être déshydraté par lyophilisation en présence de malto-dextrine ou d'un autre support d'hydratation. L'extrait peut être désucré par lavages successifs en dialyse ou par immersion dans l'eau.

Le brevet US 2004038774 (HO SUE SAN, 2006) a comme objet un procédé intégré pour l'extraction et la purification des tocophérols, caroténoïdes et des stérols à partir d'huiles végétales (notamment huile de palme) grâce à l'utilisation d'une estérification alcoolique. L'estérification est réalisée entre 5 et 90°C pendant 0,5 à 16 h sous agitation (10 à 500 tr.min<sup>-1</sup>). Après neutralisation, le mélange est distillé sous vide afin de récupérer les composés d'intérêt, entre autres, les caroténoïdes. La distillation fractionnée permet d'obtenir un concentré qui contient entre 20 et 50% des caroténoïdes totaux. Les principaux caroténoïdes récupérés sont l' $\alpha$ -carotène et le  $\beta$ -carotène. L'extrait contient également en plus faibles concentrations, du  $\gamma$ -carotène, licopène, phytoène et phytofluène. Au final, le rendement de récupération des caroténoïdes par rapport à la matière première est compris entre 0,1 et 10%. Le procédé ne dégrade pas significativement les composés thermosensibles.

En complément des documents cités ci-dessus, il est possible de mentionner le brevet brésilien PI 0103885-0 (ABREU, 2001) qui a pour objet la production d'un extrait enrichi en caroténoïdes à partir des fibres résiduelles de la production du jus de pomme cajou. Le procédé comprend une étape d'humidification des fibres (ratio eau/fibres variant entre 1/1 et 3/1, à pH compris entre 3 et 7) suivie de plusieurs cycles de pressage successifs (presse à vis continue). Les fibres résiduelles contenues dans l'extrait final sont éliminées par tamisage à 0,3 mm. Enfin, le produit est concentré par évaporation sous vide à 50 – 65°C. Les travaux présentés dans ce mémoire se basent principalement sur ce brevet. Il s'agit d'une part d'améliorer le procédé d'extraction et, d'autre part, de le compléter par des étapes de concentration à froid et de purification des caroténoïdes.

## **Chapitre III :**

# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

**Dans ce chapitre sont présentées toutes les méthodologies utilisées durant ces travaux de recherche. Il comprend une description détaillée de la matière première, des équipements et des procédures choisies.**

### **3. Matériels et Méthodes**

#### **3.1. Matière première**

Les résidus de pressage issus de la production du jus de pommes de cajou ont été utilisés comme matière première de départ. Les échantillons ont été collectés durant les saisons 2009 et 2010 à l'usine de jus clarifié "Sabor Tropical", située à São Gonçalo do Amarante, Ceará, Brésil. La variété de cajou utilisée est le clone CCP 76 à complète maturité.

Après la récolte, les fruits sont traités pour enlever la noix manuellement. Ensuite les pommes de cajou sont lavées et pressées pour la production du jus brut. A la fin de cette opération, les fibres brutes sont récoltées sous la forme d'un gâteau fibreux. Le rendement moyen de cette opération est d'environ 75 à 80% en jus brut soit 20 à 25% en fibres résiduelles.

A cause de leur haute périssabilité, les fibres ont été collectées parallèlement à la préparation du jus brut. Chaque lot de 100 kg a été conditionné en sacs de polyéthylène aluminé de 5 kg et congelé en chambre froide à -20°C jusqu'à décongélation pour les essais d'extraction.

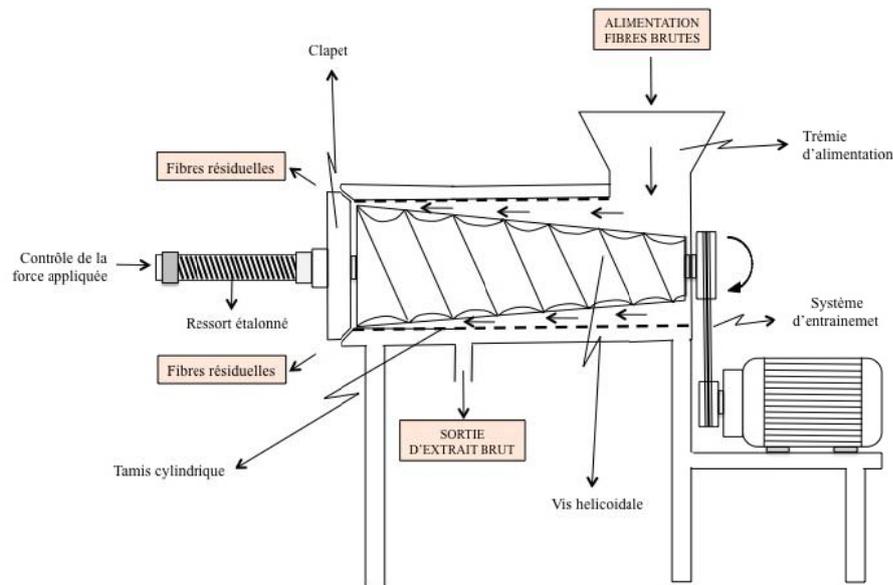
#### **3.2. Installations pilotes**

##### **3.2.1. Presse à vis**

Une presse à vis hélicoïdale continue de type INCOMAP 300 a été mise en œuvre (laboratoire des procédés agroindustriels de l'Embrapa Agroindustrie Tropicale, Fortaleza). Elle est munie d'un système motoréducteur de 2,2 KW/380 V. Elle est en acier inoxydable. Ce type de presse est fabriqué par l'entreprise INCOMAP/CEIL LTDA., située à Fortaleza, Brésil. Le modèle utilisé a une capacité moyenne de 300 kg.h<sup>-1</sup> (Figure 9). Afin de retenir les fibres à l'intérieur de la presse, un tamis de 0,8 mm laisse passer l'extrait en retenant le gâteau fibreux final. La presse à vis INCOMAP 300 permet une augmentation graduelle de la pression appliquée sur la masse de fibres au fur et à mesure de son cheminement dans l'appareil.

Pour les essais, la presse a été modifiée pour pouvoir moduler les principaux paramètres opératoires. Tout d'abord, la force appliquée sur la masse de fibres est réglée à l'aide d'un ressort étalonné installé sur le clapet de sortie. La force appliquée par le ressort a été

déterminée en fonction de sa déformation grâce à des mesures réalisées à l'INSTRON (Figure 10). Les valeurs limite de 350 N et 2500 N ont été choisies car correspondent à la zone linéaire de la courbe caractéristique du ressort. Enfin, la vitesse de rotation de la vis a pu être modifiée en changeant le système d'entraînement du moteur (poulies).



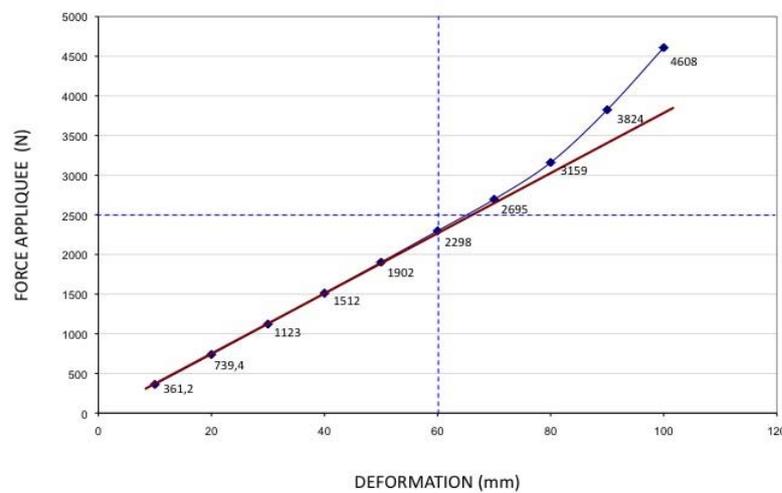
**Figure 9 :** Présentation schématique de la presse INCOMAP-300 utilisée pour l'extraction des caroténoïdes à l'échelle pilote.

Caractéristique des presses hélicoïdales, la presse à vis INCOMAP 300 promet une augmentation graduelle de force appliquée sur la masse de fibres qui passe dans l'hélicoïde. A chaque rotation de la vis, il y a une force correspondante de la masse fibreuse contre les parois du tamis de rétention.



**Figure 10 :** Démonstration du réglage de la force appliquée sur la masse des fibres dans la presse INCOMAP – 300.

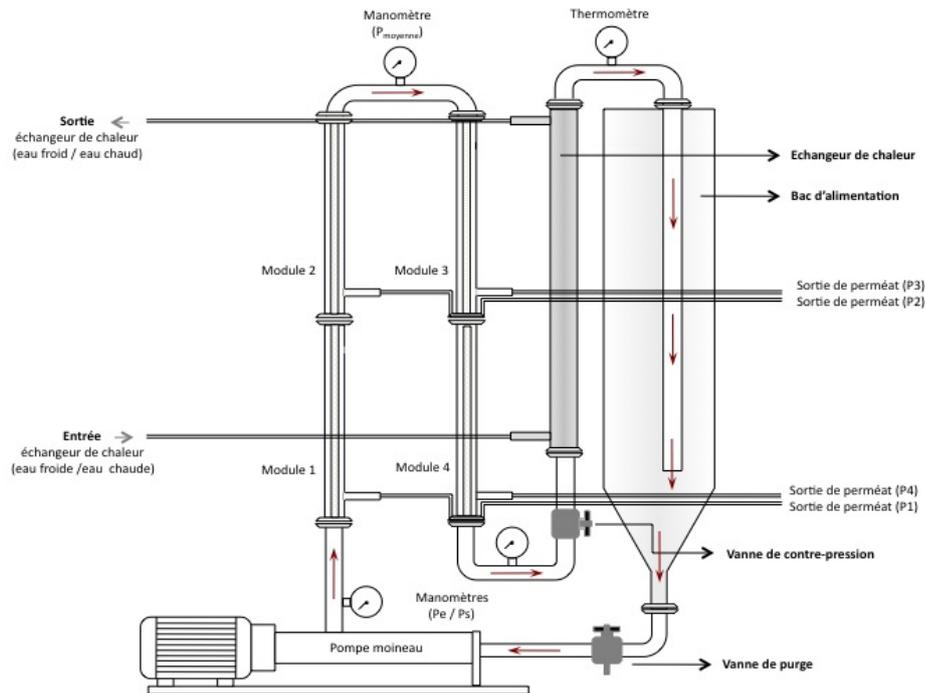
A la fin de la vis, il y a une plaque, sur laquelle est installé le ressort qui génère une force qui ferme partiellement la sortie de la masse pressée, permettant ainsi de régler la force appliquée par un ajustement de la pression exercée par le ressort. La force appliquée sur la plaque a été réglée et étalonnée à l'aide de la mesure de déformation du ressort comparée aux valeurs du tableau généré par l'INSTRON. Le graphique de la Figure 11 présente les valeurs mesurées avec l'INSTRON. On a utilisé comme limites les valeurs situées entre 350 N (valeur minimale) et 2 500 N (valeur maximale), car elles représentent la région où la régression de la courbe forme une droite.



**Figure 11** : Représentation graphique des essais de caractérisation du ressort installé dans la presse pour contrôler la force appliquée sur la masse de fibres de cajou.

### 3.2.2. Pilote de microfiltration tangentielle

Les essais de microfiltration ont été réalisés avec un pilote de laboratoire TIA (*Techniques Industrielles Appliquées*, Bollène, France et positionné dans la salle membrane du CIRAD à Montpellier) muni de membranes tubulaires type monocanal en alumine Membralox (PALL EXEKIA, Bazet, France) de 0,2  $\mu\text{m}$  de diamètre moyen de pores. Ce pilote comprend un bac d'alimentation d'une capacité de 3,0 L avec 4 modules disposés en série, chacun contenant une membrane de 0,0055  $\text{m}^2$  (Figure 12).



**Figure 12 :** Schéma du pilote de laboratoire de microfiltration tangentielle utilisé dans les étapes de concentration et de diafiltration d'extraits de fibres de cajou.

La pression transmembranaire moyenne ( $P_{tm}$ ) est calculée dans chaque module à partir des pressions d'entrée ( $P_e$ ) et de sortie ( $P_s$ ) selon les équations 1 à 4 (profil de pression considéré linéaire côté rétentat et pertes de charge singulières négligeables dans l'installation).

$$P_{tm1} = \frac{7P_e + P_s}{8} \quad (1) \qquad P_{tm2} = \frac{5P_e + 3P_s}{8} \quad (2)$$

$$P_{tm3} = \frac{3P_e + 5P_s}{8} \quad (3) \qquad P_{tm4} = \frac{P_e + 7P_s}{8} \quad (4)$$

Pour les essais, les pressions transmembranaires sont ajustées à l'aide de la vanne de contrepression qui permet de modifier  $P_e$ . Les valeurs utilisées ont varié entre 1,25 et 5,2 bar selon la position des membranes.

Une pompe Moineau de 0,74 kW permet la mise sous pression du liquide et sa circulation tangentielle dans le système. La vitesse tangentielle de recirculation est fixée à  $6,0 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  et le rétentat circule en continu dans le système de filtration. Le volume mort du pilote est

évalué à 1,3 L (pompe, tuyaux, membranes et bac d'alimentation au niveau minimum). La température du système est maintenue à  $40 \pm 2^\circ\text{C}$ , en utilisant un échangeur de chaleur installé sur le circuit de circulation du rétentat.

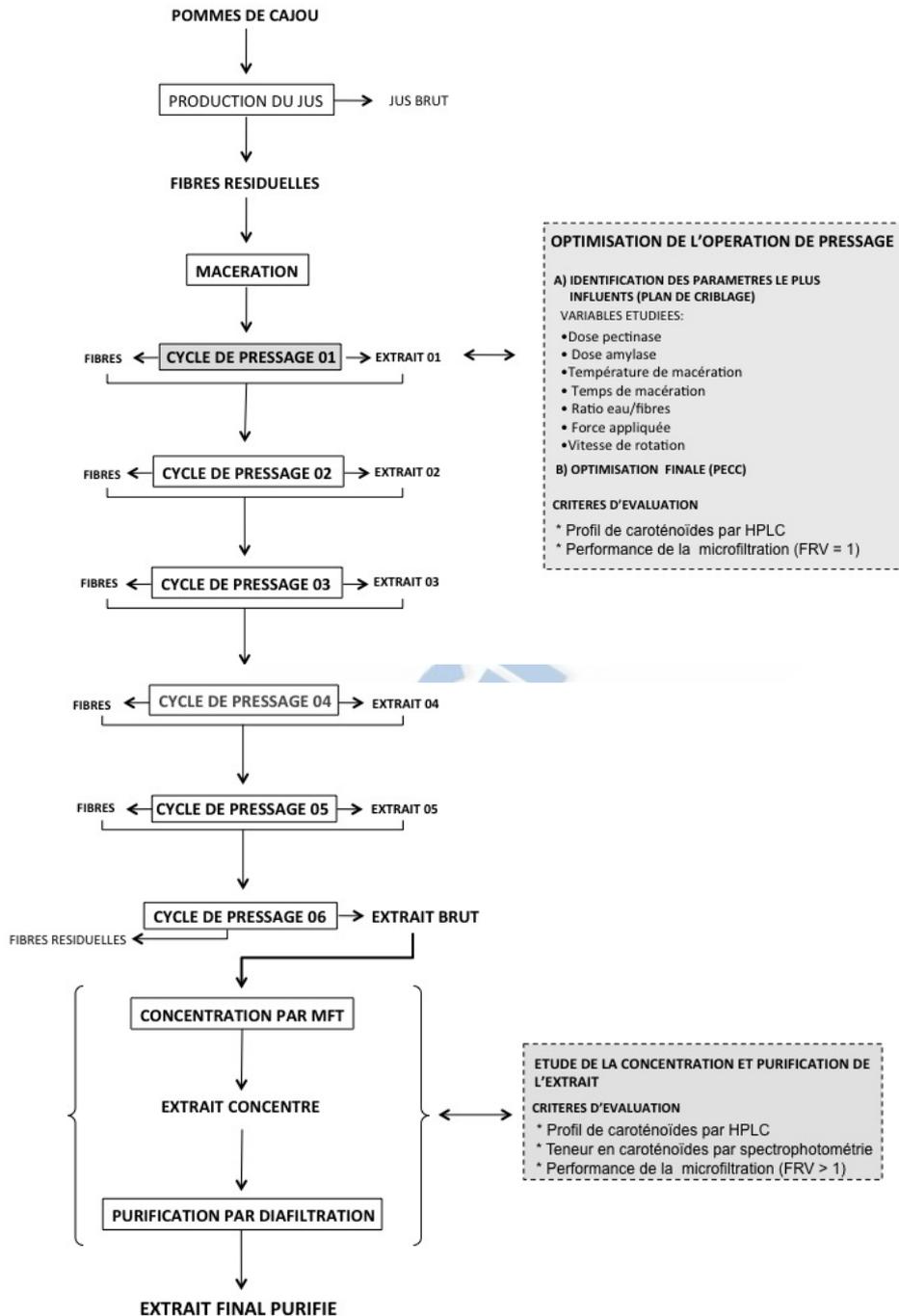
Après mise au point, le protocole optimal finalement retenu est le suivant : un premier rinçage à l'eau est effectué sans pression à  $60^\circ\text{C}$  pour éliminer la majorité des résidus et des composés solubles. Afin d'éliminer la matière organique, la première phase du nettoyage s'effectue durant 30 min à  $80^\circ\text{C}$  avec une solution de soude à 5% contenant  $400 \text{ mg.L}^{-1}$  de chlore actif. (10 min sans pression, 20 min à une pression transmembranaire moyenne de 1 bar). L'installation est ensuite rincée plusieurs fois à l'eau courante jusqu'à un pH inférieur à 8 ( $P_{tm} = 0,5 \text{ bar}$ ). La deuxième phase de nettoyage est réalisée avec de l'acide nitrique à 1% durant 20 min à  $70^\circ\text{C}$  (10 min sans pression, 10 minutes à 1 bar). Il s'agit de solubiliser les impuretés minérales et de reconditionner chimiquement la membrane en alumine. Ce traitement à l'acide nitrique contribue également à protéger les éléments en acier inoxydable du pilote contre la corrosion par le chlore utilisé dans l'étape alcaline, qui est très agressif pour le système. Ce nettoyage est suivi de rinçages jusqu'à un pH supérieur à 6. La perméabilité est finalement mesurée pour que l'on puisse s'assurer de l'efficacité de la procédure. Si elle est inférieure à  $1000 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{bar}^{-1}$ , un deuxième nettoyage doit être effectué. Lorsque les pores de la membrane sont très colmatés, il est toutefois possible de la régénérer en la calcinant à  $650^\circ\text{C}$  pendant 3 h (chauffage et refroidissement lent).

### **3.3. Démarche expérimentale**

Le procédé choisi pour l'obtention de l'extrait concentré et purifié de caroténoïdes à partir de fibres de pommes cajou est présenté sur la Figure 13. Il comporte schématiquement 2 grandes étapes. La première étape correspond à "l'extraction aqueuse" des caroténoïdes qui est réalisée par pression et entraînement à l'eau après macération enzymatique. Plusieurs cycles consécutifs de pressage sont utilisés conformément aux propositions d'ABREU (2001) et d'AZEREDO *et al.* (2006). La seconde étape vise à concentrer et à purifier l'extrait brut par microfiltration tangentielle et diafiltration sur membranes céramiques. Ce procédé ne fait pas intervenir de solvant organique. Il ne génère donc aucun problème de résidu dans l'extrait. Il est de plus réalisable à température ambiante ce qui évite la dégradation thermique des caroténoïdes.

En se basant sur ce schéma, l'objectif général de notre travail est de proposer un procédé optimisé. La démarche d'optimisation est conduite en 2 temps :

- A) optimisation de l'extraction aqueuse : pour simplifier la démarche expérimentale cette optimisation a été réalisée sur un seul cycle de pressage. Le critère d'optimisation principal utilisé est la teneur en caroténoïdes de l'extrait. Un second critère est considéré en parallèle, il s'agit de la filtrabilité de l'extrait. En effet, l'extraction est susceptible de modifier considérablement le pouvoir colmatant de l'extrait vis à vis des membranes de microfiltration (teneur et granulométrie de la fraction insoluble, composition de la fraction soluble, viscosité, etc.). Cette filtrabilité a été évaluée à partir des densités de flux de perméat obtenues à FRV 1 (sans concentration) à diverses pressions transmembranaires. Compte-tenu du grand nombre de paramètres susceptibles d'influencer les résultats, nous avons tout d'abord choisi de sélectionner les paramètres les plus influents via un plan d'expériences de criblage (plan factoriel de Plackett-Burman ou matrice de Hadamard). Ensuite, les paramètres identifiés comme étant les plus influents ont été optimisés via un plan d'expériences rotatable central composite (PECC) couplé à la méthode des surfaces de réponse (modèle quadratique) ;
  
- B) Étude de la concentration par microfiltration et de la purification par diafiltration afin de vérifier la faisabilité du procédé et de proposer des conditions optimales de traitement. Cette seconde partie a été réalisée en utilisant un extrait brut obtenu après 6 cycles de pressage dans les conditions précédemment optimisées à l'étape A.



**Figure 13 :** Schéma général des opérations unitaires pour l'obtention d'extraits enrichis et purifiés par diafiltration à partir de fibres résiduelles de la production du jus de pomme de cajou.

### **3.3.1. Étude de l'extraction**

#### **3.3.1.1. Recherche des paramètres les plus influents**

Cette première étape a pour objectif d'évaluer l'effet de l'ensemble des conditions opératoires sur les résultats. Les paramètres opératoires associés à cette opération unitaire sont nombreux et variés et il est difficile a priori de prévoir l'effet de chacun d'entre eux sur le rendement d'extraction ou la filtrabilité de l'extrait. Au final, ce travail doit permettre de sélectionner les paramètres les plus influents afin d'y focaliser la démarche d'optimisation.

Les conditions opératoires susceptibles d'influencer les résultats (« facteurs ») ont tout d'abord été répertoriées. Pour chacun d'entre eux, une valeur maximale et une valeur minimale ont ensuite été définies afin de planifier les essais expérimentaux :

- Force appliquée sur la masse des fibres ( $F_a$ ) de 350 à 2 500 N (bornes choisies en fonction des caractéristiques du ressort de compression, correspondant à la zone linéaire du ressort).
- Température de macération enzymatique ( $T_m$ ) de 30 et 55°C (température ambiante locale moyenne et valeur maximale admissible par les enzymes respectivement).
- Ratio eau/tourteaux ( $R_{e/t}$ ) de 1:1 à 2:1 (ratio minimal pour un fonctionnement satisfaisant de la presse hélicoïdale et ratio maximal correspondant à une consommation raisonnable d'eau dans le contexte local).
- Dose des préparations enzymatiques et nature des activités prédominantes. Deux préparations enzymatiques ont été testées à ce niveau : PECTINEX SP-L (Ultrazymes), préparation à activité pectinolytique prépondérante et AMG (Novozymes), préparation à activité amilolytique prépondérante. Elles seront utilisées seules ou en mélange à une dose maximale fixée à  $100 \mu\text{L.L}^{-1}$  ( $E_p$  ou  $E_a$ ). La dose minimale correspond à un traitement sans enzyme.
- Temps de macération enzymatique ( $t_m$ ) de 15 et 60 min (durées minimales pour obtenir une liquéfaction significative et maximale pour limiter la dégradation microbienne du produit).
- Vitesse de rotation de la vis de la presse ( $V_r$ ) de 30 à 60  $\text{tr.min}^{-1}$  (valeurs minimale et maximale réglables sur l'installation).

Les expériences ont alors été planifiées à partir d'une matrice de Hadamard à 7 facteurs afin de limiter le nombre d'essais expérimentaux tout en garantissant une validité statistique des résultats (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Matrice de Hadamard à 7 facteurs et 8 essais utilisée pour le criblage des paramètres opératoires lors de l'extraction des caroténoïdes par pressage des fibres de cajou (-1 : niveau minimal du facteur, 1 : niveau maximal).

	<b>t<sub>m</sub></b>	<b>T<sub>e</sub></b>	<b>E<sub>p</sub></b>	<b>E<sub>a</sub></b>	<b>V<sub>r</sub></b>	<b>R<sub>e/t</sub></b>	<b>F<sub>a</sub></b>
<b>Essai 01</b>	1	1	1	-1	1	-1	-1
<b>Essai 02</b>	-1	1	1	1	-1	1	-1
<b>Essai 03</b>	-1	-1	1	1	1	-1	1
<b>Essai 04</b>	1	-1	-1	1	1	1	-1
<b>Essai 05</b>	-1	1	-1	-1	1	1	1
<b>Essai 06</b>	1	-1	1	-1	-1	1	1
<b>Essai 07</b>	1	1	-1	1	-1	-1	1
<b>Essai 08</b>	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

La matrice de Hadamard conduit à la réalisation de 8 essais expérimentaux en substituant les valeurs codées par les valeurs réelles correspondantes pour chaque facteur (Tableau 5). Les essais sont réalisés sur des lots de 5 kg de fibres.

**Tableau 5 :** Plan d'expériences utilisé pour sélectionner les paramètres opératoires les plus influents lors de l'extraction des caroténoïdes par pressage des fibres de cajou.

	<b>t<sub>m</sub></b>	<b>T<sub>e</sub></b>	<b>E<sub>p</sub></b>	<b>E<sub>a</sub></b>	<b>V<sub>r</sub></b>	<b>R<sub>e/t</sub></b>	<b>F<sub>a</sub></b>
<b>E 01</b>	55	60	100	Sans enzyme	30	1:1	350
<b>E 02</b>	55	60	Sans enzyme	100	30	1:2	1500
<b>E 03</b>	30	60	100	100	60	1:2	350
<b>E 04</b>	30	15	100	100	30	1:1	1500
<b>E 05</b>	55	15	100	Sans enzyme	60	1:2	1500
<b>E 06</b>	30	60	Sans enzyme	Sans enzyme	60	1:1	1500
<b>E 07</b>	55	15	Sans enzyme	100	60	1:1	350
<b>E 08</b>	30	15	Sans enzyme	Sans enzyme	30	1:2	350

Pour chaque essai, les critères d'évaluation choisis sont mesurés : teneurs en caroténoïdes de l'extrait par HPLC et densités de flux de perméat en microfiltration. Les résultats obtenus sont alors traités par régression linéaire afin de représenter l'effet des facteurs (exprimés en valeurs codées +1 et -1) sur les différents critères d'évaluation. Pour chaque facteur étudié, le coefficient directeur de la droite de régression obtenue correspond à l'effet

de ce facteur. Son signe indique s'il influe le critère positivement ou non. Afin de faciliter la comparaison des facteurs entre eux, leur effet sera exprimé en pourcentage de la valeur moyenne du critère considéré.

**3.3.2. Optimisation des paramètres opératoires les plus influents**

Suite à la première étape, les deux paramètres opératoires les plus influents sur la teneur en caroténoïdes des extraits et sur les performances de la microfiltration tangentielle, ont été sélectionnés. Ces deux paramètres opératoires ont été optimisés à partir d'un plan d'expériences central composite (PECC). Ce plan nécessite la réalisation de 11 essais expérimentaux (avec 3 répétitions au point central) et permet de tester chaque paramètre à 5 niveaux ( $\pm \alpha$ ,  $\pm 1$  et 0). Pour un nombre quelconque de variables indépendantes  $k$ ,  $\alpha = (2^k)^{1/4}$ . Dans notre cas,  $k$  est égal à 2 d'où  $\alpha = \sqrt{2}$ .

Le Tableau 6 présente le plan d'expériences et les combinaisons des niveaux pour la réalisation des essais établis en suivant le plan rotatoire selon les indications de Rodrigues et IEMMA (2005) et CALADO et MONTGOMERY (2003). Les essais E09, E10 et E11 représentent la répétition au point central.

**Tableau 6** : Plan d'expériences central composite utilisé pour optimiser les 2 paramètres opératoires les plus influents sur les résultats : X1 et X2.

Essai	X1	X2
E01	-1	-1
E02	1	-1
E03	-1	1
E04	1	1
E05	$-\alpha$	0
E06	$\alpha$	0
E07	0	$-\alpha$
E08	0	$\alpha$
E09	0	0
E10	0	0
E11	0	0

\*  $\alpha = (2^k)^{1/4}$  ;  $k = 2$

Les divers résultats obtenus sont ensuite traités à l'aide du logiciel *Statistica 7.0* pour établir un modèle quadratique (méthode des surfaces de réponse).

### 3.4. Conduite des essais de microfiltration tangentielle

#### 3.4.1. Essais de microfiltration sans concentration

Pour évaluer la filtrabilité des extraits en fonction des conditions d'extraction, des essais de filtration à FRV 1 sont conduits avec 3 L d'extrait brut. Dans ce cas, tous les perméats recueillis sont recyclés au niveau du bac d'alimentation. Cette configuration sans concentration permet de maintenir la composition du rétentat constant durant tout l'essai et de limiter la quantité de produit à utiliser.

#### 3.4.2. Concentration des caroténoïdes par microfiltration

La concentration des caroténoïdes par microfiltration a été réalisée, selon les cas, soit en une seule étape à volume constant, soit en 2 phases successives, la première à volume constant, la seconde à volume variable. La seconde option permet d'atteindre plus aisément des facteurs de réduction volumique (FRV) élevés. Pour tous les essais, la boucle est initialement alimentée avec 3 L d'extrait brut.

Durant la phase de concentration à volume constant, des échantillons de perméat ont été récoltés toutes les 10 min pour mesurer les flux. Le volume de la boucle est maintenu à 3 L en rajoutant dans le bac d'alimentation une quantité d'extrait brut équivalente à celle du perméat récolté. Le volume d'alimentation en extrait brut ( $V_A$ ) est égal au volume de la boucle de circulation ( $V_B$ ) additionné du volume de perméat extrait ( $V_P$ ). Le volume de rétentat ( $V_R$ ) correspond au volume de la boucle de circulation ( $V_B$ ). Le FRV se calcule alors selon l'équation 7.

$$FRV = \frac{V_A}{V_R} = \frac{V_B + V_P}{V_B} = 1 + \frac{V_P}{V_B} \quad (5)$$

Durant la seconde phase de concentration à volume variable, le volume de perméat est extrait en continu, mais il n'est plus compensé par l'ajout d'extrait dans le bac d'alimentation. Ainsi, le volume de produit circulant dans la boucle diminue et le rétentat se concentre plus rapidement. L'opération est conduite jusqu'à un volume circulant d'environ 1,3 L, qui est considéré comme le volume minimal admissible dans l'installation. A ce stade, l'expression du FRV change par rapport à la phase de concentration à volume constant. En notant  $V_{PV}$  le volume de perméat extrait uniquement pendant la phase de concentration à volume variable, il se calcule à partir de l'équation 8.

$$FRV = \frac{V_B + V_P}{V_B - V_{PV}} \quad (6)$$

Afin d'obtenir la concentration la plus élevée possible en caroténoïdes, nous avons cherché à travailler à FRV maximal, au moins supérieur à 10. Toutefois, compte-tenu des grandes quantités de produit requises, certains essais préliminaires ont été réalisés à des FRV compris entre 5 et 10 pour l'évaluation du procédé.

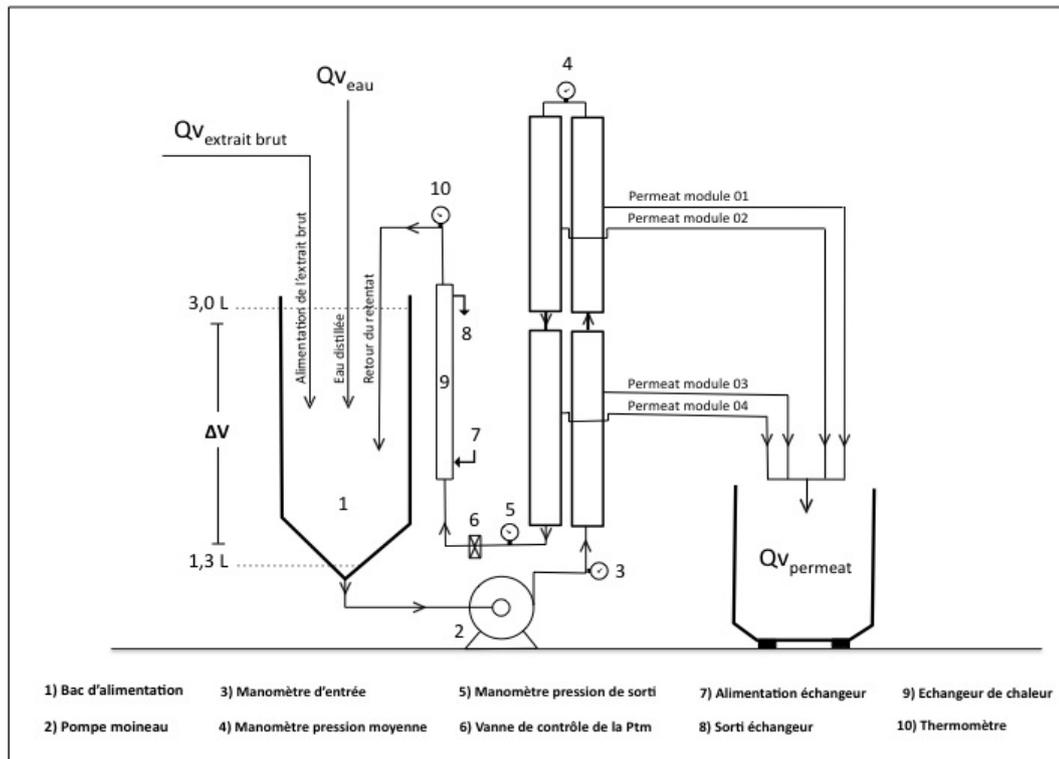
Tous les essais de microfiltration avec concentration ont été réalisés à  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  à partir d'un extrait obtenu après 6 cycles de pressage dans les conditions suivantes : ratio eau/tourteaux 1/1, macération avec  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Pectinex SP-L à  $55^\circ\text{C}$  pendant 60 min, force appliquée  $2\ 500 \text{ N}$ , vitesse de rotation de la vis  $30 \text{ tr.min}^{-1}$ , tamisage sur tamis 0,3 mm.

Les mesures de débits sont réalisées à l'aide d'éprouvettes et d'un chronomètre numérique.

Avant chaque essai, un échantillon d'extrait brut est prélevé dans un flacon ambré, mis sous azote et placé à l'abri de la lumière à  $-20^\circ\text{C}$ . La quantité prélevée est remplacée dans le bac d'alimentation afin de conserver le volume de la boucle de circulation. A la fin des essais, le rétentat final est entièrement récupéré puis conditionné de la même façon.

### *3.4.3. Purification par diafiltration*

Parmi les possibilités de conduite de la diafiltration, nous avons choisi la procédure 2 à volume constant (cf. Fig.8 – chapitre II) Cette procédure est simple à mettre en œuvre et plus économique en eau. La diafiltration est réalisée à la suite de la concentration. Quand le FRV de consigne est atteint, l'étape de diafiltration débute, avec l'ajout d'un volume d'eau (diavolume DV) identique à celui du perméat recueilli. Pour arrêter la diafiltration, l'extrait sec soluble (ESS) est utilisé comme paramètre de contrôle. Il est mesuré toutes les 10 min. La diafiltration est conduite jusqu'à obtenir un extrait sec soluble inférieur à  $10 \text{ g.kg}^{-1}$  dans le perméat indiquant que la majorité des composés hydrosolubles présents (principalement sucres, acides organiques et minéraux) ont été éliminés. Durant cette phase, il n'y a pas de concentration et le volume de la boucle reste constant jusqu'à la fin du procédé. La Figure 14 propose une représentation schématique de la conduite de l'opération de diafiltration.



**Figure 14 :** Mode d'utilisation du pilote de microfiltration tangentielle pour la purification des extraits caroténoïdiques par diafiltration ( $Q_V$  débit volumique).

Les débits volumiques ( $Q_V$ ) sont mesurés pour tous les fluides d'alimentation et les perméats. Pour une concentration couplée à une diafiltration, l'essai se déroule en 3 phases :

- Concentration à volume constant :  $Q_{VEB} = Q_{VP}$  ;  $Q_{VE} = 0$
- Concentration à volume variable :  $Q_{VEB} = 0$  ;  $Q_{VE} = 0$
- Diafiltration :  $Q_{VE} = Q_{VP}$  ;  $Q_{VEB} = 0$

où  $Q_{VEB}$ ,  $Q_{VE}$  et  $Q_{VP}$  sont les débits volumiques respectivement de l'extrait brut, de l'eau et du perméat.

Pour chaque essai, des échantillons d'extrait brut, de perméat et le rétentat final ont été collectés pour les analyses.

### 3.5. Méthodes d'analyses de la matière première et des produits

#### 3.5.1. Analyse chromatographique des caroténoïdes

L'analyse des caroténoïdes par chromatographie liquide est réalisée en 3 phases successives : extraction liquide/liquide par solvant organique, saponification des formes

estérifiées pour permettre leur séparation et leur identification, dosage chromatographique proprement dit.

#### **3.5.1.1. L'extraction des caroténoïdes**

L'extraction des caroténoïdes a été réalisée d'après les études précédentes de Dhuique-Mayer *et al.*, 2007. Un aliquote de 20 g d'extrait aqueux (ou 10 g de concentré) a été collectée et homogénéisée par agitation magnétique avec 120 mg de MgCO<sub>3</sub> et 35 mL d'un mélange éthanol/hexane 4/3 (v/v) contenant 0,1% de BHT (butyl hydroxytoluène) comme antioxydant. Elle a été agitée pendant 5 min pour l'extraction totale des caroténoïdes des échantillons. Le résidu a été séparé de la phase liquide par filtration à l'aide d'un entonnoir frité (porosité n°2) et ré-extrait avec 35 ml de la solution d'éthanol/hexane 4/3 comme précédemment. L'éthanol (30 ml) et l'hexane (30 ml) ont été successivement utilisés pour laver le résidu. Les phases organiques ont été transférées dans une ampoule à décanter et lavées avec deux aliquotes de 50 ml de chlorure de sodium à 10% (déstabilisation de l'émulsion) et trois aliquotes de 50 ml d'eau distillée. La phase aqueuse est éliminée. L'extrait hexanique a été évaporé à sec avec un évaporateur rotatif, à nouveau dissout à l'aide de 20 ml d'hexane et placé dans un flacon ambré de 50 ml dans lequel ont été ajoutés 20 ml de solution de KOH méthanolique à 10%.

#### **3.5.1.2. La saponification**

Une étape de saponification durant au moins 16 h à l'abri de la lumière était nécessaire pour hydrolyser les esters de caroténoïdes et faciliter l'interprétation des résultats. La phase de KOH méthanolique a été extraite avec trois aliquotes de 15 ml de dichlorométhane et ensuite lavée avec de l'eau distillée pour enlever l'alcalinité. Puis, les extraits de caroténoïdes ont été dissouts dans 1 ml d'un mélange de dichlorométhane, MTBE (méthyl tertio-butyl éther) et de méthanol 50/40/10 (v/v/v), filtré à 0,45µm avant injection en HPLC.

#### **3.5.1.3. Dosage chromatographique**

Un chromatographe AGILENT 1100 (Massy, France), équipé d'un détecteur à barrettes de photodiodes a été utilisé. La séparation a été réalisée avec une colonne C<sub>30</sub> (250 x 4,6 mm di, 5 µm, YMC EUROP GMBH, Allemagne). La phase mobile utilise l'eau comme éluant A, le méthanol comme éluant B et le MTBE comme éluant C (débit 1 mL.min<sup>-1</sup>). La température de la colonne a été réglée à 25°C et le volume d'injection était de 20 µL. Les

lectures et interprétation des pics chromatographiques ont été effectuées à des longueurs d'onde de 400 et 450 nm.

Le gradient d'éluion utilisé est le suivant : 0-5 min (40% de A et B de 60%) ; 5-10 min (20% de A et 80% de B) ; 10-60 min (4% A, 81% B et 15% de C) ; 60-71 min (4% de A, 11% de B et 85% de C) ; 71-72 min (100% de B), et retour à l'état initial pour l'équilibrage. Les caroténoïdes ont été analysés quantitativement via un étalonnage externe avec du  $\beta$ -carotène, de la  $\beta$ -cryptoxanthine et de la lutéine. Les courbes ont été construites avec 5 niveaux de concentration en triplicata. Les coefficients de corrélation s'échelonnaient de 0,994 à 0,998.

### **3.5.2. Autres analyses**

#### **3.5.2.1. Dosage des caroténoïdes totaux**

Dans la partie concentration et purification des extraits par microfiltration et diafiltration, les contenus en caroténoïdes totaux ont été déterminés par la méthode spectrophotométrique UV à 450 nm selon la méthodologie de HIGYB (1962). Les caroténoïdes sont extraits à partir de 10 mL d'échantillons. Ils sont tout d'abord séparés par centrifugation puis récupérés à l'aide d'hexane dans une ampoule à décanter. La phase caroténoïdique est séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre, filtrée. L'absorbance de l'extrait est enfin mesurée à 450 nm (spectrophotomètre UV-Visible – VARIANT 50BIO). Bien que moins informative, cette méthode est mobilisée à ce stade car elle plus rapide, plus simple et plus fiable par rapport à la méthode HPLC.

#### **3.5.2.2. Matière sèche totale et extrait sec soluble**

Le principe de détermination de la matière sèche (MST) est basé sur l'évaporation de l'eau contenue dans l'échantillon par dessiccation. La méthode utilisée a consisté à pré-sécher dans une étuve 5 g d'échantillon à 50°C pendant 24 h dans des coupelles préalablement pré-séchées. Ensuite la dessiccation est réalisée sous vide à 60°C pendant 24 h.

L'extrait sec soluble (ESS) a été déterminé par réfractométrie à température ambiante grâce à un réfractomètre Pocket Pal-1 ATAGO de précision 0,1 g.100g<sup>-1</sup>.

#### **3.5.2.3. Solides insolubles en suspension**

La détermination des solides insolubles en suspension (SIS), a été réalisée dans une Centrifugeuse BECKMAN COULTER Allegra<sup>TM</sup> 21. La méthode consiste à centrifuger 20 g d'échantillons à 13980 g durant 20 min. Le surnageant est éliminé, le culot est repris à

l'aide d'eau distillée afin d'être à nouveau centrifugé. Ces étapes sont effectuées trois fois. L'ultime culot est récupéré dans une coupelle en aluminium préalablement tarée pour en mesurer la matière sèche (24 h à l'étuve à 107°C puis 24 h à l'étuve sous vide à 80°C).

Rapport Gratuit.com

**Chapitre IV :**  
**Résultats et discussions**

#### **4. Résultats et discussions**

##### ***4.1. Caractérisation des profils caroténoïdiques de pomme cajou et des extraits obtenus***

Ce chapitre aborde la caractérisation du profil des caroténoïdes de la pomme de cajou CCP 76 et des extraits aqueux bruts et concentrés. Il est présenté sous la forme d'une publication qui a été acceptée le 3 octobre 2012 dans la revue *Food Chemistry*.

## Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) extract from by-product of juice processing: a focus on carotenoids

<sup>1</sup>Abreu, F. A. P. ; <sup>2</sup>Dornier, M.; <sup>1</sup>Dionisio, A.P.; <sup>3,4</sup>Carail M.;

<sup>3,4</sup>Caris-Veyrat C.; \*<sup>2</sup>Dhuique-Mayer, C.

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria Tropical. Av. Dra. Sara Mesquita, 2270. CEP: 60511-110 - Planalto Pici. Fortaleza, Ceará, Brasil.

<sup>2</sup>CIRAD Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Montpellier SupAgro, UMR Qualisud, TA-B95/16, 34398 Montpellier cedex 5, France.

<sup>3</sup>INRA, UMR408 Safety and Quality of Plants Products, F-84000 Avignon, France.

<sup>4</sup>University of Avignon, UMR408 Safety and Quality of Plants Products, F-84000 Avignon, France.

\*To whom correspondence should be addressed: Fax: 33 4 67 61 44 33 E-mail: claudie.dhuique-mayer@cirad.fr

### Abstract

Cashew apple fibrous residue is a by-product of cashew juice industry. After pressing using a helical type continuous press followed by crossflow microfiltration, an aqueous extract was obtained from these cashew apple fibers. It was characterized by an intense yellow color due to carotenoid pigments. Carotenoids were identified and quantified in the cashew apple before extraction, in its aqueous extract and in the concentrate obtained by microfiltration. Cashew apple aqueous extract and its concentrate presented a carotenoid profile with 11 carotenoids, most of them were tentatively identified by HPLC-DAD-MS and are xanthophylls present under an esterified form. Auroxanthin, and  $\beta$ -cryptoxanthin represented around 50 % of total carotenoids. Concentration of the extract by microfiltration led to epoxy-furanoxo rearrangement of violaxanthin and antheraxanthin. The process allowed to increase 10 times total carotenoid content compared with initial cashew apple. Total carotenoid content of the final concentrated extract reached 54 mg/kg.

**Keywords:** carotenoids, cashew apple, concentrate, yellow pigment, residual fibers.

### 1. Introduction

Cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) is a tropical fruit originally from Brazil, where it is widely cultivated and commercially exploited. Nowadays it is well distributed in several countries in Asia, Africa and Central America, posing as an agricultural crop of great economic importance (Embrapa, 1999; Leite & Paula Pessoa, 2002). The nuts, the real

fruit of cashew tree, represent only 10% of the total weight of the harvested product, and large amounts of cashew apples, the hypertrophied peduncle of the nut, are left in the field after nut removal (Fontes, Honorato, Rabelo, & Rodrigues, 2009). Based on average annual production of 260 000 tons of nuts, in Brazil there is a production of over two million tons of cashew apple pseudo-fruit at each harvest (Lautié, Dornier, Souza Filho, & Reynes, 2001; FAO, 2009).

The pseudo-fruits, considered as a waste material by the cashew nut industry, are consumed in specific regions in Brazil (Northeast and North) and few countries (Kubo, Ochi, Vieira, P.C. & Komatsu, 1993). Nowadays, a number of processes have been developed for converting the cashew apple into other products such as jam, syrup, chutney, beverage and juice (Paiva & Barros, 2004; Silva Neto, 2003). The cashew apple juice is considered, as one of the most popular juices in Brazil today (Kubo, Ochi, Vieira, P.C. & Komatsu, 1993), and is widely accepted by the population, due to its weak astringent taste (Assunção & Mercadante, 2003a).

About 20 to 25% of the pseudo-fruit used in the processing industry became residual fiber that was currently almost entirely discarded or used as animal feed supplement (Azeredo, Abreu, Sousa, Souza & Brito, 2006). However, in recent years, there has been an increasing trend towards more efficient utilization of agro-industrial residues, and some works have been conducted to exploit some alternatives to use this agroindustrial residue as source of minerals, fibers and carotenoids. The feasibility of different processes to recover carotenoids from this by-product was already evaluated (Abreu, 2001; Leite & Paula Pessoa, 2002; Azeredo, Abreu, Sousa, Souza & Brito, 2006). Nevertheless carotenoids composition of the extracts has never been characterized. In this sense, evaluate the profile and content of carotenoids in the residual fiber extract will be interesting, due to the possible application of these carotenoid-containing extracts particularly in the food industry for their coloring properties.

The cashew apple has been found to be a material containing a series of nutritional phytonutrients: vitamin C, flavonoids and particularly carotenoids (Rodriguez-Amaya Kimura. & Amaya-Farfan, 2009; Abreu, 2001; Brito, Araújo, Lin & Harn, 2007). The first identification of specific carotenoids from cashew apple juice were obtained by Cecchi and Rodriguez-Amaya (1981) using thin layer chromatography. They identified provitamin A carotenoids such as  $\alpha$ -carotene, *trans*- and *cis*-  $\beta$ -carotene,  $\zeta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin in minor concentration and also high content of auroxanthin. These authors concluded that the

total carotenoid content and vitamin A value in cashew apple juice were low. Later, Assunção and Mercadante, (2003a and b) completed these data on two cashew apples from two Brazil origin using HPLC. Then, Zepka and Mercadante (2009) studied carotenoids and degradation compounds from a cashew apple juice by HPLC connected to mass spectrometer. Numerous xanthophylls were present but  $\beta$ -cryptoxanthin and  $\beta$ -carotene were the major carotenoids. These two carotenoids are precursors of vitamin A, moreover  $\beta$ -carotene exhibits radical or singlet oxygen trapping activity *in vitro* or in plant and consequently could have a potential antioxidant effect *in vivo*. Because of these properties carotenoids have been associated with reducing the risk of several degenerative diseases including cancer (Miller, Sampson, Candeias, Branley & Rice-Evans, 1996; Ramel, Birtic, Cuiné, Triantaphylidés, Ravana & Havaux, 2012). Among other carotenoids studied, some were of nutritional interest such as lutein and zeaxanthin which are macular pigments involved in the protection against light-induced retinal damage and age-related macular degeneration (Landrum & Boney, 2001).

Consequently, this study aims to identify and quantify carotenoids which give an intense yellow color to the aqueous extract and concentrate obtained by pressing and microfiltrating an agro-industrial residue obtained from the cashew apple processing. The carotenoid profile of extract and concentrate were also compared with that of fresh cashew apple in order to evaluate the effect of processing on carotenoids. The quantification and identification of carotenoids was made on three different materials: (1) fresh cashew apple fruit, (2) cashew apple aqueous extract before and, (3) after the concentration step by crossflow microfiltration.

## **2. Materials and methods:**

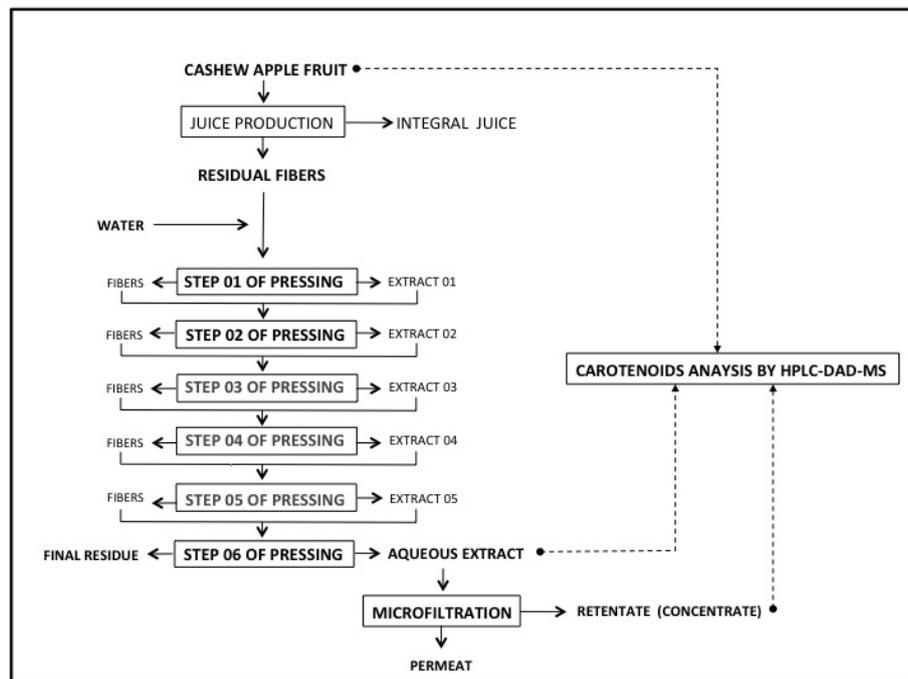
### **2.1. Materials**

Samples of cashew variety CCP-076 were obtained and immediately processed at the company “Sabor Tropical Ltda”, in São Gonçalo do Amarante - Ceará, Brazil. After removal of the cashew nuts, the fruits were washed and sanitized. Thus, the comestible portion (cashew apple) was pressed to obtain the integral non-pulpy juice and residual fibers. The residual fibers were taken to the Processes Laboratory at EMBRAPA in Fortaleza - Brazil, for reprocessing and obtaining an aqueous extract by sequential pressing.

Carotenoid standards (98-99 % pure) used for HPLC analysis were purchased from Extrasynthese (Genay, France) ( $\beta$ -carotene,  $\alpha + \beta$ -carotene mixture, zeaxanthin and lutein) and from Carot Nature GmbH for mutatoxanthin and 13-*cis*-  $\beta$ -carotene (Lupsingen, Switzerland).

## 2.2. Obtaining of aqueous extract by pressing process

To obtain the aqueous extract (that is in fact a carotenoid suspension) the mass of cashew fibers was mixed with water (1:1 w/w), its temperature and the material was homogenized. The mixture was then pressed in a continuous helical-type press, Model INCOMAP-300, with a nominal capacity of 300 kg/h for juice production. The press was set for a force applied on the plate out of the dough at a value of 2500 N (Abreu, 2012). The operation was repeated six cycles consecutively with the reincorporation of the extracts to the fibers as illustrated in Figure 15.



**Figure 15.** General scheme of processing of cashew apple fibers to obtain a concentrate extract enriched in carotenoids using crossflow microfiltration process.

After the six steps of pressing, a suspension with yellow color, due the presence of carotenoids, was obtained. This suspension was pre-filtered through a 0.3 mm stainless steel mesh for removing suspended of large size particles. The extract thus obtained was called

aqueous extract, or crude extract, which was packed in polyethylene/aluminum bags, frozen (-20°C) and stored for the concentration and analysis of carotenoids.

### **2.3. Obtaining of concentrate by crossflow microfiltration**

At this step, the aqueous extract obtained by pressing, was submitted to the microfiltration system equipped with tubular ceramics membranes. Microfiltration experiments were carried out using a laboratory scale equipment TIA (Techniques Industrielles Appliquées, Bollène, France), with a set of 4 monotubular alumina membranes MEMBRALOX (Pall-Exekia, Bazet, France), with filtration area of 0.022 m<sup>2</sup> and average pore diameter of 0.2 µm. The transmembrane pressure was 2.75 bar, with temperature controlled at 40 °C (± 2 °C) for all trials. The process was always conducted using concentration mode up to a volumetric reduction ratio (VRR, Eq. 1) of 13. The carotenoid fraction was concentrated in the retentate phase.

$$VRR = \frac{V_f}{V_r} \quad \text{Eq. 7}$$

with  $V_f$  and  $V_r$  the volumes of the feed and the retentate respectively.

The carotenoid analysis was made on the fresh cashew apple (1), in the fiber aqueous extract after the six steps of pressing (2) and after the concentration step (3), as described in Figure 1. According to this scheme, we obtained about 15,5 kg of concentrated extract from 100 kg of residual fibers.

### **2.4. HPLC Analysis of carotenoids**

#### *Extraction and saponification*

Carotenoid extraction was carried out according to our previous study (Dhuique-Mayer, et al., 2007). An aliquot of 20 g for fresh fruit and aqueous extract (or 10g for concentrate) was homogenized by magnetic stirrer with 120 mg MgCO<sub>3</sub> and 35 mL of extraction solvent (ethanol/hexane, 4/3 v/v containing 0.1 % of BHT as antioxidant) for 5 min. The residue was separated from the liquid phase by filtration with a filter funnel (porosity n°2) and re-extracted with 35 mL of ethanol/hexane as previously. Ethanol (30 mL) and hexane (30 mL) were successively used to wash the residue. Organic phases were transferred to a separatory funnel and washed with 2 x 50 mL of 10 % sodium chloride and 3 x 50 mL of distilled water. The aqueous layer was removed. The hexanic extract was evaporated to

dryness with a rotary evaporator at 37°C and redissolved with 20 mL of hexane, and placed in a 50 mL amber vial to which were added 20 mL of 10 % methanolic KOH. Overnight saponification at room temperature was necessary to hydrolyze the carotenoid esters. The methanolic KOH layer was extracted with 3 x 15 mL of dichloromethane and washed with water to remove alkali. Then, carotenoid extracts were dissolved in 1 mL of 50/40/10 (v/v/v) mixture of dichloromethane, MTBE (methyltertbutyl-ether) and methanol, and injected in HPLC after filtration (0.45µm).

#### *Analysis of carotenoids*

An Agilent 1100 liquid chromatograph (Massy, France) equipped with a photodiode array detector was used. The separation was carried out with a C<sub>30</sub> column (250 x 4.6 mm i.d., 5 µm YMC (EUROP GmbH, Germany). The mobile phase consisted in H<sub>2</sub>O as eluent A, methanol as eluent B, and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL.min<sup>-1</sup>, column temperature was set at 25 °C, and injection volume was 20 µL. A gradient program was performed, and the conditions were: 0-5 min (40% A and 60% B); 5-10 min (20% A and 80% B); 10-60 min (4% A, 81% B and 15% C); 60-71 min (4% A, 11% B and 85% C); 71-72 min (100% B), and back to the initial condition for equilibration. The carotenoids were analyzed quantitatively by use of external calibration with β-carotene, β-cryptoxanthin and lutein. The calibration curves were constructed with five concentration levels, each in triplicate. Correlation coefficients ranged from 0.994 to 0.998.

#### **2.5. HPLC-Diode array Detection (DAD) –MS -Identification of carotenoids**

HPLC analyses were carried out with a Finnigan Surveyor plus model equipped of an autosampler, a PDA detector and quaternary pump solvent delivery (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA). Carotenoids were extracted as previously described above. Carotenoids were separated along a C<sub>30</sub> column (250 × 4.6 mm, 5 µm particle size), YMC (EUROP, GmbH). The mobile phases were water/20 mM ammonium acetate as eluent A/20 mM, ammonium acetate, methanol/20 mM, ammonium acetate as eluent B and MTBE as eluent C. Flow rate was fixed at 1 mL/min and the column temperature was set at 25 °C. A gradient program was performed: 0–2 min (40% A and 60% B, isocratic elution); 2–5 min (20% A and 80% B); 5–10 min (4% A, 81% B and 15% C); 10–60 min (4% A, 11% B and 85% C); 60–71 min (100% B); 71–72 min, back to the initial conditions for equilibration. The injection volume was 10 µl and the detection was monitored from 250 to 600 nm. After passing through the flow cell of the diode array

detector the column eluate was split and 0.5 mL was directed to the ion trap of a LCQ mass spectrometer fitted with an electrospray interface (Thermo Finnigan, San Jose, California, USA). Experiments were performed in positive ion mode. Scan range was 100–1000, scan rate: 1 scan/s. The desolvation temperature was set at 250°C. The ionization source parameters were set as followed: dry temperature 300 °C, source current 80 uA, nebuliser pressure 20 psi, dry gas flow 10 L min<sup>-1</sup>, capillary voltage -5.0 kV.

### ***2.6 Statistical analysis***

Results are expressed as mean values with their standard deviation from at least three independent experiments. Statistical significance was determined using a one-way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Fisher's tests for multiple comparisons using XLStat software. Differences with P<0.05 were considered significant.

## **3. Results and discussions**

### **3.1. Identification and quantification of carotenoids in cashew apple CCP-076**

Carotenoids from native cashew apple from the specific clone CCP-076 were first identified by comparing their spectral data and mass to the values of literature (Britton, 2004). The spectral and mass data obtained by HPLC-DAD-MS detection are summarized in table 7.

Table 7. Chromatographic and spectral data obtained by HPLC-DAD-MS detection of the carotenoids in cashew apple CCP-076.

Retention time (min)	Peaks letters	Carotenoid	[M+H] <sup>+</sup> m/z	$\lambda_{max}$ (nm)*	%III/II %A <sub>B/II</sub>	% carotenoid	Carotenoid $\mu\text{g/g}^{**}$
16.96	a	<i>cis</i> -neoxanthin	601	328- <u>416-438</u> - 468	71 30	22	1.36 <sup>b</sup>
18.10	b	neochrome	601	400- <u>422</u> -448	90	10.6	0.69 <sup>d</sup>
19.67	c	<i>cis</i> -violaxanthin	601	328-412- <u>436</u> - 464	84 10	28.3	1.80 <sup>a</sup>
21.08	d	lutein	569	420- <u>444</u> -472	47	15.3	0.93 <sup>c</sup>
22.60	e	zeaxanthin	569	422- <u>448</u> -473	19	7.1	0.46 <sup>e</sup>
23.80	f	<i>cis</i> - antheraxanthin	585	328-416- <u>442</u> - 466	53 5	4.2	0.26 <sup>f</sup>
26.12	g	zeinoxanthin	553	416- <u>440</u> -468	42	1.6	0.10 <sup>g</sup>
28.36	h	$\beta$ -cryptoxanthin	553	430- <u>450</u> -480	20	4.8	0.30 <sup>f</sup>
31.49	i	13- <i>cis</i> - $\beta$ - carotene	-	336- <u>446</u> -466	11 34	0.7	0.04 <sup>h</sup>
32.56	j	$\alpha$ -carotene	-	422- <u>444</u> -472	34	1.3	0.08 <sup>gh</sup>
35.05	k	$\beta$ -carotene	-	<u>450</u> -478	12	4.5	0.28 <sup>f</sup>

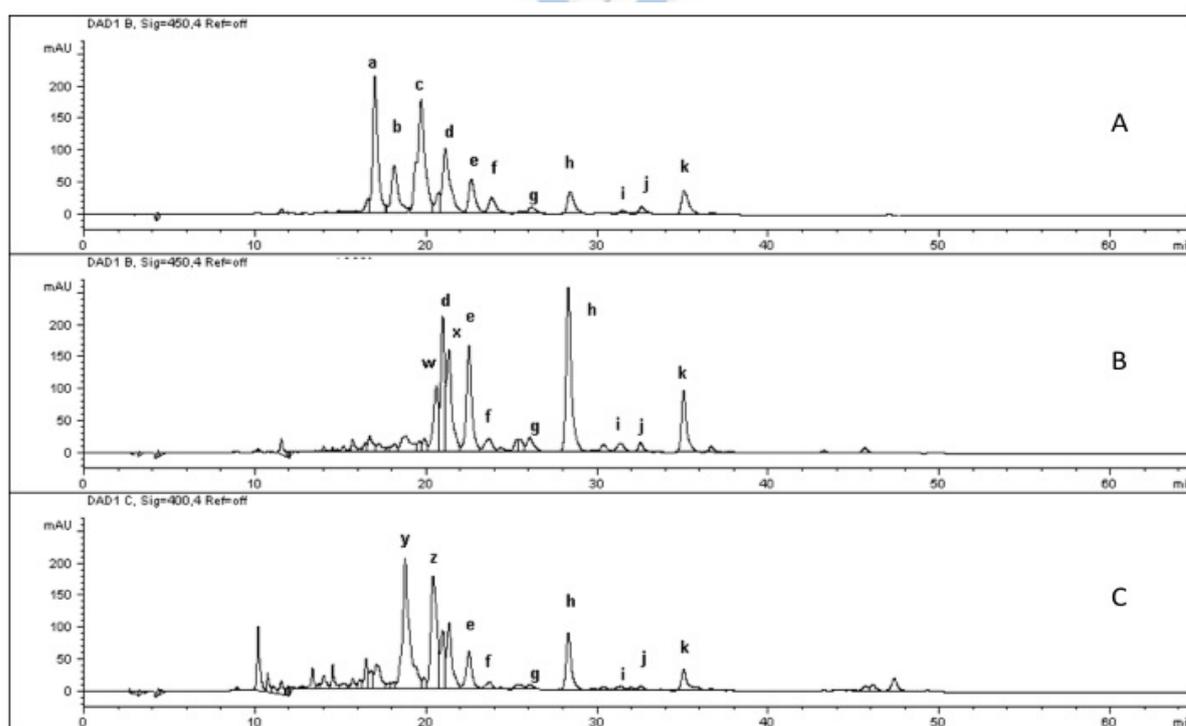
\* Main wavelength of maximum absorption are underlined. \*\* Data were mean of three independent determinations (standard deviation) Significant differences (P<0.05) are represented by different letters.

Among the following compounds identified (*cis*-neoxanthin, neochrome, *cis*-violaxanthin, lutein, zeaxanthin, *cis*-antheraxanthin, zeinoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene), *cis*-violaxanthin is the major carotenoid (28.3% of total carotenoids) followed by *cis*-neoxanthin (22%), lutein (15.3%) and neochrome (10.6%). Zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -carotene, *cis*-antheraxanthin ranged from 7 to 4%. Zeinoxanthin,  $\alpha$ -carotene, and 13-*cis*- $\beta$ -carotene represented minor compounds. These results were different from those reported by Assunção and Mercadante (2003a and b). In this study, these authors evaluated the effects of variety and geographic location of cashew apple, and identified  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin as major carotenoids. However, cultivar of their red cashew-apple from Northeast region was not identified and was probably different from clone CCP-076 from EMBRAPA. It is known that the carotenoid composition of fruits and vegetables is affected

by factors such as cultivar or variety stage of maturity; climate or geographic site of production; harvesting and postharvest handling; processing and storage (Rodriguez-Amaya, 2001). Total carotenoid content is 6  $\mu\text{g/g}$  in our study (table 7) and around 2  $\mu\text{g/g}$  in literature (Assunção and Mercadante 2003a and b). These values are lower compared to other tropical fruits such as papaya or mango (around 44-46  $\mu\text{g/g}$  or 18-25  $\mu\text{g/g}$  respectively) (Gancel, *et al.*, 2008). However, this raw material could be an interesting source of carotenoids subject to concentrate the product as suggested in this study.

### 3.2. Identification and quantification of carotenoids in cashew apple crude extract

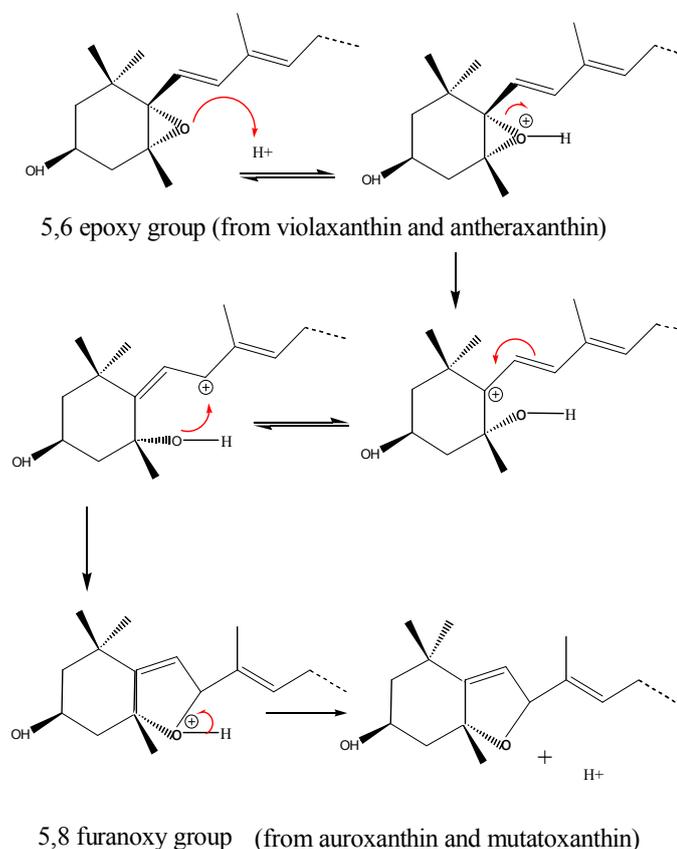
The HPLC chromatograms of saponified carotenoid from fresh cashew apple (Fig 2A) and the fiber aqueous extract (Fig. 16B) showed significant qualitative and quantitative differences. Note that in the non-saponified aqueous extract, esters of xanthophylls represent around 89 % of total carotenoids.



**Figure 16.** HPLC chromatograms of fresh cashew apple CCP-076 (A); cashew apple aqueous extract at 450 nm(B) and (C) cashew apple aqueous extract at 400 nm.

a : *cis*-neoxanthin; b : neochrome, c: *cis*-violaxanthin; d: lutein; e: zeaxanthin; f: *cis*-antheraxanthin; g: zeinoxanthin; h:  $\beta$ -cryptoxanthin; i: 13-*cis*- $\beta$ -carotene; j:  $\alpha$ -carotene, k:  $\beta$ -carotene; w: mutatoxanthin (*trans*); x: mutatoxanthin (*cis*), y: auroxanthin (*cis* or *trans*), z: auroxanthin (*cis* or *trans*).

The spectral chromatographic, and mass data obtained by HPLC-DAD-MS detection are summarized in table 2 and illustrated by figure 16B and 16C showing the chromatograms of carotenoids absorbing at 450 nm and 400 nm, Auroxanthin was the major carotenoid absorbing at 400 nm (Fig. 16 C).



**Figure 17.** Mechanism of epoxy-furanoxy rearrangement (according to Britton, 1995).

This xanthophyll with two 5,8-furanoxy groups is probably issued from *cis*-violaxanthin through epoxy-furanoxy rearrangements (Figure 17). This hypothesis is supported by the presence of *cis*-violaxanthin as the major carotenoid in the native juice of cashew apple CCP-076 (Table 7) whereas it is absent from the cashew apple fiber aqueous extract. At 450 nm mutatoxanthin was identified using a commercial standard and mass data. Dhuique-Mayer et al., (2007) related its presence in heated citrus juice and Zepka and Mercadante (2009) identified mutatoxanthin in a simulated cashew apple juice which has been submitted to a heat treatment. The mutatoxanthin, found only in the cashew apple extract, could derive from *cis*-antheraxanthin through an isomerization of the 5,6 epoxy groups into the 5,8 furanoxy groups (Figure 17). Acidic conditions of the medium (pH <4 of cashew-apple or citrus juices) and heating could have promoted these reactions (Philip, Chen, & Nelson, 1988; Rodriguez-Amaya, 2001; Dhuique-Mayer *et al.*, 2007).

Globally, the major carotenoids (> 10 %) of the aqueous extract were lutein, auroxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin (Table 8).

Table 8. Chromatographic and spectral data obtained by HPLC-DAD-MS detection of the carotenoids in cashew apple aqueous extract.

Retention time (min)	Peaks letters	Carotenoid*	[M+H] <sup>+</sup> m/z	<u><math>\lambda_{max}</math></u> (nm)	%A <sub>B/II</sub>	%III/II
10.14		Not identified		<u>322-</u> 388		
18.75	y	auroxanthin ( <i>cis or trans</i> )	601	380- <u>402-</u> 426		97
20.38	z	auroxanthin ( <i>cis or trans</i> )	601	380- <u>402-</u> 426		99
20.56	w	mutatoxanthin ( <i>trans</i> )	585	404- <u>426-</u> 452		56
20.93	d	lutein	569	420- <u>444-</u> 472		53
21.30	x	mutatoxanthin ?( <i>cis</i> )	585	406- <u>428-</u> 452		42
22.47	e	zeaxanthin	569	422- <u>448-</u> 473		25
24.02	f	<i>cis</i> -antheraxanthin	585	330- 416- <u>441-</u> 468	5	52
28.29	h	$\beta$ -cryptoxanthin	553	426- <u>450-</u> 476		20
31.35	i	13- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	537	338- 422- <u>444-</u> 468	34	
32.51	j	$\alpha$ -carotene	537	424- <u>444-</u> 472		
35.03	k	$\beta$ -carotene	537	428- <u>450-</u> 476		12

\* Tentative identification; peaks: y, z detected at 400 nm; other peaks detected at 450 nm; Main wavelength of maximum absorption are underlined

Excepted auroxanthin and mutatoxanthin, all xanthophylls (lutein, zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin and *cis*-antheraxanthin) and  $\beta$ -carotene isomers identified in the aqueous extract were already present in the fruit of cashew-apple.

Assunção and Mercadante, (2003a and b) have also identified these carotenoids in different proportions for the cashew apple from other varieties and origins. Note that in cashew-apple non-saponified extract auroxanthin esters were dominant and represented 40 % of total

xanthophyll esters followed by  $\beta$ -cryptoxanthin esters (17%) (table 3). It is important to note that the two allenic carotenoids neoxanthin and neochrome found in cashew apple fruit were not detected any more in the aqueous extract

Zepka and Mercadante (2009) also observed the presence of these two carotenoids in unheated juice and their disappearance in heated juice from cashew apple. They might have been degraded during the process of extraction maybe due to the presence of oxygen. No degradation products of these carotenoids have been clearly identified in the aqueous extract, indicating that they might be polar enough to stay in the aqueous phase during the extraction. A non identified peak was detected at 10.14 min at 400 nm, its UV/Vis spectra does not have the characteristic fine structure of a carotenoid, we hypothesize that it could be a lipophilic catabolite of neoxanthin or neochrome but this could not be confirm.

### **3.3. Comparison of carotenoids profiles from the crude aqueous extract and the concentrate**

There was no qualitative variation in the carotenoid composition of the concentrate compared to the aqueous extract. Quantitatively, the total carotenoid content increased from 10 to 54  $\mu\text{g/g}$  (Table 9), thus a medium value of 5.4 was obtained as the concentration factor for carotenoids. The crude extract was concentrated by crossflow microfiltration up to a VRR of 13 and this value was higher than the average concentration factor. This result could be possibly explained by losses of carotenoids through the membrane or losses during the crossflow microfiltration process. About the yield, only 42 % of the total carotenoids were recovered in the concentrate with aqueous extract.

Table 9: Content and percentage of major carotenoids ( $\mu\text{g/g}$ ) from cashew apple extracts and concentrate

Carotenoids	Peak letter	Retention time	Aqueous Extract ( $\mu\text{g/g}$ )*	% carotenoid	% Ester forms <sup>3</sup>	Concentrate ( $\mu\text{g/g}$ )*	Concentration factor
Auroxanthin ( <i>cis</i> or <i>trans</i> ) <sup>1</sup>	y	18.75	1.8 (0.2) <sup>a</sup>	18	22	14.3 (0.6) <sup>d</sup>	7.9
Auroxanthin ( <i>cis</i> or <i>trans</i> ) <sup>1</sup>	z	20.38	1.3 (0.1) <sup>c</sup>	13	18.1	8.2 (0.2) <sup>b</sup>	6.4
Mutatoxanthin <i>trans</i>	w	20.56	1.05 (0.05) <sup>d</sup>	10.5	6.8	2.5 (0.1) <sup>f</sup>	4.1
Lutein	d	20.93	1.04 (0.1) <sup>d</sup>	10.4	12	4.7 (0.4) <sup>e</sup>	4.6
Mutatoxanthin <i>cis</i> ?	x	21.30	1.2 (0.04) <sup>c</sup>	12	11	6.3 (0.4) <sup>c</sup>	5
Zeaxanthin	e	22.47	1.1 (0.08) <sup>d</sup>	11	11.1	5.6 (0.4) <sup>d</sup>	5.1
<i>Cis</i> antheraxanthin	f	24.02	0.2 (0.02) <sup>f</sup>	2	2	0.8 (0.07) <sup>g</sup>	4.1
$\beta$ -Cryptoxanthin	h	28.29	1.5 (0.1) <sup>b</sup>	15	17	8 (0.7) <sup>b</sup>	5.3
13- <i>cis</i> - $\beta$ -carotene	i	31.35	0.09 (0.01) <sup>g</sup>	1.3	-	0.7 (0.1) <sup>g</sup>	5.6
$\alpha$ -Carotene	j	32.51	0.1 (0.01) <sup>g</sup>	0.9	-	0.6 (0.06) <sup>g</sup>	7.1
$\beta$ -carotene	k	35.03	0.5 (0.05) <sup>e</sup>	5.2	-	2.5 (0.2) <sup>f</sup>	4.7
Total carotenoids <sup>2</sup>			10	100		54.2	5

<sup>1</sup>Peaks at 400nm, other Peaks at 450nm <sup>2</sup>Total carotenoids. <sup>3</sup>Ester form (%): xanthophylls ester/total esters. \*Data were mean of three independent determinations (standard deviation) Significant differences ( $P < 0.05$ ) are represented by different letters for each column.

The main interest of these processing products was the high xanthophylls content (auroxanthin, mutatoxanthin, cryptoxanthin) that usually gives an intense yellow color interesting as functional properties. Among xanthophylls some of them were also interesting for health ( $\beta$ -cryptoxanthin, lutein or zeaxanthin). On a nutritional point of view these carotenoids were of interest in the concentrate: lutein, zeaxanthin for the protection of the eye but also  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin as provitamin A carotenoids (Rao & Rao 2007). The  $\beta$ -cryptoxanthin content of the concentrate analysed was comparable to the one in a fresh citrus juice such as Clementine (Dhuique-Mayer, Caris-Veyrat, Ollitrault, Curk & Amiot 2005). Carotenoid profiles were similar for the aqueous extract and the concentrate indicating that no carotenoid degradation occurred during the step of concentration. The heat treatments (35 to 55°C) did not seem to damage carotenoids whereas pressing steps used to produce the aqueous extract generated carotenoid degradation. The concentrate obtained from the residual fibers of cashew juice processing was characterized by an intense yellow color due to carotenoid content (54  $\mu\text{g/g}$ ) which confers to the product an interesting potential as natural yellow food coloring agent. Previous studies describe the feasibility of using by-products as source of carotenoid for food fortification and/or dietary supplements and food colorant. According, Montesano, Gennari, Seccia & Albrizio (2012), lutein levels from tomato waste product after extraction ranged from 9.9 to 10.5  $\mu\text{g/g}$  dry weight. Other authors obtained 98  $\mu\text{g/g}$  of betacarotene

from dry apricot pomace (Sanal, Bayraktar, Mehmetoglu & Calimli, 2005). In our study, the final concentrate (54 µg/g) represent 225 µg/g of carotenoid expressed in dry matter. On the other hand, Stoll, Schweiggert, Schieber, & Carle, (2003) described a process for the recovery of a carotene-rich functional food ingredient from carrot pomace and obtained a final concentrate with a content of carotenoid around 64 mg/kg and they reported that their product was indicated further applications as food colorant. The carotenoid content of our final product was in the same range.

#### **4. Conclusion**

Carotenoids from cashew apple by-product represented an interesting source of xanthophylls. Auroxanthin, and β-cryptoxanthin were the main carotenoids and were together responsible of the bright yellow color of the extract and the concentrate. The profile of carotenoids in the aqueous extract was different from the profile of the fresh cashew apple. This may be explained by the release of acids from fruits during the process and also the presence of oxygen during the extraction and maceration phases. However, the profile of carotenoids in the extract and the concentrate were similar, meanwhile the carotenoids' content increased from 10 to 54 µg/g in the concentrate. The concentrate obtained after sequential pressing and concentration steps may be considered as an innovative and interesting product combining nutritionally important carotenoids which could make it usable as a food supplement. The concentrate could also present a high potential as natural food colorant and could bring added value to cashew apple juice processing industry.

#### **5. Acknowledgements**

The authors acknowledge the support received from Project PAVUC - Producing Added Value form under-utilized Tropical Fruits, EMBRAPA (AGROFUTURO PROGRAM) and CIRAD PERSYST for financial and logistical support to conduct this work. The authors also thank Gilles Morel for his technical help in mass-spectrometry use and Doudjo Soro for his assistance in the pilot trials.

**References:**

- Abreu, F.A.P. (2001). Extrato de bagaço de caju rico em pigmentos. Patent PI 0103885-0. 06/19/2001.
- Abreu, F.A.P., Perez, A.M., Dornier, M., & Reynes, M. (2005). Potentialités de la microfiltration tangentielle sur membranes minérales pour la clarification du jus de pomme de cajou. *Fruits*, 60, 33-40.
- Assunção, R.B., & Mercadante, A.Z. (2003a). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 647-657.
- Assunção R.B., & Mercadante, A.Z. (2003b). Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) variety and geographic effects. *Food Chemistry*, 81, 495-502.
- Azeredo, H.M.C., Abreu, F.A.P., Sousa, L.L., Souza, A.C.R., & Brito, E.S. (2006). Avaliação do impacto de pré-tratamentos sobre a extração de carotenóides por prensagem seqüencial de bagaço de caju. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 24, 397- 404.
- Brito, E.S., Araújo, M.P., Lin, L.Z., & Harn, Y.J. (2007). Determination of the flavonoid components of cashew Apple (*Anacardium occidentale, L.*) by LC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 105, 1112 – 1118.
- Britton, G. (1995). Isolation and Analysis. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen & Pfander, H. (Eds), *Carotenoids* (p. 77). Basel (CH): Birkhäuser.
- Cecchi, H.M., & Rodriguez-Amaya, D.B. (1981). Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale L.*) juice. *Journal of Food Science*, 46, 147–149.
- Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., & Amiot, M.J. (2005). Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2140-2145.
- Dhuique-Mayer, C., Tbatou, M., Carail, M., Caris-Veyrat, C., Dornier, M. & Amiot, M.J. (2007). Thermal degradation of antioxidant Micronutrient in citrus juice: kinetic and newly formed compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4209-4216.
- Embrapa (1999). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Revista Guia da Terra*, 3, 17.
- FAO. (2009) FAOSTAT Statistical Databases for agriculture <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>. Accessed in 27/09/2011.

- Fontes, C.P.M.L., Honorato, T.L., Rabelo, M.C., & Rodrigues, S. (2009). Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 32, 493–499.
- Gancel, A.L., Alter, P., Dhuique-Mayer, C., Ruales Najera, J. & Vaillant, F. (2008). Identifying Carotenoids and Phenolic Compounds In Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo hybrid), a Biodiverse Andean Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11890-11899
- Kubo, I., Ochi, M., Vieira, P.C., & Komatsu, S. (1993) Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1012–1015.
- Landrum, J.T., & Boneb, R.A. (2001). Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 28-40.
- Lautié, E., Dornier, M., de Souza Filhos, M., & Reynes, M.(2001). Les produits de l'anacardier : caractéristiques, voies de valorisation et marchés. *Fruits*, 56, 235-248.
- Leite, L.A S., & Paula-Pessoa, P.F.A. (2002). Aspectos sócioeconômicos. In L.M. Barros (Ed.), *Caju: produção, aspectos técnicos* (pp. 15-17). Brasília: Embrapa Agroindústria Tropical, Informação Tecnológica.
- Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Branley, P.M., & Rice-Evans, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 240-246.
- Montesano, D., Gennari, O., Seccia, S., & Albrizio, S. (2012). A Simple and Selective Analytical Procedure for the Extraction and Quantification of Lutein from Tomato By-Products by HPLC-DAD. *Food of Analytical Method*, 5, 710-715.
- Paiva, J.R., & Barros, L.M. (2004). Clones de cajueiro: obtenção, características e perspectivas. Fortaleza (Brazil): Embrapa Agroindústria Tropical.
- Philip, T., Chen, T.S., & Nelson, D. (1988). Liquid chromatography profiles of major carotenoid esters in commercially processed California navel and orange juice concentrates. *Journal of Chromatography*, 442, 249-265.
- Ramel, F., Birtic, S., Cuiiné, S., Triantaphylidés, Ravana, J.L., & Havaux, M. (2012). Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. *Plant Physiology Preview*, DOI/101104/pp.111.182394.
- Rao, A. V. & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research of the Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 55, 207-16.
- Rodriguez-Amaya, D.B. (2001). A guide to carotenoids analysis in foods. Washington: Omni research.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Kimura. M., & Amaya-Farfan, J. (2009). Fontes Brasileiras de Carotenóides. Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos. Brasília: Ministério do Meio Ambiente.

Sanal, I. S., Bayraktar, E., Mehmetoglu, U. U., & Calimli, A. (2005) Determination of optimum conditions for SC-(CO<sub>2</sub> plus ethanol) extraction of beta-carotene from apricot pomace using response surface methodology. *Journal of Supercritical Fluid*, 34, 331-338.

Silva Neto, R.M. (2003). *Cajuína: como produzir com qualidade*. Teresina: Sebrae.

Stoll, T., Schweiggert, U., Schieber, A., & Carle, C. (2003) Process for the recovery of a carotene-rich functional food ingredient from carrot pomace by enzymatic liquefaction. *Innovative Food science and Emerging Technologies*, 4, 415-423.

Zepka, L.Q., & Mercadante, A.Z. (2009). Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, 117, 28-34.

#### **4.2. Optimisation de l'opération d'extraction par pressage couplée à une macération enzymatique**

Ce chapitre aborde l'étude de l'optimisation de l'extraction des caroténoïdes. Le travail est réalisé en deux étapes successives. La première étape consiste à sélectionner les facteurs les plus influents sur les résultats en utilisant un plan d'expériences de criblage (Plan factoriel de Placket-Burman – Matrice de Hadamard). La seconde étape consiste à optimiser les facteurs les plus influents à l'aide d'un plan d'expériences rotatable central composite (PECC). Pour construire la Matrice de Hadamard, l'ensemble des facteurs qui peuvent modifier les performances industrielles du procédé a été considéré. Les critères d'évaluation utilisés sont d'une part, les teneurs en caroténoïdes majoritaires, et d'autre part, la densité de flux de perméat de microfiltration, étape qui suit immédiatement l'extraction. Cette démarche d'optimisation qui couple 2 opérations unitaires successives nous semble en effet plus pertinente car les conditions d'extraction sont susceptibles de modifier le pouvoir colmatant de l'extrait.

##### **4.2.1. Criblage des facteurs les plus influents**

Le criblage des facteurs, qui peuvent interférer entre eux, a été choisi comme étape préliminaire pour sélectionner ceux qui sont les plus influents dans le domaine expérimental exploré. Pour le réaliser, nous avons utilisé comme outil statistique une matrice de Hadamard associée à un traitement par régression linéaire. Cette étude a été conduite au niveau des 7 facteurs identifiés susceptibles d'influencer les performances générales du procédé : la force appliquée, la vitesse de rotation de la vis, le ratio eau/tourteaux, le temps, la température de macération, l'utilisation de pectinase et d'amylase. L'effet de chacun de ces facteurs a été évalué à la fois sur les teneurs en caroténoïdes de l'extrait et sur les densités de flux de microfiltration obtenus, opération unitaire qui suit immédiatement l'extraction. En ce qui concerne les caroténoïdes, nous avons choisi les 4 composés les mieux quantifiables par chromatographie : le  $\beta$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine détectés à 450 nm, 2 composés époxydés détectés à 400 nm et identifiés comme étant la *cis*- et la *trans*-auroxanthine. Les densités de flux de perméat sont, quant à elles, mesurées à 4 pressions transmembranaires comprises entre 1,25 et 2,75 bar.

Les différents résultats expérimentaux obtenus sont présentés dans le Tableau 10. Globalement, on peut noter que l'ensemble des critères d'évaluation choisis est affecté par

les facteurs. Néanmoins, les variations relatives des teneurs en caroténoïdes sont nettement plus marquées que celles des densités de flux.

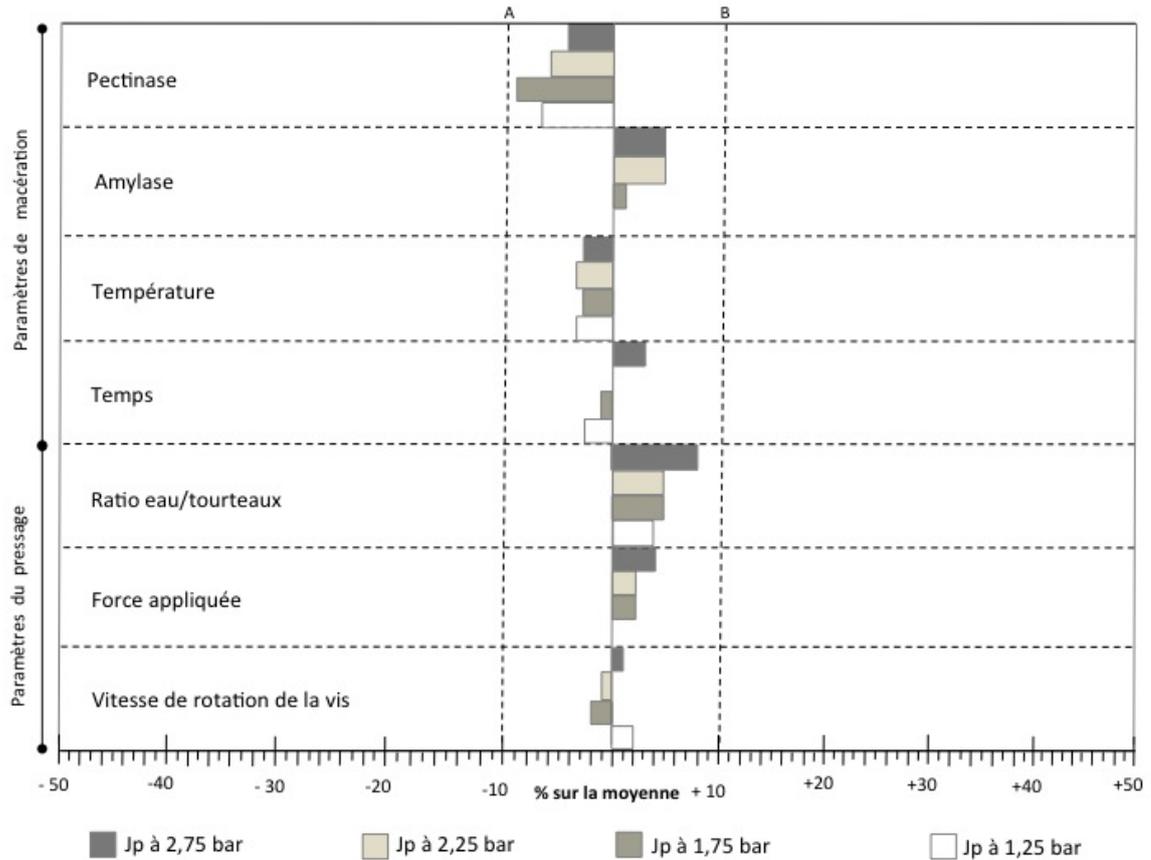
**Tableau 10 :** Résultats expérimentaux obtenus à partir de la Matrice de Hadamard pour le criblage des facteurs  
(cf. tableau 5 pour les conditions opératoires correspondant à chaque essai).

ESSAI	Densité du flux de perméat ( $L.h^{-1}.m^{-2}$ )				Caroténoïdes ( $mg.kg^{-1}$ )				
	2,75 bar	2,25 bar	1,75 bar	1,25 bar	$\beta$ -carotène	$\beta$ -cryptoxanthine	Auroxanthine *	Auroxanthine *	Somme Carot
E <sub>1</sub>	272,0	261,0	196,8	165,8	0,11	0,129	0,118	0,091	0,615
E <sub>2</sub>	207,3	196,4	152,7	130,9	0,25	0,276	0,686	0,55	2,194
E <sub>3</sub>	229,1	220,9	152,8	150,0	0,15	0,179	0,332	0,277	1,246
E <sub>4</sub>	270,0	261,8	185,5	169,9	0,28	0,336	0,828	0,606	2,448
E <sub>5</sub>	242,7	242,7	182,7	171,8	0,15	0,179	0,515	0,391	1,305
E <sub>6</sub>	283,6	261,8	204,5	185,5	0,12	0,175	0,159	0,134	0,877
E <sub>7</sub>	215,5	207,3	160,9	157,7	0,2	0,238	0,502	0,467	1,893
E <sub>8</sub>	204,5	229,1	190,9	177,3	0,09	0,107	0,083	0,077	0,603
<b>Minimum</b>	204,5	235,1	152,7	130,9	0,09	0,11	0,08	0,08	0,615
<b>Maximum</b>	283,6	261,8	204,5	185,5	0,28	0,34	0,83	0,61	2,45
<b>Moyenne</b>	<b>240,6</b>	<b>235,1</b>	<b>178,3</b>	<b>163,5</b>	<b>0,2</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>	<b>1,4</b>

Rq.: \* auroxanthine CIS ou TRANS

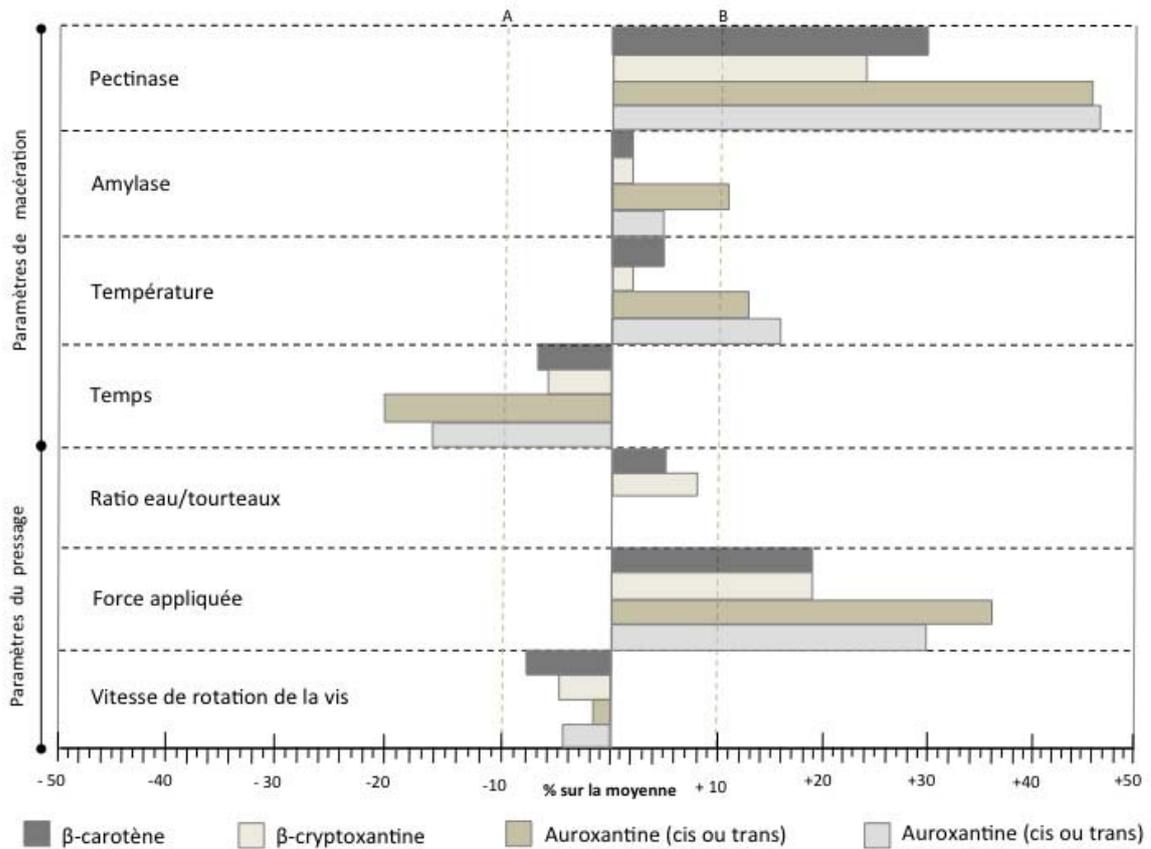
Le traitement des données par régression linéaire entre les niveaux -1 et +1, permet d'évaluer l'impact des facteurs sur les résultats. Afin de faciliter les comparaisons, les effets sont exprimés en valeur relative par rapport à la moyenne de chacun des critères considérés. Pour qu'un effet soit significatif, nous posons qu'il doit être supérieur à l'erreur expérimentale relative (répétabilité). Cette erreur expérimentale est évaluée à 10% environ aussi bien pour les teneurs en caroténoïdes que pour les densités de flux de perméat.

Les Figures 18 et 19 présentent de façon synthétique les effets calculés sur l'aspect de la performance de la microfiltration et sur la teneur en caroténoïdes particularisé pour chacune des molécules étudiées comme référence.



**Figure 18 :** Effets des paramètres d'extraction (macération et pressage) sur les densités de flux de perméat de microfiltration à différentes pressions transmembranaires. Résultats obtenus suite à l'utilisation de la Matrice de Hadamard.

On constate tout d'abord que, quelle que soit la pression transmembranaire, aucun facteur ne présente un effet significatif sur les densités de flux de perméat en microfiltration (effet situé dans l'intervalle A-B, calculé  $< 10\%$ ). Quelques tendances peuvent être néanmoins notées. Les facteurs les plus influents sur les flux sont 1) le ratio eau/tourteaux qui améliore les performances probablement via une diminution de la viscosité de l'extrait et 2) l'utilisation de pectinase qui a, par contre, tendance à les faire chuter. Ce dernier résultat est plus surprenant car l'effet inverse est généralement attendu. L'effet complexe des enzymes liquéfiantes sur les propriétés colmatantes des jus de fruits est toutefois encore très mal compris comme le soulignent SORO *et al.* (2012).



**Figure 19 :** Effets des paramètres d'extraction (macération et pressage) sur les teneurs en caroténoïdes de l'extrait. Résultats obtenus suite à l'utilisation de la Matrice de Hadamard.

Les effets sur la fraction caroténoïdique de l'extrait sont par contre beaucoup plus importants. Quatre facteurs présentent un effet significatif sur les teneurs en caroténoïdes : l'utilisation de pectinase, la force appliquée lors de la pression, la température et la durée de macération.

Le prétraitement avec des enzymes pectinolytiques et la force appliquée lors de l'extraction sont clairement les facteurs les plus influents. En passant du niveau bas (-1) au niveau haut (+1), ces 2 facteurs améliorent la teneur en caroténoïdes totaux de l'extrait de 39 et 22% respectivement, via une action mécanique (pression et force cisailant contre le tamis de la presse à vis) ou biochimique au niveau des parois cellulaires (hydrolyse enzymatique des composés pariétaux). Ces 2 facteurs contribuent fortement à la déstructuration cellulaire, comme l'ont indiqué AZEREDO *et al.*, (2006) ou DELGADO-VARGAS *et al.* (2000). Les composés intracellulaires, dont les caroténoïdes, deviennent alors plus accessibles suite à l'éclatement des cellules. La comparaison des différents caroténoïdes entre eux montre que

l'effet de ces 2 facteurs est plus marqué sur les auroxanthines que sur le  $\beta$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre 4.1, les auroxanthines *cis* et *trans* proviennent majoritairement de la transformation oxydative d'autres caroténoïdes selon le schéma proposé par RODRIGUEZ-AMAYA *et al.* (2009). Il est donc logique que les paramètres d'extraction, qui peuvent favoriser ces réactions en modifiant par exemple les conditions d'aération du milieu, aient un fort impact sur la teneur en auroxanthines de l'extrait.

La température et la durée de macération ont un impact significatif uniquement sur les teneurs en auroxanthines de l'extrait. Une élévation de température les augmente de l'ordre de 15%. En considérant là encore que les auroxanthines sont des produits de dérivés d'autres caroténoïdes, ce résultat est en adéquation avec les lois de cinétique chimique. Par contre, un accroissement de la durée de macération diminue les teneurs en auroxanthines d'environ 20%. Ce résultat surprenant est probablement lié à la procédure suivie lors de la macération enzymatique. Dans notre cas, la température de macération a été fixée en début de macération mais aucun système n'est utilisé pour la maintenir constante au cours du temps. Ainsi, la température du mélange en début de pressage (ou fin de macération) diminue avec la durée de la macération ce qui défavorise l'entraînement des caroténoïdes lors du pressage.

Suite à ces résultats, nous avons choisi de focaliser le travail d'optimisation uniquement sur les 2 critères les plus influents : prétraitement avec pectinase et force appliquée lors de l'extraction par pression. Afin d'obtenir une meilleure amplitude de résultats lors de l'étape suivante d'optimisation, nous avons choisi d'augmenter la dose maximale de pectinase à  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

### 4.2.2 - Optimisation des facteurs les plus influents

L'optimisation des 2 paramètres les plus influents est réalisée via un plan d'expériences central composite à deux variables indépendantes. Les conditions opératoires testées sont présentées dans le Tableau 11. Le domaine paramétrique exploré correspond à une dose de pectinase comprise entre 0 et  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  et une force appliquée de 350 à 2500 N.

Durant cette étape, les 5 autres facteurs étudiés ont été fixés. La macération a été réalisée à 55°C pendant 1 h sans amylase et le pressage est réalisé à la vitesse maximale de rotation de la vis avec un ratio eau/tourteaux de 1:1. Notons que pour le traitement sans pectinase, nous avons tout de même pré-conditionné le produit 1 h à 55°C avant pressage.

Les critères d'évaluation utilisés sont les mêmes que ceux décrits lors de l'étape de criblage : densités de flux de perméat à 4 pressions transmembranaires (1,25 ; 1,75 ; 2,25 et 2,75 bar), teneurs en  $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine, *cis* et *trans*-auroxanthine.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans le Tableau 11.

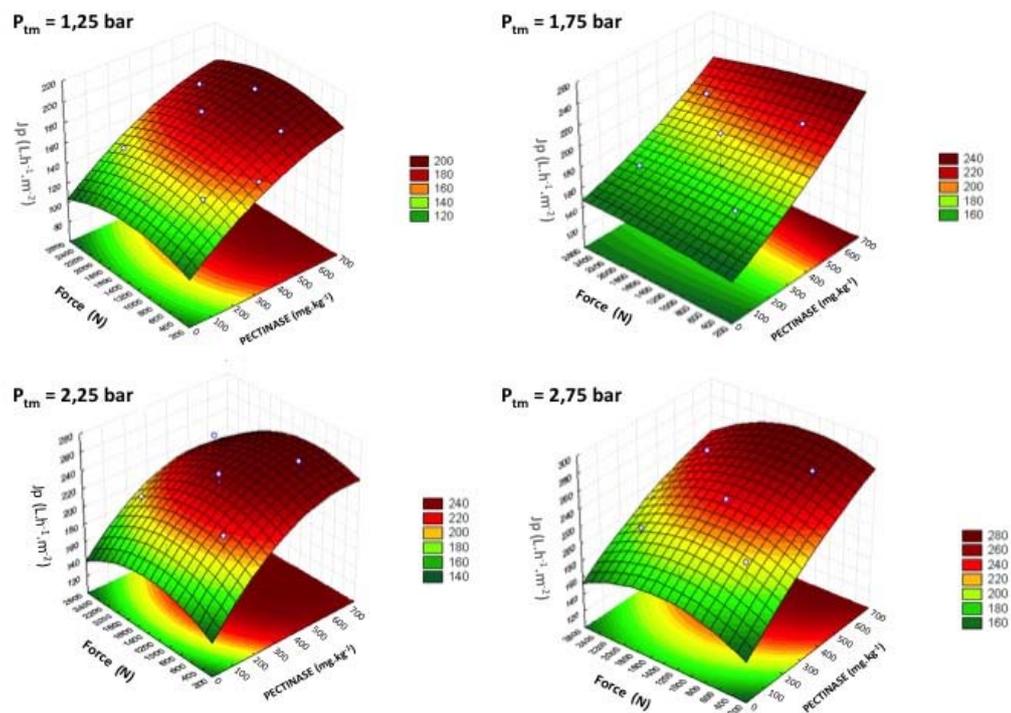
**Tableau 11 :** Densités de flux de perméat et concentrations en caroténoïdes obtenues en utilisant le plan d'expériences central composite pour l'optimisation de l'opération d'extraction par pressage à un seul cycle.

Conditions opératoires			Densité du flux de perméat à FRV = 1 (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>2</sup> )				Concentration en Caroténoïdes (mg.kg <sup>-1</sup> )			
ESSAI	Force (N)	Pectinase (mg.kg <sup>-1</sup> )	2,75 bar	2,25 bar	1,75 bar	1,25 bar	$\beta$ -carotène	$\beta$ -cryptoxanthine	Auroxanthine *	*Auroxanthine *
01	650	73	218,0	218,0	174,0	152,0	0,0961	0,2688	0,2452	0,2552
02	650	430	272,0	261,0	218,0	185,0	0,1112	0,3419	0,3091	0,3132
03	2200	73	207,0	207,0	174,0	152,0	0,0796	0,2078	0,1986	0,2007
04	2200	430	250,0	240,0	207,0	185,0	0,0724	0,2072	0,1383	0,1288
05	1400	0	185,0	174,0	141,0	130,0	0,0626	0,1677	0,1231	0,1176
06	1400	500	261,0	240,0	207,0	196,0	0,1253	0,3482	0,3358	0,3175
07	350	250	207,0	207,0	174,0	163,0	0,0769	0,2278	0,2059	0,2256
08	2500	250	207,0	196,0	163,0	152,0	0,0851	0,2461	0,2261	0,2248
09	1400	250	240,0	240,0	207,0	196,0	0,1407	0,4068	0,4126	0,4205
10	1400	250	240,0	240,0	163,0	163,0	0,1153	0,2832	0,2615	0,2588
11	1400	250	240,0	229,0	174,0	163,0	0,117	0,2789	0,1578	0,1388

Rq.: \* Auroxanthine *CIS* ou *TRANS*

Les essais réalisés avec les doses d'enzymes et les forces les plus élevées conduisent à la fois aux densités de flux de perméat et aux teneurs en caroténoïdes les plus grandes. L'essai 04 (Tableau 11) qui combine la force la plus élevée et la dose d'enzyme la plus importante est celui qui donne les meilleurs résultats. Les essais 09, 10 et 11 représentent le triplicata du point central et permettent d'évaluer la répétabilité des résultats. La répétabilité des densités de flux et de la teneur en  $\beta$ -carotène sont satisfaisantes (écarts types inférieurs ou de l'ordre de 10%). Par contre, celle des teneurs en xanthophylles est médiocre ce qui implique une certaine prudence dans l'exploitation des résultats notamment pour les 2 auroxanthines.

L'analyse des surfaces de réponses obtenues à partir des densités de flux (Figure 20) confirme que la force appliquée lors de l'extraction ne modifie pas significativement les performances de la microfiltration et ce, quelle que soit la pression transmembranaire. Ce facteur ne change donc pas le pouvoir colmatant de l'extrait. Dans notre cas, la dilacération des tissus n'intervient pas significativement sur les propriétés colmatantes de la suspension vis à vis de la membrane de microfiltration. Par contre, l'effet de la dose de pectinase mise en œuvre est plus net. En utilisant  $430 \text{ mg.kg}^{-1}$  de pectinase, les densités de flux augmentent de 8 à 17% par rapport à un traitement sans enzyme.



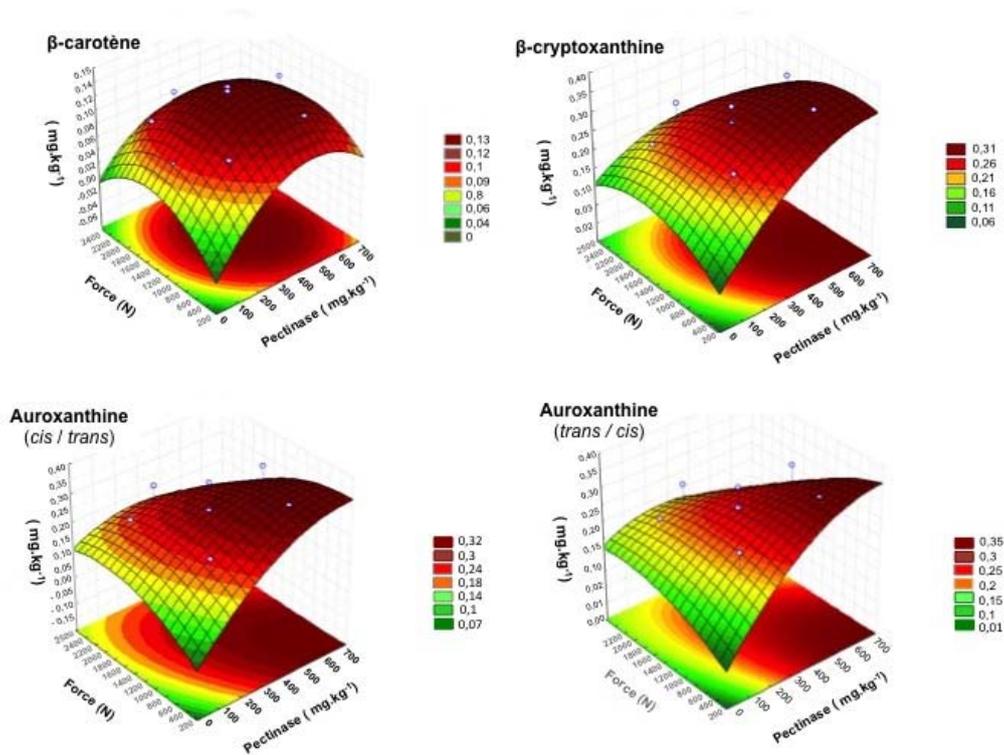
**Figure 20 :** Densité de flux de perméat obtenue à différentes pressions transmembranaires ( $P_{tm}$ ) en fonction de la dose de pectinase utilisée lors de macération et de la force appliquée lors de l'extraction.

Surfaces de réponses obtenues à partir du plan d'expériences central composite.

La gamme plus élevée de doses d'enzyme utilisées ( $0-500 \text{ mg.kg}^{-1}$  au lieu de  $0-100 \text{ mg.kg}^{-1}$  dans la phase de criblage initial) met donc en évidence un effet positif significatif de la dose de pectinase sur les flux de perméat. Ce résultat est conforme à la littérature (VAILLANT *et al.*, 2008 ; CASTRO *et al.*, 2006 ; CIANCI *et al.*, 2005 et CARNEIRO *et al.*, 2002). Il peut être expliqué par l'action liquéfiante de l'enzyme qui contribue à la fois à diminuer la viscosité de l'extrait via l'hydrolyse des pectines solubles et à modifier les caractéristiques de la fraction insoluble en suspension dans l'extrait. On remarque à ce niveau que les

densités de flux mesurées à FRV 1 sont extrêmement élevées pour un produit de ce type (ABREU *et al.*, 2005 ; CASTRO *et al.*, 2006 ; CAMPOS 2002). Des valeurs supérieures à  $250 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  sont par exemple mesurées à 2,75 bar de pression transmembranaire. Nous reviendrons plus en détails sur l'effet des conditions opératoires sur les flux dans le chapitre 4.3 sur la concentration et purification des extraits par microfiltration.

En ce qui concerne les caroténoïdes (Figure 21), la dose de pectinase présente un effet supérieur à celui de la force appliquée. Les teneurs mesurées sont globalement plus élevées aux plus fortes doses de pectinase ce qui confirme les résultats obtenus dans la phase de criblage des facteurs. L'effet positif de la dose d'enzyme est plus marqué aux faibles forces. Pour le  $\beta$ -carotène un optimum semble être mis en évidence au centre du domaine paramétrique étudié. L'effet de la force appliquée lors de l'extraction est plus nuancé car il apparait positif à faibles doses d'enzyme et négatif à fortes doses. Une interaction forte entre la dose d'enzyme et la force appliquée est donc mise en évidence. Il est toutefois difficile de l'expliquer.



**Figure 21 :** Teneurs en caroténoïdes de l'extrait en fonction de la dose de pectinase utilisée lors de macération et de la force appliquée lors de l'extraction. Surfaces de réponses obtenues à partir du plan d'expériences central composite.

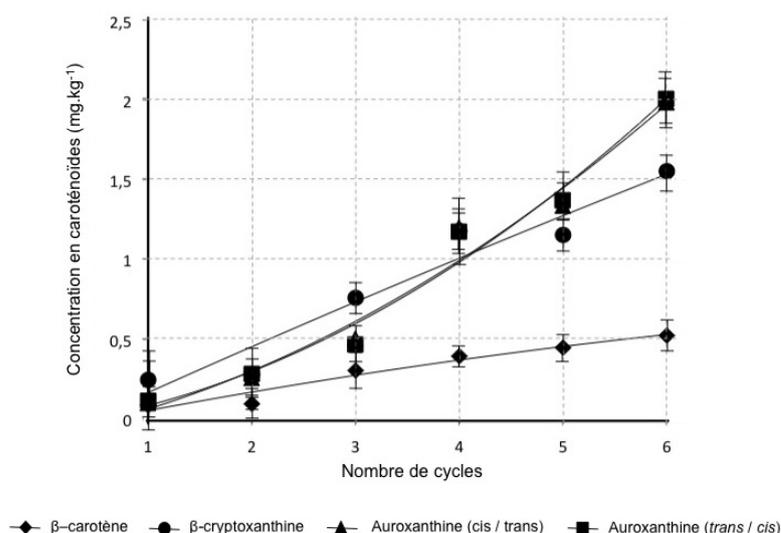
Ainsi, dans le cadre de cette étude d'optimisation de l'extraction avec un seul cycle de pressage, il est bien établi que des doses élevées de pectinase sont favorables aussi bien en terme de flux que de teneurs en caroténoïdes. La force appliquée lors de l'extraction par pression a par contre moins d'impact sur les résultats.

### 4.2.3. Étude de l'extraction à cycles de pressage successifs

L'optimisation des conditions opératoires a été réalisée à partir d'une extraction ne comportant qu'un seul cycle de pressage. D'après la littérature (ABREU, 2001 ; AZEREDO *et al.*, 2006), il semble toutefois possible d'améliorer les rendements d'extraction en utilisant plusieurs cycles de pressage successifs. Afin de valider ce résultat, nous avons choisi, au cours de ce travail, de quantifier l'effet du nombre de cycles sur les teneurs en caroténoïdes. Son impact sur les densités de flux de filtration a également été évalué.

Pour ce faire, plusieurs cycles de pressage successifs sont réalisés en réutilisant le résidu d'extraction obtenu après le cycle N-1 pour alimenter le cycle N-2 suivant, en continuant jusqu'au sixième cycle, quand la masse de fibres devient trop fluide et difficile à manipuler dans la presse INCOMAP - 300. A la fin de l'opération, l'extrait obtenu, dit extrait brut, est tamisé à 300  $\mu\text{m}$  pour obtenir des particules de même dimension pour la microfiltration. Un nombre maximal de 6 cycles a été fixé car au delà, la forte dilacération des tissus provoque une augmentation très importante de la teneur en solides insolubles dans l'extrait brut qui rend trop difficile le traitement par microfiltration.

L'évolution des teneurs en caroténoïdes de l'extrait brut en fonction du nombre de cycles de pressage N est présentée sur la Figure 22. Toutes les teneurs en caroténoïdes augmentent régulièrement avec N et ce jusqu'à N = 6. Pour le  $\beta$ -carotène et la  $\beta$ -cryptoxanthine, l'augmentation de la concentration est linéaire. Après 6 cycles consécutifs, les concentrations de ces 2 caroténoïdes sont multipliées par 6,5. Pour les 2 auroxanthines, les concentrations augmentent de façon beaucoup plus importante. L'extrait obtenu après 6 cycles de pressage en contient 19 fois plus que celui obtenu avec un seul cycle. Comme déjà mentionné il est probable que ces 2 composés soient générés dans l'extrait à partir d'autres caroténoïdes. Cette production expliquerait le facteur de concentration apparent 3 fois plus élevé pour ces 2 composés.



**Figure 22 :** Évolution des teneurs en caroténoïdes de l'extrait brut en fonction du nombre de cycles de pressage successifs utilisés pour l'extraction (sans pectinase, force appliquée 2500 N). Moyennes et écarts types sur 3 répétitions].

L'intérêt d'utiliser plusieurs cycles successifs de pressage pour l'extraction des caroténoïdes est donc clairement démontré. Bien que ces cycles génèrent des dégradations pour certains composés, cette stratégie permet d'augmenter considérablement les teneurs en caroténoïdes de l'extrait brut et plus particulièrement celles des auroxanthines *cis* et *trans*.

Cependant, la charge en particules des extraits augmente au fur et à mesure des cycles de pressage ce qui peut affecter les performances de la microfiltration. Plusieurs essais comparatifs de microfiltration ont été réalisés avec un seul cycle et 6 cycles de pressage afin d'évaluer ce point. Après 6 cycles, le flux diminue de 20 à 30% à FRV 1 et de 40 à 60% pour des FRV supérieurs à 3. Les performances de la microfiltration sont donc fortement affectées. Toutefois, les densités de flux obtenues après 6 cycles de pressage restent supérieures à 100 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> à condition qu'un traitement enzymatique adéquat soit utilisé. Ces performances restent tout à fait intéressantes d'un point de vue industriel.

Pour l'étude de la concentration et de la purification de l'extrait brut par micro et diafiltration nous avons donc choisi de travailler avec 6 cycles de pressage. Les conditions d'extraction sont fixées comme suit : macération 60 min à 55°C avec 500 mg.kg<sup>-1</sup> de pectinase et sans AMG, ratio eau/tourteaux 1:1, vitesse de rotation de la vis 30 tr.min<sup>-1</sup> et force appliquée 2500 N.

**4.3. Concentration par microfiltration et purification par diafiltration des extraits de caroténoïdes**

Ce chapitre aborde la concentration et la purification des extraits obtenus, en couplant la microfiltration et la diafiltration. A ce stade des travaux, la teneur en caroténoïdes a été déterminée par spectrophotométrie UV à 450 nm (caroténoïdes totaux). Cette méthode a été choisie pour sa simplicité et sa fiabilité pour les bilans de matière à la fin du procédé.

La concentration des extraits par microfiltration a été étudiée à différents facteurs de réduction volumique (FRV). L'étape de diafiltration est toujours réalisée à FRV maximal.

Le procédé décrit ci-après correspond à la principale innovation de la demande de brevet BR 10 2012 009761 - 2012 (document présenté en Annexe).

**4.3.1. Concentration par microfiltration**

**4.3.1.1. Étude de l'impact des conditions opératoires à FRV 1**

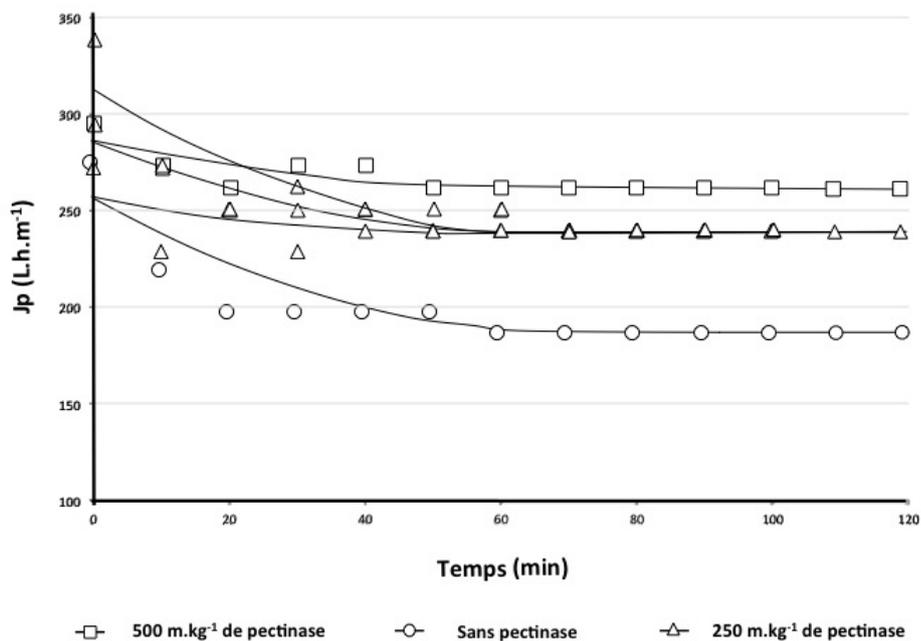
Une première analyse des résultats de microfiltration est tout d'abord proposée à partir d'essais réalisés à FRV 1 sur des extraits obtenus à la suite d'un seul cycle de pressage (cf. plan central composite présenté dans le chapitre extraction).

La répétabilité des cinétiques de filtration a pu tout d'abord être évaluée à partir du point central du PECC (Figure 23). Bien que des variations plus importantes soient notées en début de filtration, les densités de flux obtenues après stabilisation sont identiques indiquant une bonne maîtrise des conditions expérimentales.

Quelles que soit les conditions opératoires utilisées, les cinétiques de filtration présentent une allure classique et similaire. Quelques exemples sont présentés en Figure 23. Après une décroissance importante, les densités de flux se stabilisent complètement à partir de 60 min de filtration. Le colmatage membranaire atteint donc assez rapidement un état d'équilibre comme c'est généralement le cas pour les jus de fruits (SORO *et al.*, 2012 ; ABREU *et al.*, 2005 ; VAILLANT, 2008 ; CASTRO *et al.*, 2005 ; CIANCI *et al.*, 2005 et CARNEIRO *et al.*, 2002). Par contre, comparativement aux autres jus de fruits, les valeurs de densités de flux de perméat stabilisées obtenues sont particulièrement élevées. Elles s'échelonnent en effet entre 130 et 280 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup> en fonction des conditions opératoires utilisées. Cette

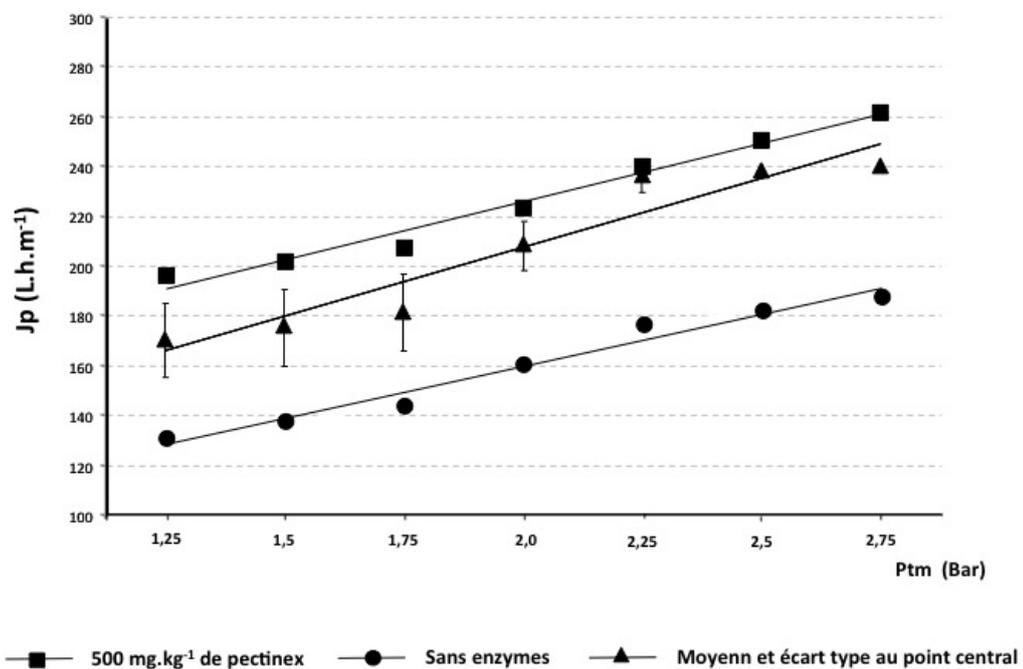
différence est probablement liée à la nature de l'extrait qui n'est pas à proprement parlé un jus de fruit. On peut par exemple supposer que la faible teneur en matière sèche des extraits facilite l'opération de microfiltration. La comparaison fine des diverses fractions colmatantes des extraits et d'un jus de pomme cajou serait intéressante à ce niveau pour mieux appréhender les phénomènes mis en jeu (macromolécules solubles, fraction colloïdale, fraction insoluble).

Les résultats indiquent clairement que l'utilisation de pectinase lors de la macération améliore les performances du procédé. Toutes autres conditions opératoires étant constantes par ailleurs, l'augmentation de la dose de pectinase se traduit par une augmentation des densités de flux de perméat (Figure 23). Comme nous l'avons mentionné précédemment, cet effet est cohérent. Les hydrolases et les lyases contenues dans le mélange enzymatique utilisé modifient les fractions pectiques solubles (diminution des masses molaires) et insolubles (solubilisation partielle) qui sont connues pour intervenir fortement dans le colmatage membranaire.



**Figure 23 :** Impact de la teneur en pectinase sur l'évolution de la densité de flux de perméat ( $J_p$ ) en fonction du temps pour quelques essais réalisés à 2,75 bar et FRV 1 (extrait obtenu avec un cycle de pressage, force appliquée 1450 N).

L'effet de la pression transmembranaire ( $P_{tm}$ ) sur la densité de flux de perméat  $J_p$  est illustré sur la Figure 24 en fonction de la dose de pectinase. Dans le domaine expérimental testé,  $J_p$  augmente linéairement avec  $P_{tm}$ . La pente des courbes est la même avec ou sans enzyme et quel que soit la dose d'enzyme utilisée. L'impact de la  $P_{tm}$  sur la résistance hydraulique du système est donc similaire dans tous les cas. En examinant la répétabilité qui a été évaluée à 250  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  de pectinase, les écarts types obtenus sont très satisfaisants à forte  $P_{tm}$  ( $< 7\%$ ) et sont par contre plus élevés en dessous de 2 bar (10 à 15%).

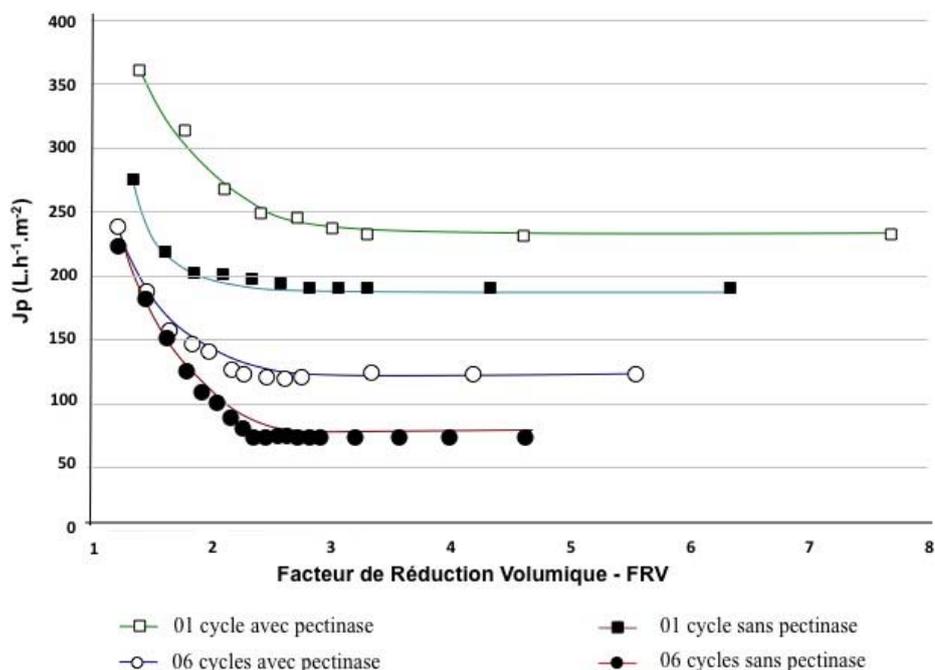


**Figure 24 :** Impact de la pression transmembranaire ( $P_{tm}$ ) sur la densité de flux de perméat ( $J_p$ ) à FRV 1 en fonction de la dose de pectinase utilisée lors de la macération enzymatique (extrait obtenu avec un cycle de pressage, force appliquée 1450 N).

#### 4.3.1.2. Étude de l'impact des conditions opératoires à FRV > 1

##### 4.3.1.2.1. Effet du pré-traitement enzymatique et du nombre de cycles d'extraction sur le $J_p$

Afin d'évaluer l'impact du traitement enzymatique et du nombre de cycles de pressage sur les performances globales du procédé de microfiltration à FRV croissant, une étude préliminaire a été réalisée à partir d'essais en concentration jusqu'à FRV 5 à 8 (Figure 25).



**Figure 25 :** Impact de la macération enzymatique avec pectinase ( $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) et du nombre de cycles de pressage sur les densités de flux de perméat ( $J_p$ ) en fonction du facteur de réduction volumique (FRV) lors de la concentration des extraits par microfiltration ( $P_{tm} = 3,2 \text{ bar}$ , force utilisée pour l'extraction =  $1450 \text{ N}$ ).

Les densités de flux de perméat obtenues sont augmentées d'environ 40% pour les essais réalisés avec pectinase et ce, quel que soit le nombre de cycles de pressage utilisé. L'effet positif du traitement enzymatique sur les flux est lié à plusieurs phénomènes. L'action conjointe des activités polyglacturonases et pectine-lyases des enzymes pectinolytiques conduit tout d'abord à l'hydrolyse progressive des composés pectiques solubles. La diminution de la masse molaire de ces polysides se traduit par une diminution de la viscosité des extraits qui, selon la loi de Darcy, a une répercussion directe sur le flux de matière à travers le milieu poreux. En complément de cet effet sur la viscosité, les enzymes pectinolytiques sont également susceptibles d'agir sur les composés pectiques insolubles localisés au niveau des parois pectocellulosiques (cellules ou fragments cellulaires en suspension). Elles peuvent ainsi modifier considérablement le pouvoir colmatant de l'extrait en solubilisant partiellement la fraction insoluble et en modifiant ses caractéristiques (réduction de la taille des particules, etc.). Une caractérisation rhéologique et un profil

granulométrique mériteraient d'être réalisés sur les extraits pour évaluer la prépondérance d'un des phénomènes par rapport à l'autre.

La répétition des opérations de pressage en cycles consécutifs conduit à une plus grande dilacération des tissus à cause des forces de cisaillement subies à plusieurs reprises pendant le pressage. Ceci occasionne une augmentation de la quantité des particules en suspension dans les extraits. Ces particules fibreuses de petite taille passent à travers le tamis de 300  $\mu\text{m}$  qui est utilisé avant la microfiltration et se retrouvent en circulation dans le rétentat jusqu'à la fin du procédé. En augmentant le nombre de cycles de pressage, l'extrait devient donc de plus en plus colmatant. En utilisant 6 cycles de pressage, les flux diminuent de plus de 50% par rapport à ceux obtenus après 1 seul cycle. Ce fait peut être considéré comme très préjudiciable aux performances du procédé. Toutefois, comme nous l'avons mis en évidence dans le chapitre consacré à l'extraction, la teneur en caroténoïdes des extraits est nettement plus élevée lorsque plusieurs cycles de pressage sont utilisés.

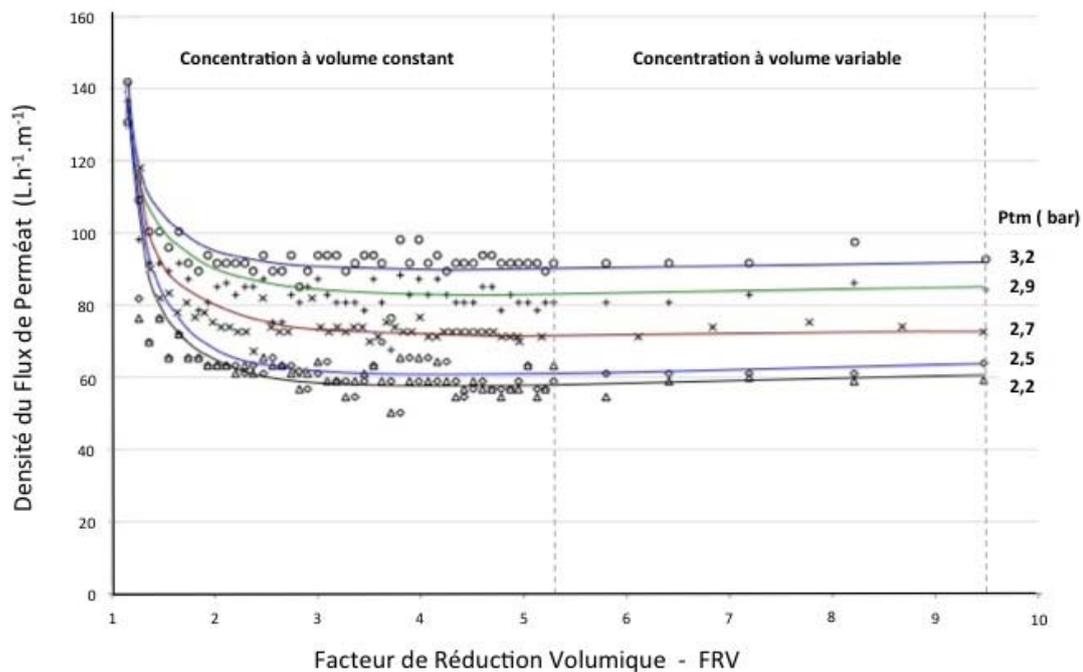
Ces résultats mettent clairement en évidence l'intérêt d'utiliser simultanément plusieurs cycles de pressage pour maximiser la teneur en caroténoïdes de l'extrait, et un prétraitement enzymatique pour maintenir les densités de flux de perméat à un niveau satisfaisant. Une valeur de  $J_p$  d'environ 130  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$  à FRV 5 a été ainsi obtenue pour l'essai à 6 cycles avec enzymage, ce qui peut être considéré comme satisfaisant pour envisager une application industrielle du procédé.

Analysant les quatre courbes de la Figure 25, on observe que les densités de flux de perméat ne dépendent plus du facteur de réduction volumique à partir d'un FRV d'environ 3, et ce pour tous les essais. Il est donc a priori possible de travailler avec des FRV supérieurs à 5-8 sans dégrader les performances de l'opération.

#### *4.3.1.2.2. Effet de la pression transmembranaire*

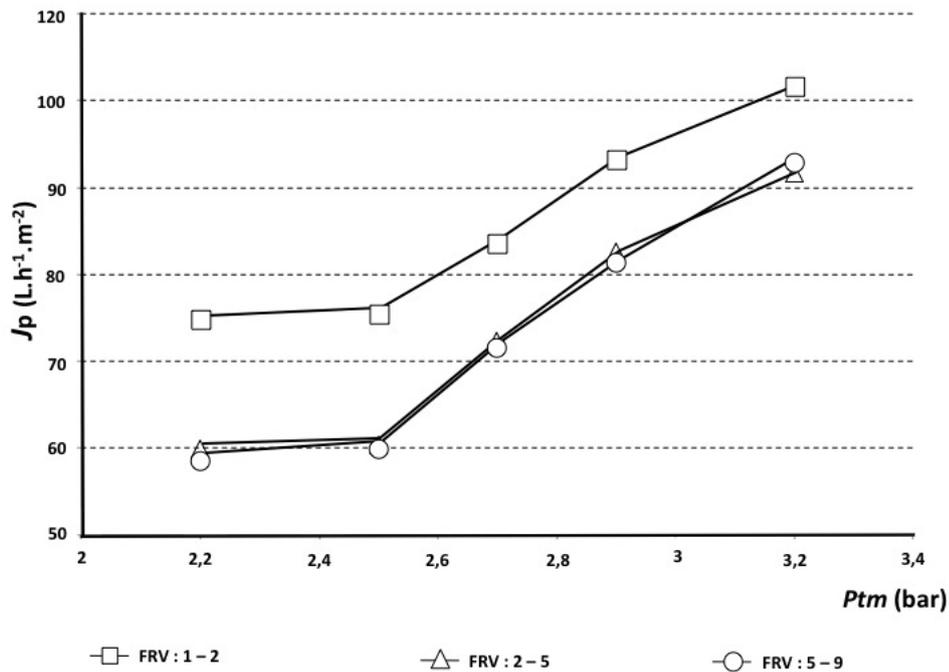
L'évaluation de l'effet de la pression transmembranaire sur les densités de flux de perméat en concentration a été réalisée en microfiltrant jusqu'à FRV 10, un extrait obtenu après 6 cycles de pressage sans macération enzymatique. Les résultats sont présentés sur la Figure 26. La concentration comporte une phase à volume constant puis une phase à volume variable, ou le FRV augmente de façon exponentielle au cours du temps.

Comme observé précédemment pour les essais réalisés jusqu'à FRV 5, les densités de flux de perméat chutent brusquement jusqu'à FRV 1,2 (effet cumulé de la mise en place du colmatage et de la concentration) puis diminuent plus progressivement jusqu'à un FRV d'environ 4. A partir de FRV 4-5, les  $J_p$  restent stables jusqu'à FRV 10 et ne dépendent donc plus du FRV. Ce comportement se retrouve quel que soit la pression transmembranaire de travail.



**Figure 26 :** Évolution du flux de perméat ( $J_p$ ) en fonction du facteur de réduction volumique (FRV) à différentes pressions transmembranaires (Ptm) lors de la microfiltration de l'extrait de fibres de pomme cajou obtenu sans traitement enzymatique.

Les résultats confirment que la pression transmembranaire influe fortement sur les performances du procédé et ce pour tous les FRV. Quelle que soit la gamme de FRV choisie, l'augmentation de la pression de 2,2 à 3,2 bar conduit à une augmentation de  $J_p$  de 40 à 50% (Figure 27). Les courbes ont la même allure aux 3 intervalles de FRV étudiés ce qui indique que le niveau de concentration atteint ne modifie pas le comportement du système vis à vis de la Ptm.

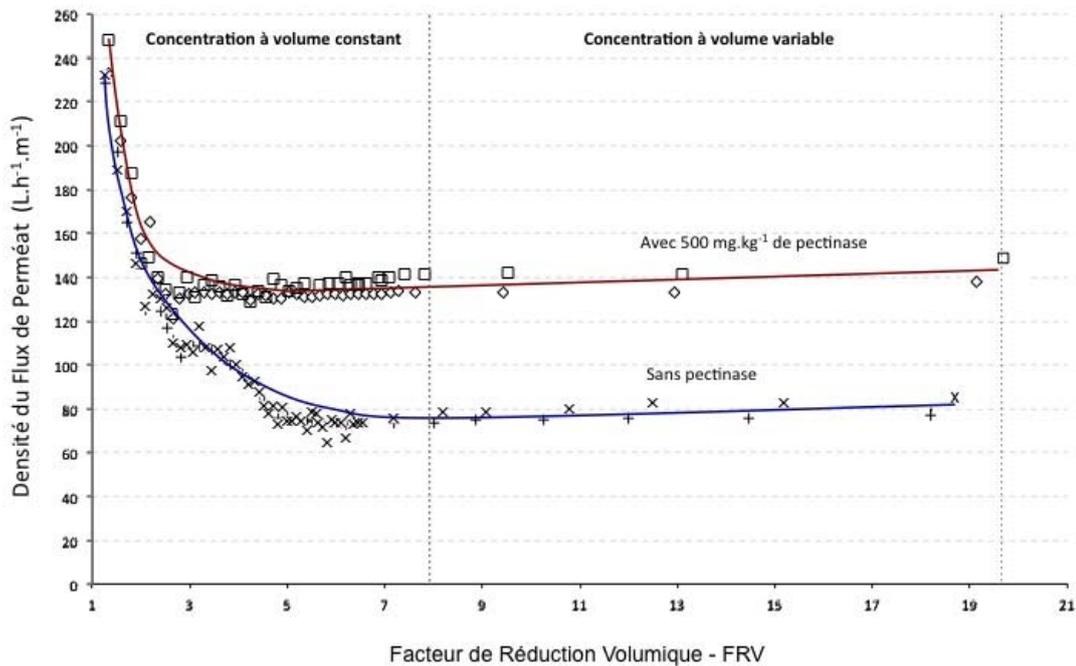


**Figure 27 :** Effet de la pression transmembranaire (Ptm) sur la densité de flux de perméat (Jp) en fonction des gammes du facteur de réduction volumique (FRV) lors de la microfiltration de l'extrait de fibres de pomme cajou obtenu sans traitement enzymatique.

Ces observations montrent donc qu'il est possible de concentrer l'extrait à des FRV élevés sans avoir de diminution drastique des performances et qu'il est préférable de choisir les fortes pressions transmembranaires (de l'ordre de 3 bar ici) pour maximiser les densités de flux quelque soit le FRV de travail choisi.

#### 4.3.1.3. Recherche du FRV maximal dans les conditions opératoires optimales

Compte-tenu des résultats précédents, nous avons cherché à évaluer le FRV maximal qu'il était possible d'atteindre sur l'installation pilote mise en œuvre. Cette étude a été réalisée grâce à des essais de longue durée menés sur une vingtaine de litres d'extrait dans les conditions optimales de traitement préalablement définies : Ptm 3,2 bar, température 40°C, extrait obtenu à la suite de 6 cycles de pressage après macération avec 500 mg.kg<sup>-1</sup> de pectinase ou sans enzyme. Les essais ont été réalisés en duplicata toujours dans le souci de vérifier la répétabilité des résultats.



**Figure 28 :** Évolution de la densité de flux de perméat ( $J_p$ ) en fonction du facteur de réduction volumique (FRV) lors de la microfiltration d'extraits de fibres de pomme cajou obtenus avec et sans traitement enzymatique à la concentration maximale admissible sur le pilote mis en œuvre (2 répétitions,  $P_{tm} = 3,2$  bar ;  $40 \pm 2$  °C).

La Figure 28 présente les résultats. Comme précédemment, une bonne répétabilité est obtenue ce qui est un gage de fiabilité des données.

Ce travail montre qu'il est possible d'atteindre sans chute de flux, des FRV extrêmement élevés, compris entre 18 et 20. Ces valeurs de FRV doivent même pouvoir être dépassées car elles correspondent uniquement à la limite imposée par l'outil expérimental. A partir de FRV 5 et jusqu'à FRV 20, les densités de flux se stabilisent vers  $131 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  pour les essais réalisés avec pré-traitement enzymatique et vers  $78 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  pour les essais sans prétraitement. Ces données correspondent à de bonnes performances comparativement à celles généralement présentées dans le domaine des jus de fruit (VAILLANT, 2008 ; CASTRO *et al.*, 2005 ; CIANCI *et al.*, 2005 et CARNEIRO *et al.*, 2002). Elles garantissent l'applicabilité du procédé à l'échelle industrielle (y compris sans macération enzymatique), la valeur de densité de flux économique généralement admise sur ce type d'installation étant évaluée à  $70 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ .

#### **4.3.2. Purification par diafiltration**

L'étude de la purification des extraits a été menée à partir d'essais de concentration à FRV 20, en finalisant l'opération avec l'étape de diafiltration. Ces essais ont été réalisés dans les conditions opératoires optimales définies précédemment avec environ 20 L d'extrait brut. Deux essais sont comparés : le premier sans macération enzymatique et le second avec une macération enzymatique à  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  de pectinase.

Parmi les diverses stratégies possibles nous avons choisi d'opter pour une diafiltration à volume constant en fin de concentration (stratégie 2 de la Figure 8). La diafiltration démarre donc à la fin de la phase de concentration, quand le volume circulant est proche du volume minimum de la boucle de circulation (1,2 à 1,4 L). Cette configuration permet de limiter la quantité d'eau à mobiliser pour la purification. Elle est de plus relativement simple à mettre en œuvre au niveau expérimental. Toutefois, elle ne peut être envisagée d'un point de vue économique, que si les densités de flux sont peu affectées par le FRV ce qui correspond à notre cas comme nous l'avons montré antérieurement. Il est important de noter que la consommation d'eau est un paramètre primordial dans le contexte de notre travail. En effet la disponibilité des ressources en eau potable dans les régions de production de cajou est souvent limitée.

Le critère d'arrêt choisi pour la diafiltration est l'extrait sec soluble (ESS) final du diafiltrat. L'opération est stoppée lorsque cet ESS est compris entre 2 et  $4 \text{ g.kg}^{-1}$ .

Nous proposons dans cette partie de présenter successivement les résultats obtenus en termes de performances puis en termes de qualité des extraits finaux.

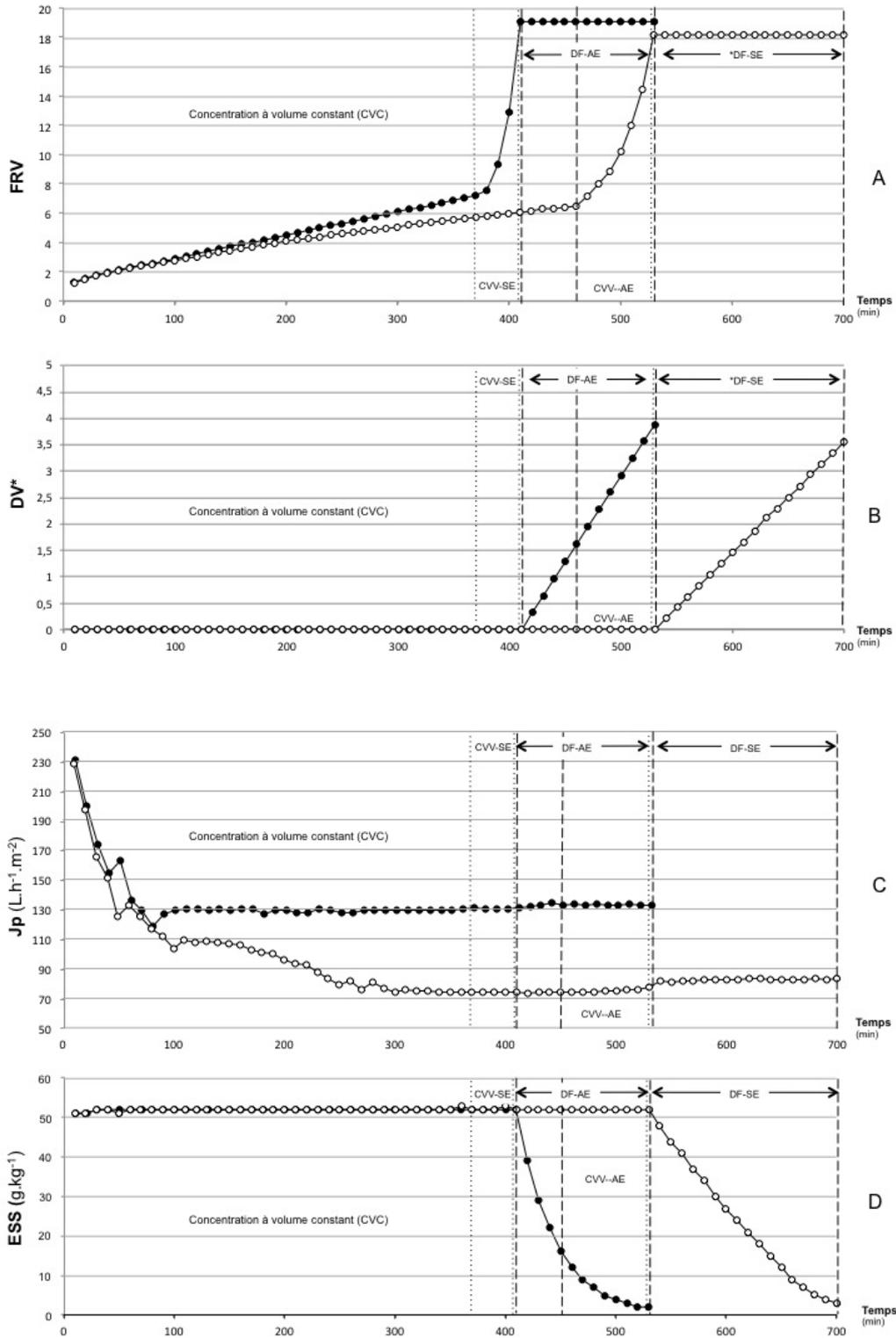
##### **4.3.2.1 – Performances du procédé**

Une représentation synthétique du déroulement des essais est proposée sur la Figure 29. Cette figure mentionne l'évolution au cours du temps des 2 principaux paramètres de conduite de l'opération, qui sont le FRV et le diavolume, et des 2 principaux critères de performances, qui sont la densité de flux de perméat et son extrait sec soluble (critère d'arrêt de la diafiltration). Les durées des 2 essais ne sont pas identiques compte tenu de la différence de densités de flux de perméat obtenues avec ou sans macération enzymatique (durée totale de 700 min sans pectinase et 530 min avec).

L'allure des courbes de FRV en fonction du temps fait nettement apparaître les 2 phases de la concentration (Figure 29A). Les FRV évoluent quasiment linéairement en fonction du temps durant la phase de concentration à volume constant puis augmentent de façon exponentielle durant la phase de concentration à volume variable. Durant cette seconde phase, le FRV évolue plus vite car il résulte à la fois du volume extrait de perméat et de la diminution du volume circulant. La diafiltration ne modifie plus le FRV car le système n'est plus alimenté par du produit mais par de l'eau.

Durant la phase de diafiltration, l'augmentation linéaire du DV\* au cours du temps est liée à la stabilité des densités de flux (Figure 29B). Les diavolumes nécessaires pour atteindre le critère d'arrêt défini ( $2 < ESS < 4 \text{ g.kg}^{-1}$ ) correspondent à environ 4 fois le volume circulant. Logiquement, ils sont atteints d'autant plus rapidement que les densités de flux de perméat sont élevées.

Nous ne reviendrons pas à ce niveau sur l'évolution des densités de flux de perméat durant la concentration qui a déjà été discutée dans la partie précédente. Pendant la diafiltration, une faible augmentation de  $J_p$  est observée et ce dans les deux cas étudiés (Figure 29C). Ce phénomène peut être expliqué par la diminution de la viscosité du perméat qui s'appauvrit progressivement en solutés à cause de l'ajout constant d'eau distillée. Cette augmentation des  $J_p$  est comprise entre 3 et 6% ce qui reste très faible. L'intérêt de travailler avec une macération enzymatique se confirme nettement. Les densités de flux plus grandes obtenues permettent de réduire considérablement la durée de la diafiltration ce qui est plus intéressant d'un point de vue économique mais qui permet aussi de limiter les risques de dégradation des caroténoïdes par oxydation ou encore les risques de fermentation.



**Figure 29 :** Évolution : A) du facteur de concentration volumique (FRV), B) du diavolume réduit (DV\*), C) de la densité du flux de perméat (Jp) et D) de la teneur en extraits secs solubles (ESS) en fonction du temps lors de la concentration et de la purification d'un extrait de fibres de pomme cajou par microfiltration et diafiltration. \*DF-AE (diafiltration avec enzymes) ; \*DF-SE (diafiltration sans enzymes) ; CVC (concentration à volume constant) ; CVV (concentration à volume variable). (P<sub>tm</sub> = 3,2 bar ; 40 ± 2°C)

L'évolution de l'ESS du perméat au cours de l'opération est présentée sur la Figure 29D. L'ESS est constant durant la phase de concentration car la membrane ne retient aucun des composés solubles présents dans le produit. La décroissance de l'ESS mesurée dans les deux cas, montre un comportement typique des procédés de diafiltration (exponentielle négative). A la vue de ces résultats et compte-tenu de la vitesse tangentielle utilisée ( $6 \text{ m.s}^{-1}$ ), il est probable que la boucle de circulation se comporte comme un réacteur infiniment mélangé. Cette hypothèse pourra être raisonnablement retenue pour la modélisation ultérieure. La décroissance de l'ESS est nettement plus rapide pour l'essai réalisé avec macération enzymatique compte-tenu des meilleurs flux obtenus.

### 4.3.2.2 – Qualité des extraits concentrés purifiés

Le Tableau 12 rappelle les principales conditions opératoires utilisées au cours des 2 essais de diafiltration et compare les caractéristiques des extraits bruts et finaux obtenus.

Logiquement lors des 2 essais, la fraction solide insoluble (SIS) qui est complètement retenue par la membrane, se concentre autant de fois que le FRV final atteint ( $\times 18 -19$ ). Comme on pouvait s'y attendre, les facteurs de concentration mesurés pour la matière sèche totale sont plus faibles que le FRV (seulement  $\times 4$ ). La matière sèche de l'extrait brut ne contient en effet que 20% de composés insolubles. Le reste est éliminé dans le perméat lors de la diafiltration (ESS).

En ce qui concerne les caroténoïdes, le procédé permet de les concentrer 19 fois ce qui correspond au FRV final de travail. Ce résultat confirme que les caroténoïdes sont totalement retenus par la membrane et qu'ils ne se dégradent pas significativement durant le traitement. La diafiltration augmente considérablement la pureté des caroténoïdes par rapport à la matière sèche. En effet, elle est multipliée par 5 après l'opération.

Ce travail montre clairement que le procédé proposé qui couple une concentration par microfiltration avec une purification par diafiltration est efficace. L'extrait final obtenu possède une teneur élevée en caroténoïdes ( $50 \text{ à } 70 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) avec une pureté exprimée par rapport à la matière sèche voisine de  $250 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Associés aux bonnes performances obtenues notamment lorsqu'une macération enzymatique est utilisée en amont ( $J_p > 100 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ) ces résultats sont très encourageants pour une future application industrielle. Le volume d'eau à utiliser est relativement faible. Un travail complémentaire mériterait néanmoins d'être mené pour tenter de le diminuer.

**Tableau 12 :** Caractéristiques des extraits, conditions opératoires et résultats généraux du procédé de concentration et purification par microfiltration et diafiltration, sans et avec macération enzymatique (500 mg.kg<sup>-1</sup> de Pectinex SP-L) à partir d'un extrait obtenu après 6 cycles de pressage (2500 N, 55 °C).

CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT INITIAL	SANS PECTINASE	PECTINASE à 500 mg.kg <sup>-1</sup>		
ESS <sub>0</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	52,0	52,0		
SIS <sub>0</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	12,7 (0,13) *	13,0 (0,17) *		
MST <sub>0</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	64,7 (0,17) *	65,0 (1,66) *		
Cc <sub>0</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	2,9 (0,7) *	3,8 (0,6) *		
p <sub>0</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	44,8	58,4		
<b>PARAMÈTRES OPÉRATOIRES</b>				
Volume d'extrait utilisé (mL)	20000	22000		
Volume circ. en concentration (mL)	3000	3000		
Volume circ. en diafiltration (mL)	1190	1450		
FRV max atteint	17,8	19,1		
DV (mL)	5129	5889		
DV*	4,31	4,06		
Durée totale de l'essai (min)	530	700		
V <sub>eff</sub> (mL)	23939	26439		
V* <sub>eff</sub>	20,3	22,0		
<b>DENSITÉS DE FLUX (L.h<sup>-1</sup>. m<sup>-2</sup>)</b>				
Jp <sub>moyen</sub> (en concentration)	77,9	130,5		
Jp <sub>moyen</sub> (en diafiltration)	82,3	133,8		
CARACTERISTIQUES DE L'EXTRAIT FINAL	Expérimental	Théorique	Expérimental	Théorique
ESS <sub>f</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	4,0	4,9	2,0	2,1
SIS <sub>f</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	227,0 (0,55) *	226,1	248,4 (1,46) *	248,3
MST <sub>f</sub> (g.kg <sup>-1</sup> )	242,1 (0,85) *	231,0	261,4 (2,08) *	250,4
Cc <sub>f</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	54 (2,4) *	52	73 (3,4) *	72
p <sub>f</sub> (mg.kg <sup>-1</sup> )	223	227	279	304
FC <sub>SIS</sub>	17,9	17,8	19,1	19,1
FC <sub>MST</sub>	3,7	3,6	4,0	3,9
FCc	18,6	17,8	19,2	19,1
FPc	5,0	5,1	4,8	5,0

\* : moyenne (écart type) sur 3 répétitions.

### 4.3.3. Proposition d'un outil prévisionnel

#### 4.3.3.1 Mise en équations

A partir de quelques hypothèses simplificatrices et de simples bilans matière, il est possible de prévoir par le calcul, l'impact du procédé combiné de microfiltration et diafiltration sur la composition en caroténoïdes de l'extrait.

On posera que tous les caroténoïdes et autres composés insolubles sont totalement retenus par la membrane utilisée quelles que soient les conditions opératoires. Aucun des composés solubles n'est retenu. Tous les caroténoïdes sont stables et ne se modifient pas chimiquement pendant le traitement. On supposera enfin que, lors de la phase de diafiltration, le système se comporte comme un réacteur infiniment mélangé (FOLEY 1999 ; FOLEY 2006).

La pureté en caroténoïdes de l'extrait (p) est définie par rapport à la matière sèche totale de l'extrait (MST) qui correspond à la somme de l'extrait sec soluble (ESS) et de l'extrait sec insoluble (SIS). On notera Cc la concentration en caroténoïdes de l'extrait.

A t = 0, on pose Cc<sub>0</sub> et MST<sub>0</sub> = ESS<sub>0</sub> + SIS<sub>0</sub>, ainsi

$$p_0 = \frac{C_{c_0}}{ESS_0 + SIS_0} \quad (8)$$

A un temps quelconque t auquel correspond un FRV et un diavolume (DV) donnés, on a :

$$C_c = C_{c_0} \text{FRV} \quad (9)$$

$$SIS = SIS_0 \text{FRV} \quad (10)$$

$$ESS = ESS_0 e^{-DV/V_b} \quad (11)$$

en notant V<sub>b</sub> le volume de la boucle de concentration.

Soit DV\* le diavolume réduit défini comme le rapport DV/V<sub>b</sub>, la pureté se calcule alors selon l'équation (12).

$$p = \frac{C_{c_0} \text{FRV}}{ESS_0 e^{-DV^*} + SIS_0 \text{FRV}} \quad (12)$$

Les facteurs de concentration (Fc) et de purification (Fp) des caroténoïdes peuvent ainsi être évalués à partir des équations 13 et 14.

$$F_c = C_c / C_{c_0} = \text{FRV} \quad (13)$$

$$\boxed{Fp = p/p_0 = FRV \frac{ESS_0 + SIS_0}{ESS_0 e^{-DV^*} + SIS_0 FRV}} \quad (14)$$

En utilisant les équations 12 à 14, il est donc possible de prévoir l'effet de n'importe quel traitement de diafiltration, sur la concentration et la pureté en caroténoïdes.

Notons qu'il existe une pureté maximale qu'il est impossible de dépasser. Cette pureté maximale ou le facteur de purification correspondant se calculent à partir des équations 15 et 16.

$$p_{\max} = \lim_{DV^* \rightarrow \infty} p = \frac{Cc_0}{SIS_0} \quad (15)$$

$$Fp_{\max} = \lim_{DV^* \rightarrow \infty} Fp = 1 + \frac{ESS_0}{SIS_0} \quad (16)$$

A partir de l'équation 12, le diavolume nécessaire pour atteindre une pureté  $p$  donnée, après une concentration à un certain  $FRV$ , s'exprime selon l'équation 17.

$$DV^* = -\ln \left[ \frac{FRV}{ESS_0} \left( \frac{Cc_0}{p} - SIS_0 \right) \right] \quad (17)$$

Il est également possible de raisonner à partir d'un taux de purification  $\xi$  que l'on définit comme étant la fraction de la pureté maximale atteinte  $p_{\max}$  en fin de traitement ( $0 < \xi < 1$ ). La combinaison des équations 15 et 17 donne alors l'expression 18 qui permet d'évaluer le diavolume à utiliser pour un taux de purification cible.

$$DV^* = -\ln \left[ FRV \frac{SIS_0}{ESS_0} \left( \frac{1-\xi}{\xi} \right) \right] \quad (18)$$

En combinant les équations 11 et 18, l'équation 19 est obtenue. Elle permet de calculer l'extrait sec soluble final à atteindre pour obtenir un taux de purification cible  $\xi$ . On constate à ce niveau que l'extrait sec soluble final à atteindre ne dépend pas de l'extrait sec soluble initial.

$$ESS = FRV SIS_0 \left( \frac{1-\xi}{\xi} \right) \quad (19)$$

Enfin le volume d'effluent produit  $V_{\text{eff}}$  peut également être calculé. En effet,  $V_{\text{eff}}$  correspond à la somme du volume de perméat produit pendant l'étape de concentration ( $V_{\text{perméat}} = V_b (\text{FRV}-1)$ ) et du diavolume utilisé (DV). En notant  $V_{\text{eff}}^*$  le volume d'effluent réduit ( $V_{\text{eff}}^* = V_{\text{eff}}/V_b$ ), on obtient l'expression 20.

$$V_{\text{eff}}^* = DV^* + \text{FRV} - 1 \quad (20)$$

#### **4.3.3.2 Validation et utilisations du modèle**

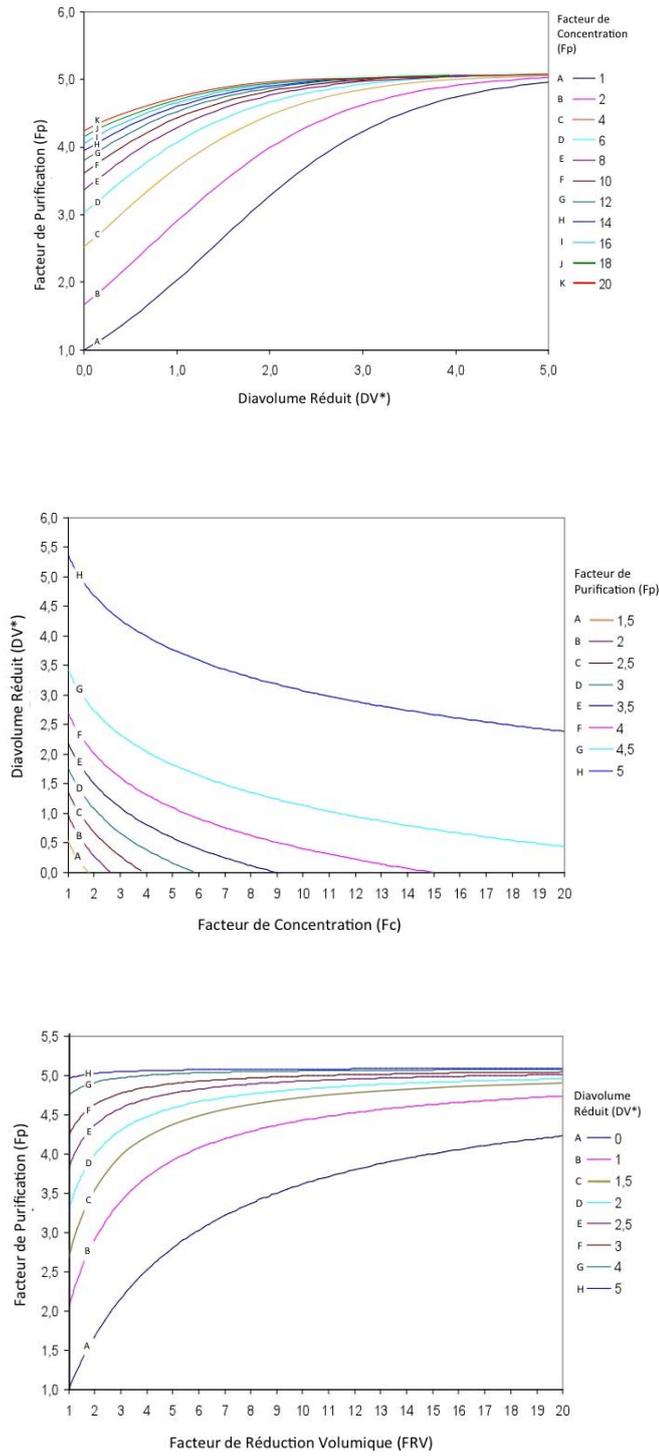
A partir des caractéristiques initiales de l'extrait ( $\text{ESS}_0$ ,  $\text{SIS}_0$ ,  $\text{MST}_0$ ,  $\text{Cc}_0$ ), du facteur de réduction volumique final atteint FRV et du diavolume réduit utilisé  $DV^*$ , les caractéristiques de l'extrait final peuvent être calculées à l'aide du modèle.

Les valeurs calculées pour les 2 essais sont indiquées dans le Tableau 11. Elles peuvent être directement comparées aux valeurs obtenues expérimentalement. Aussi bien pour l'extrait sec soluble (ESS), les solides insolubles en suspension (SIS), la matière sèche totale (MST) que les caroténoïdes (Cc) les teneurs théoriques prévues par le calcul sont très similaires aux valeurs expérimentales. Il en est de même pour les différents facteurs de concentration et le facteur de purification des caroténoïdes. Cette observation est valable pour les 2 essais réalisés. Le modèle développé permet donc de prédire la composition finale de l'extrait. Il constitue un outil prévisionnel fiable pour évaluer l'impact du procédé sur la qualité du produit fini et ce, quel que soit le type d'essai. Ce modèle peut donc être mobilisé pour orienter les choix expérimentaux en fonction des objectifs fixés ou encore pour évaluer l'impact du traitement sur la qualité des extraits.

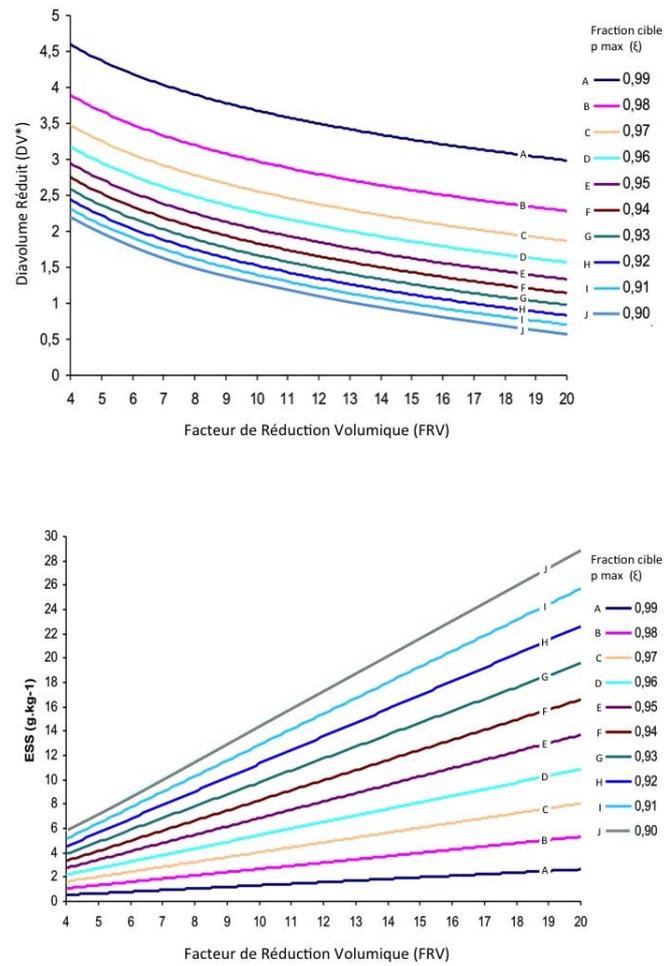
Il permet de générer divers abaques simples à manipuler (Figures 30 et 31). Ces abaques peuvent être utiles pour prévoir, par exemple, le diavolume qu'il faut utiliser pour obtenir un facteur de purification donné en fonction du facteur de réduction volumique choisi ou inversement.

Pour les 2 essais expérimentaux réalisés, la pureté maximale et le facteur de purification maximal théoriques peuvent être calculés à partir des équations 15 et 16. Les valeurs calculées sont très proches des valeurs mesurées expérimentalement en fin d'opération. Les valeurs limites sont déjà pratiquement atteintes. Poursuivre la diafiltration pour améliorer la

pureté de l'extrait ne présente donc, dans notre cas, aucun intérêt. Dans ce même ordre d'idée, les calculs permettent de montrer qu'un DV\* voisin de 3 est suffisant pour atteindre entre 98 et 99% de la pureté maximale ( $0,98 < \xi < 0,99$ ) ce qui permettrait une économie d'eau substantielle en plus de limiter le volume d'effluents produit. Le modèle développé est donc un outil intéressant pour aider au choix du point d'arrêt de la diafiltration et éviter toute consommation excessive d'eau (Figure 31).



**Figure 30 :** Exemples d'abaques générés via le modèle pour la prévision des résultats en fonction des conditions opératoires (DV\* diavolume réduit, FRV facteur de réduction volumique, Fc facteur de concentration, Fp facteur de purification).



**Figure 31 :** Détermination du diavolume réduit (DV\*) et de l'extrait sec soluble du diafiltrat (ESS) en fonction du facteur de réduction volumique (FRV) pour différent taux de purification  $\xi$  ( $ESS_0 = 52 \text{ g.kg}^{-1}$ ,  $SIS_0 = 13,0 \text{ g.kg}^{-1}$ ,  $Cc_0 = 0,38 \text{ g.kg}^{-1}$ ).

**Chapitre V :**  
**Conclusions et perspectives**

## **5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

L'objectif initial de ce travail était de concevoir et d'étudier un nouveau procédé basé sur les technologies membranaires, pour élaborer des extraits enrichis et purifiés en caroténoïdes à partir d'un sous-produit de l'industrie des jus de pommes cajou. Ce chapitre reprend, étape par étape, les principales conclusions auxquelles a abouti cette étude. Les perspectives les plus pertinentes sont ensuite dégagées.

La caractérisation des extraits caroténoïdiques obtenus nous a permis de mettre en évidence leur richesse et leur diversité en caroténoïdes. Onze composés ont été identifiés. Les caroténoïdes majoritaires sont l'auroxanthine *cis* et *trans*, la lutéine et la  $\beta$ -cryptoxanthine. Ces 3 composés sont considérés comme les principaux responsables de la couleur jaune brillante des extraits. Les autres caroténoïdes identifiés et quantifiés se constituent du  $\beta$ -carotène, de la zéaxanthine, de la violaxanthine, de la zéinoxanthine, de l' $\alpha$ -carotène et de la néoxanthine.

D'un point de vue procédé, la première étape d'extraction assistée par des enzymes pectinolytiques a été optimisée en utilisant une démarche originale et rigoureuse basée sur l'utilisation de plans d'expériences. La démarche suivie a consisté, dans un premier temps, à sélectionner les 2 paramètres opératoires les plus influents via un plan de Plackett-Burman puis, dans un second temps, à les optimiser via un plan central composite. En utilisant un seul cycle de pressage, la force appliquée lors du pressage et la dose de pectinase mise en œuvre sont apparues comme les facteurs qui ont le plus grand impact sur l'extraction des caroténoïdes. L'optimisation finale de l'extraction a clairement montré que la macération enzymatique joue un rôle crucial dans la libération des caroténoïdes. Elle conditionne également la densité de flux de perméat lors de la microfiltration, opération unitaire qui suit immédiatement l'extraction. La force appliquée lors du pressage améliore aussi l'efficacité de l'extraction mais dans une moindre mesure. Les conditions de traitement optimales définies à la fois par rapport à la teneur en caroténoïdes et en termes de filtrabilité de l'extrait, correspondent à une dose de pectinase de  $500 \text{ mg.kg}^{-1}$  et à une force de pressage de 2500 N.

Nous avons pu mettre en évidence à ce stade l'intérêt de coupler une macération enzymatique adéquate à un pressage réalisé en plusieurs cycles successifs. Cette

configuration permet de maximiser les rendements d'extraction en caroténoïdes tout en conservant des densités de flux de perméat satisfaisantes en microfiltration.

Le travail démontre qu'il était possible de concentrer les caroténoïdes contenus dans les extraits bruts par microfiltration tangentielle sur membrane tubulaire céramique de diamètre moyen de pores  $0,2 \mu\text{m}$ . A conditions d'utiliser une extraction avec macération enzymatique et une pression transmembranaire de l'ordre de 3 bar, les flux de perméat obtenus restent très élevés ( $< 130 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ ) et ce, jusqu'à un facteur de réduction volumique de 20 ( $6 \text{ m.s}^{-1}$ ,  $40^\circ\text{C}$ ). Les caroténoïdes sont complètement retenus par les membranes utilisées et se concentrent donc dans le rétentat à un niveau équivalent au FRV de travail. La mise en œuvre de la diafiltration à la suite de la concentration par microfiltration a permis de purifier les caroténoïdes d'un facteur 5 par rapport à la matière sèche en utilisant un diavolume réduit de 4. Au bilan, l'extrait final contient plus de  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$  de caroténoïdes avec une pureté de l'ordre de  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ . En se basant sur quelques hypothèses simplificatrices et sur des bilans matières, nous avons développé un modèle permettant de prévoir l'impact du procédé combiné de microfiltration et diafiltration sur les caractéristiques de l'extrait final. Ce modèle a été validé dans plusieurs cas. Il constitue un outil prévisionnel intéressant pour optimiser les stratégies de conduite de l'opération.

Au final, les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que les fibres résiduelles de la production du jus de pommes de cajou peuvent effectivement être considérées comme une source intéressante de caroténoïdes. A partir de cette matière première abondante et bon marché, le travail a permis de définir et de valider un nouveau procédé réaliste pour l'obtention d'extraits caroténoïdiques concentrés et purifiés. Les résultats sont très encourageants aussi bien en terme d'efficacité du procédé qu'en terme de qualité du produit fini. Ils permettent d'ores et déjà d'envisager une prochaine mise en œuvre du procédé à l'échelle industrielle. Les extraits concentrés purifiés obtenus correspondent à des produits à haute valeur ajoutée. Ils sont directement utilisables comme colorants alimentaires ou, plus globalement, comme sources de caroténoïdes. Notons que l'adoption de techniques « propres » (sans solvant organique), « douces » (faible température), à faible coût énergétique s'inscrit dans une logique de développement durable de la filière anacardier dans les pays producteurs de cajou.

Les perspectives de l'étude sont de plusieurs ordres. En vue d'une future application industrielle, un travail complémentaire d'optimisation mériterait tout d'abord d'être entrepris : recherche du FRV maximal admissible ( $> 20$ ) ; optimisation du profil enzymatique (activités pectinasiqes, cellulasiqes, hémicellulasiqes mais aussi amylasiqes) pour augmenter le rendement d'extraction des caroténoïdes et les densités de flux de perméat lors de l'étape de microfiltration ; optimisation plus complète de la pression transmembranaire et de la température de filtration dans la limite du respect de la qualité de l'extrait ; évaluation d'autres membranes de microfiltration avec de plus grands diamètres de pores et/ou constituées d'autres matériaux ; diminution de la consommation d'eau durant la dialfiltration.

Afin de s'assurer de la validité des résultats à une échelle industrielle, des essais complémentaires de validation sur des installations de plus grande taille est requise. En effet, tous les essais présentés dans ce mémoire ont été réalisés sur des micropilotes de laboratoire. L'extrapolation des résultats à l'échelle industrielle n'est donc pas immédiate (scale-up). La robustesse du procédé vis à vis des variations de la matière première doit être également évaluée (différentes variétés de pomme cajou, etc.). Enfin, l'étude de la stabilité chimique et microbiologique des extraits est nécessaire afin d'optimiser les conditions de conservation de ces produits, d'évaluer leur durée de vie voire d'envisager un traitement complémentaire de stabilisation.

Enfin, dans l'optique d'une application à d'autres types de matières premières, une meilleure compréhension des mécanismes de colmatage des membranes serait très utile pour faciliter l'optimisation du procédé. Ce travail passe par l'identification des fractions colmatantes du produit. Il devrait permettre de prévoir les performances de la microfiltration en fonction des caractéristiques du produit, ou alors, de mieux orienter les conditions d'extraction pour diminuer le pouvoir colmatant des extraits.

## Références bibliographiques

**BIBLIOGRAPHIE**

ABREU, F.A.P. Extrato de bagaço de caju rico em pigmento. Brazilian Patent BR PI 0103885-0. 19 de junho de 2001.

ABREU, F.A.P.; PEREZ A.M.; DORNIER, M.; REYNES, M. (2005) Potentialités de la microfiltration tangentielle sur membranes minérales pour la clarification du jus de pomme de cajou. **Fruits**, 60, 33-40.

AGRIANUAL 2010 – Anuário da Agricultura Brasileira. AGRA/FNP. São Paulo, out. 2009. 34 – 400.

AIMAR, P. ; BACCHIN, P. ; MAUREL, A. (2006) Filtration membranaire (OI, NF, UF et MFT) – Aspects théoriques : perméabilité et selectivité. Techniques de l'Ingénieur. Toulouse, 89 –92.

ALMANDOZ, C.; PAGLIERO, C.; OCHOA, A.; MARCHESE, J. (2010) Corn syrup clarification by microfiltration with ceramic membranes. **Journal of Membrane Science**, 363, (12), 87-95. 45.

ÁLVAREZ, S; ÁLVAREZ, R.; RIERA; F. A.; COCA, J. (1997) Influence of despectinization on apple juice ultrafiltration. **Colloids and surfaces**, vol. 138, 376-382.

ALVAREZ, V.; ANDRES, L. J.; RIERA, F. A.; ALVAREZ, R. (1996) Microfiltration of apple juice using inorganic membranes: Process optimization and juice stability. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, 74, (1), 156-162.

AOAC - Association of Official analytical Chemistry (1997). Official methods of analytical Chemistry. Vitamins and other nutrients. Washington. 1115p.

ASSUNÇÃO R. B., MERCADANTE A. Z. (2003)<sup>a</sup>: Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale L.*). **Journal of food composition and analysis**, 16, 647-657.

ASSUNÇÃO R. B., MERCADANTE A. Z. (2003)<sup>b</sup>: Carotenoids and ascorbic acid from cashew apple (*Anacardium occidentale L.*): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, 81, 495-502.

AZEREDO, H. M. C.; ABREU, F.A.P.; SOUSA, L. L.; SOUZA, A.C.R; BRITO, E.S. (2006) Avaliação do impacto de pré-tratamentos sobre a extração de carotenóides por prensagem seqüencial de bagaço de caju. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, 24, 397- 404.

BARBA, D.; BEOLCHINI, F.; VEGLIO, F. (1998), Water saving in a two stage diafiltration for the production of whey protein concentrates. **Desalination**, 119, 187 – 188.

BARROS, L. M. (1998) Melhoramento genético do cajueiro. In: LIMA, V. P. M. S. (Ed.). A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil. Fortaleza: BNB/ETENE, 321-356.

BARROS, L. de M.; PAIVA, J.R de.; CAVALCANTI, J.J.V.; ALVES, R.E.; LIMA, A.C. (2002)BRS 189 dwarf cashew clone cultivar. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, 2, n.1, 157-158.

BARROS, S. T. D.; MENDES, E. S.; PERES, L. (2004) Influence in the ultrafiltration of west indian cherry (*Malpighia glabra L.*) and pineapple (*Ananas comosus L.*) juices. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 24, n. 2, p. 194 – 201.

BASSO, R.C; GONCALVES, L.A.G.; VIOTTO, L.A. (2009) Degumming and production of soy lecithin and the cleaning of ceramic membrane used in the ultrafiltration and diafiltration of crude soybean oil. **Journal of Membrane Science**, 330, 127 – 134.

BICALHO, B., PEREIRA, A. S., AQUINO NETO, F. R., PINTO, A. C., & REZENDE, C. M. (2000). Application of high-temperature gas chromatography-mass spectrometry to the investigation of glycosidically bound

- compounds related to cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *48*, 1167–1174.
- BIDAU, D (2002). Procédé de concentration et de stabilisation de caroténoïdes à partir de légumes ou de fruits. **Brevet français** n°053530.
- BIMBENET, J. J.; DUQUENOY, A.; TRYSTRAM, G. (2008) Génie des procédés alimentaires – Des bases aux applications. 2<sup>ème</sup> ed.; Dunod: Paris, 554.
- BRITO, E. S.; ARAUJO, M. P.; LIN, L. Z.; HARN, Y, J. (2007) Determination of the flavonoid components of cashew Apple (*Anacardium occidentale*, L.) by LC-DAD-ESI/MS. **Food Chemistry**, *105*, 1112 – 1118.
- BRITTON, G. (1995). UV/visible spectroscopy. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), Basel: Birkhauser Carotenoids: spectroscopy. 13 - 62.
- CAMPOS D. C. P., SANTOS A. S., WOLKOFF D. B., MATTA V. M., CORREA CABRAL L.M., COURI S. (2002) : Cashew apple juice stabilization by microfiltration. **Desalination**, *148*, 61-65.
- CARNEIRO, L.; DOS SANTOS SA, I.; DOS SANTOS GOMES, F.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C. (2002) Cold sterilization and clarification of pineapple juice by tangential microfiltration. **Desalination**, *148*, (1-3), 93-98.
- CASTRO, T.R.; ABREU, F.A.P.; CARIOCA, J.O.B. (2007) Using membrane separation processes to obtain clarified cashew apple juice. **Revista Ciência Agronômica**, *38* (2) 164-168.
- CECCHI, H. M., & RODRIGUEZ-AMADYA, D. B. (1981). Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *Journal of Food Science*, *46*(1), 147–149.
- CHEANG, B.; ZYDNEY, A.L.A. (2004) Two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. **Journal of Membrane Science**, *231*, 159 – 167.
- CHERYAN, M. A., J. R. (1995) Food and beverage industry application. dans Membrane separation technology, principles and applications. R.D. NOBLE et S.A. STERN, Elsevier Science B.V. USA.
- CHIH CHIU, M. (2009) Carotenoids concentration of palm oil using membrane technology. **Desalination**, *245*, 783-786.
- CISSE, M.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.; DORNIER, M.; REYNES, M. (2005) The quality of orange juice processed by coupling crossflow microfiltration and osmotic evaporation. **International Journal of Food Science and Technology**, *40*, (1), 105-116.
- CROMBIE LANCE B. US – **Patent** (2004) Method for extracting lutein from green plant materials. WO 2004094350 (A1).
- DAURY, M.C.; JUILLERAT, M. A. (2000) Method for extracting carotenoids and other anti-oxidants EP 1051918 A1. **European Patent Application**.
- DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. (2000) Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Amherst, *40*, n. 3, 173-289
- DHUIQUE-MAYER C., TBATOU M., CARAIL M., CARIS-VEYRAT C., DORNIER M., JOSEPHE AMIOT M. (2007). Thermal degradation of antioxidant Micronutrient in citrus juice: kinetic and newly formed compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, *55*, 4209-4216.

- DUHIQUE-MAYER C., CARIS-VEIRAT C., OLLITRAULT P., CURK F., AMIOT M. J. (2005): Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the Mediterranean area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 2140-2145.
- FONTES, C.P.M.L., HONORAT, T.L., RABELO, M.C. & RODRIGUES, S. (2009). Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 32 (4), 493–499.
- DUTRE B. AND TRAGARDH, G. (1994) Macrosolute-microsolute separation by ultrafiltration: A review of diafiltration process and applications. **Desalination**, 95, 227-267.
- EMBRAPA (1999). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Revista Guia da Terra**, 3, 17.
- FILGUEIRAS H. A. C.; DE FIGUEIREDO R.W., LAJOLO F.M., ALVES R. E., (2002). Physical-chemical changes in early dwarf cashew pseudo-fruits during development and maturation. **Food chemistry**, 77, 343-347.
- FOLEY, G. (2006). Water usage in variable volume diafiltration: comparison with ultrafiltration and constant volume diafiltration. **Desalination**, 196, 160 – 163.
- FONTES, C.P.M.L., HONORATO, T.L., RABELO, M.C., RODRIGUES, S. (2009) Kinetic study of mannitol production using cashew apple juice as substrate. **Bioprocess Biosyst Eng**, 32, 493–499.
- FRANK, H. A.; YOUNG, A. J.; BRITTON, G.; COGDELL, R. J. (2004) The Phytochemistry of Carotenoids. New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic Publishers. 399p.
- GAN, Q.; FIELD, R. W.; BIRD, M. R.; ENGLAND, R.; HOWELL, J. A.; MCKECHNIE, M. T.; OSHAUGHNESSY, C. L. (1997) Beer clarification by cross-flow microfiltration: Fouling mechanisms and flux enhancement. **Chemical Engineering Research & Design**, 75, (A1), 3-8.
- GANCEL A.L., ALTER P., DHUIQUE-MAYER C., RUALES NAJERA J., VAILLANT F. (2008). Identifying Carotenoids and Phenolic Compounds In Naranjilla (*Solanum quitoense* Lam. var. Puyo hybrid), a Biodiverse Andean Fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 11890-11899.
- GIRARD, B.; FUKUMOTO, L. R. (2000) Membrane processing of fruit juices and beverages: A review. **Critical Reviews in Biotechnology**, 20, (2), 109-175.
- GUADIX, A.; SORENSEN, E.; PARAGEORGIU, L.; GADIX, E. (2004) Optimal design operation of continuous ultrafiltration plants. **Journal of Membrane science**, 235, 131-138.
- GUILLON, M. (2009) Membranes de filtration: plus de résistance, moins de colmatage. **Process Alimentaire**, 155p.
- HAJIPOUR, M.; SOLTANIEH, M.; YAZDANSHENAS, M. (2010) Investigation of membrane fouling in cross flow microfiltration of non-alcoholic beer and modeling of tubular membrane low. **Desalination**, 251, (1-3), 20-28.
- HARBERT, A C.; BORGES, C. P. E NOBREGA, R. (2003) Processos de separação com membranas, Escola piloto em engenharia química, Programa de Engenharia química, Rio de Janeiro - COPPE/UFRJ, v2, 31p.
- HIGBY, W.K. A (1962) simplified method for determination of some the carotenoid distribution in natural and carotene-fortified orange juice. **Journal of Food Science**, 27, 42-49.
- HUMPHREY.J.L.; KELLER II, G. E. (2003) Procédés de séparation : techniques, sélection, dimensionnement. Dunod. Paris, 356p.
- KEMPER, T. G. (2005) Oil extraction. (Ed.) Bailey's Industrial oil and fat product. Vol. 5, 6th edn., p.1. John Wiley & Sons, New York.

- KRAWCZYĆ, H.; PERSSON, T.; ANDERSSON, A.; JONSSON, A.-S. (2008) Isolation of hemicelluloses from baley husks. **Food and bioproducts processing**, 86, 31 – 36.
- KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, 26, 459-516.
- KRSTIĆ, D.M.; TEKIAĆ, M.N.; ZAVARGO, Z.Z.; DJURIAĆ, M.S. and Āiriac, G.M. (2004) Saving water in a volume-decreasing diafiltration process. **Desalination**, 165, 283– 288.
- KUBO, I., OCHI, M., VIEIRA, P.C., KOMATSU, S. (1993) Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **J. Agric. Food Chem.**, 41, 6, 1012–1015.
- LANDRUMA, J.T., BONEB, R.A. (2001) Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385, 1, 28-40.
- LAORKO, A.; LI, Z. Y.; TONGCHITPAKDEE, S.; CHANTACHUM, S.; YOURAVONG, W. (2010) Effect of membrane property and operating conditions on phytochemical properties and permeate flux during clarification of pineapple juice. **Journal of Food Engineering**, 100, 3, 514-521.
- LAUTIÉ, E., DORNIER M., SOUZA FILHO M.S.M. de, REYNES M. (2001) Les produits de l'anacardier : caractéristiques, voies de valorisation et marchés. **Fruits**, 54, 4, 235-248.
- LEITE, L. A. de S.; PAULA PESSOA, P. F. A. de. (2002) Aspectos Socioeconômicos. In: BARROS, L. de M. (Ed.). *Caju Produção: aspectos técnicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 15-17.
- LI, M.; ZHAO, Y.; ZHOU, S.; XING, W. (2010) Clarification of raw rice wine by ceramic microfiltration membranes and membrane fouling analysis. **Desalination**, 256, (1-3), 166-173.
- LIMA, V. P. M. S. (1988) *A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil. 486 p.
- LIPNIZKII, F. (2002) Concepts of industrial-scale diafiltration systems, *Desalination*, 144: 179-184.
- LISBOA, E. F. A. (2000) *Uma Abordagem Multi-escala para o cálculo da permeabilidade longitudinal de meios porosos fibrosos randômicos* Rio de Janeiro COPPE/UFRJ, **Dissertação de mestrado**.
- MATTA, V. M. (1999) *Estudo dos processos de separação por membranas para obtenção de suco de acerola clarificado e concentrado*. Campinas. UNICAMP/FEA. **Tese de doutorado**.
- MATTA, V. M.; MORETTI, R. H.; CABRAL, L. M. C. (2004) Microfiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of acerola juice. **Journal of Food Engineering**, 61, 3, 477-482.
- MAUREL, A. (2009) *Techniques séparatives à membranes : considérations théoriques*. **Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés**. J 2790-1 - J 2790-23.
- MEIRELES, M.A.A. (2006) *Processo de extração e processo de purificação em serie de substancias ativas e corantes a partir de matrizes solidas, utilizando CO2 supercrítico: bixina proveniente do urucum*. PI0605425-0 A2. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP (BR/SP) .
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ J.A., BRITTON G., VICARIO M.I., HEREDIA J.F. (2005). Identification of zeinoxanthin in orange juices. **Journal of agricultural and food chemistry**, 53, 6362-6367.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ J.A., VICARIO I.M., HEREDIA F.J. (2007): Review: Analysis of carotenoids in orange juice. **Journal of Food composition and analysis**, 20, 638-649.

- MERCADANTE A.Z., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B, BRITTON G. (1997), HPLC and Mass spectrometric analysis of carotenoids from Mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 120-123.
- MESTRES, L.M., SOUQUET, J-M., FULCRAND, H., MEUDEC, E., REYNES, M., BRILLOUET, J-M. (2009) Characterisation of highly polymerised prodelphinidins from skin and flesh of four cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) genotypes. **Food Chemistry**, 114, 989 – 995.
- MILLER, N.J., SAMPSON, J., CANDEIAS, L.P., BRANLEY, P.M. & RICE-EVANS, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. **FEBS Letters**, 384, 240-246.
- MONTGOMERY, D.; CALADO, V. (2003) Planejamento de experimentos Usando o Statistica. E-Papers Serviços Editoriais. Rio de Janeiro, 260p.
- MORESI, M. & LO PRESTI S. (2004) Present and potential applications of membrane processing in the food industry. **Italian Food and Beverage Technology**, XXXVI, p. 11 – 33.
- MOURA, C.F.H. (2002) Pos colheita de caju. - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. **Tese de Doutorado**.
- MULDER M.H.V. (1995) Polarization phenomena and membrane fouling. In: Membrane separations technology: principles and applications. Amsterdam: Elsevier. 2, 45 – 84.
- MULDER, M. H.V. (1991) Basic Principles of Membrane Technology. Kluwer Academic Publishers, 363p.
- OLIVEIRA, V H. de. (2008) Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 30, 1-3.
- PAIVA, J.R. & BARROS, L. M. (2004) Clones de cajueiro: obtenção, características e perspectivas - Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 26p. Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 82p.
- PALLET, D. (2005). Applications des technologies membranaires aux traitements de jus de fruits brésiliens, **Cahiers Agricultures**, 14.
- PHILIP, T.; CHEN, T.-S. & NELSON, D. (1988) B. Liquid chromatography profiles of major carotenoid esters in commercially processed California navel and orange juice concentrates. **J. Chromatography**, 442, 249-265.
- PORTER, M. C. (1990) Handbook of industrial membrane technology. Westwood: Noyes P. 604p.
- RAMEL, F., BIRTIC, S., CUINE, S., TRIANTAPHYLIDES, RAVANA, J.L. & HAVAUX, M. (2012). Chemical quenching of singlet oxygen by carotenoids in plants. **Plant physiology Preview**, DOI/101104/pp.111.182394.
- RAO A.V.; RAO L.G. (2007), Carotenoids and human health. **Pharmacological Research and Nutritional Pharmacology**, 55, (3): 207 – 216.
- REKTOR, A.; VATAI, G. (2004) Application of membrane filtration methods for must processing and preservation. **Desalination**, 162, 271-277.
- REKTOR, A.; VATAI, G.; BEKASSY-MOLNAR, E. (2006) Multi-step membrane processes for the concentration of grape juice. **Desalination**, 191, 1-3, 446-453.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. (2005) Planejamento de experimentos e otimização de processos – Uma estratégia seqüencial de planejamento. Casa do Pão Editora. Campinas / SP.
- RODRIGUES, R. B. (2002) Aplicação dos processo de separação por membranas para produção de suco clarificado e concentrado de camu-camu (*Myrciaria dúbia*). Campinas. Unicamp/FEA. **Tese de doutorado**.
- RODRIGUEZ-AMAYA D. (1999). Latin American food source of carotenoids. **Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutricion**, 49 (1).

- RODRIGUEZ-AMAYA, D (2001). A guide to carotenoids analysis in foods. OMNI research, Washington, 1-59.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; AMAYA-FARFAN, J. (2009) Fontes Brasileiras de Carotenóides. Tabela Brasileira de Composição de Carotenóides em Alimentos. Ministério do Meio Ambiente. Documentos, 99p.
- ROSENTHAL, A.; PYLE, D.L.; NIRANJAN, K. (1996) Aqueous and enzymatic processes for edible oil extraction. *Enzyme Microbiology Technology*, Atlanta, 19, 6, 402 - 420.
- SCHMITZ, P.; WANDEL, B.; HOUI, D.; HILDENBRAND, M. (1993) Particle aggregation at the membrane surface in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, 84, 1-2, 171-183.
- SILVA NETO, R. M. (2003) Cajuína: Como produzir com qualidade. Teresina: SEBRAE / PI.
- SORO, D. ; ABREU, F.A.P. ; ASSIDJO E. ; YAO, B. ; DORNIER, M.; REYNES M. (2011) The cashew (*Anacardium occidentale*, L.) industry in Ivory Coast – Analysis and prospects for développement. *Fruits*, 66, 4, 9.
- THANE, C.; REDDY, S. (1997) Processing of fruit and vegetables: effect on carotenoids. *Nutrition & Food Science*, 2, 58-65.
- VAILLANT F. (2000), Clarification et concentration de jus de fruits tropicaux pulpeux associant traitements enzymatiques, microfiltration tangentielle et évaporation osmotique, p5-29. **Thèse de doctorat**.
- VAILLANT, F.; CISSE, M.; CHAVERRI, M.; PEREZ, A.; DORNIER, M.; VIQUEZ, F.; DHUIQUE-MAYER, C. (2005) Clarification and concentration of melon juice using membrane processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, (2), 213-220.
- VAILLANT, F.; MILLA, A.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. (2001) Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 48, 83 – 90.
- VAILLANT, F.; MILLAN, P.; O'BRIEN, G.; DORNIER, M.; DECLoux, M.; REYNES, M. (1999) Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 42, (4), 215-224.
- VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; ACOSTA, O.; DORNIER, M. (2008) Turbidity of pulpy fruit juice: A key factor for predicting cross-flow microfiltration performance. *Journal of Membrane Science*, 325, (1), 404-412.
- VENTURINI, W.G.F. (1999) Microfiltração tangencial de suco de laranja. Relatório de pesquisa de Pós-doutorado. Universidade de Montpellier II / École National Supérieure des Industries Agroalimentaires - ENSIA. 99 p. Montpellier.
- WATANABE, A. P.; USHIKUBO, F. Y.; VIOTTO, L. A. (2006) Evaluation of permeate flux in microfiltration of Tamarind (*Tamarindus indica* L.) juice using polypropylene membrane. *Desalination*, 200, (1-3), 337-338.
- YEE, K.; WILEY, D. E.; BAOB, J. (2007) Whey protein concentrate production by continuous ultrafiltration: Operability under constant operating conditions. *Journal of Membrane Science*, 290, 125–137.
- ZEMAN, L.J. and ZYDNEY, A.L. (1996) Microfiltration and Ultrafiltration: Principles and applications.
- ZEPKA, L. Q.; MERCADANTE, A.Z. (2009) Degradation compounds of carotenoids formed during heating of a simulated cashew apple juice. *Food Chemistry*, 117, 1, 28-34.

**\*Sites Internet:**

EMBRAPA: [www.cnpat.embrapa.br/ceinfo/cashew](http://www.cnpat.embrapa.br/ceinfo/cashew): (Brazilian data of cashew production / cashew industry / cashew socio economy). Accessed in April 2012.

<http://www.pall.com/main/Food-and-Beverage/Product.page?id=41052> (Installation and operating Procedures - Pall® Membralox® Ceramic Membranes and Modules. Chapitre VI: Cycles de nettoyage et stérilisation – Manuel de l'utilisateur Membralox). 4p. Downloaded in April 2011.

FAO - FAOSTAT Statistical Databases for agriculture. <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>. Accessed in 26/04/2012.

MARZ, U. The Global market of carotenoids - Industry Research Report 2011. BCC research (in: <http://www.bccresearch.com>) - accessed in 21/02/2012.

IBGE – Brazilian Institute of Geography and Statistics (2009). Cashew production in Brazil. <http://www.ibge.gov.br>. Accessed in September 2011.

<http://www.wipo.int/pctdb/en/> (PATENTSCOP). International data basis for patents search.

Rapport-Gratuit.com

## ANNEXES

## **ANNEXE 1 : PATENTE DE INVENÇÃO**

Relatório Descritivo de Patente de Invenção: **“PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE EXTRATO OBTIDO A PARTIR DE RESÍDUOS DE PSEUDOFRUTO DE CAJU E PRODUTO DE ELEVADO TEOR DE CAROTENOIDES”**.

### CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção se situa no campo de processos industriais para a extração e purificação de moléculas de interesse comercial, versando sobre a produção de extratos contendo carotenoides e outras substâncias de interesse a partir de resíduos do processamento de caju por meio de técnicas que envolvem prensagem, opcionalmente maceração enzimática e filtração (micro ou ultrafiltração), bem como diafiltração. O processo proposto pela tecnologia desenvolvida permite a produção de um extrato corante amarelo, produto que pode ser obtido a partir do resíduo industrial da produção de suco de caju em larga escala. Desta forma, este extrato concentrado e purificado de carotenoides do caju representa uma agregação de valor a um subproduto que todo o setor de alimentos necessita para suprir as demandas mundiais de corantes naturais. Geralmente, os corante amarelos usados no Brasil são de origem sintética e os amarelos naturais disponíveis apresentam uma coloração alaranjada, diferentemente do obtido por meio da presente tecnologia, que é amarelo brilhante claro, devido a sua composição de xantofilas, de coloração amarelo-claro predominantes.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Processos industriais para a extração e purificação de moléculas de interesse comercial, seja como corante, antioxidante ou como uma molécula de propriedades específicas para aplicação na alimentação e dieta humana têm sido alvo de inúmeros trabalhos em nível científico-acadêmico bem como de solicitações de pedidos de patentes em todo o mundo.

O documento de patente PI 0002359-0 aborda um processo de evaporação em alto vácuo e destilação para a extração e concentração de vitaminas e provitaminas lipossolúveis, dentre estas os carotenoides, a partir de materiais originados como subprodutos da industrialização de produtos vegetais e animais. Este documento do estado da técnica descreve um processo para a concentração de substâncias

insaponificáveis, contendo vitaminas lipossolúveis e provitaminas, fatores de crescimento e hormônios vegetais e animais, denominados "produtos de valor", obtidos a partir de produtos de origem animal ou vegetal, ou de resíduos da industrialização destes mesmos produtos, sem a necessidade de solventes. O processo compreende a  
5 extração e concentração dos denominados produtos por meio de evaporação/destilação, e, também a produção de ácidos graxos e outros ácidos orgânicos de alta qualidade, por meio da hidrólise dos resíduos obtidos da destilação/evaporação.

O documento de patente PI 0507797-4 descreve um processo e equipamento para diafiltração de sucos de fruta espessados. O produto a ser filtrado é submetido a um  
10 processo de filtração. É adicionado um primeiro fluxo de um fluido de lavagem (água) e um segundo fluxo de um permeato próprio do produto (fluxo conduzido de volta pelos meios de filtração utilizados), assim o fluxo de produto, antes da entrada no sistema de membranas é diluído pelo primeiro e segundo fluxos.

O documento de patente WO 2004094350 também descreve um método para  
15 extrair carotenoides de materiais vegetais utilizando extração com fluido supercrítico. Neste documento a extração com fluido supercrítico se processa em duas etapas. O primeiro extrato inclui a obtenção de  $\beta$ -caroteno; o segundo extrato pode ter uma concentração controlada de  $\beta$ -caroteno e inclui ainda quantidades substanciais de luteína.

Este processo (WO 2004094350) possui diferenças significativas do processo  
20 apresentado pela presente invenção, o qual não inclui nenhuma etapa com aquecimento nem criogenia, bem como se trata de uma massa de resíduo industrial fibroso oriundo da prensagem de pedúnculos de caju, não sofrendo, no entanto, nenhuma trituração e/ou inativação enzimática. O processo apresentado aborda de uma sequência de operações e  
25 processos unitários que, em conjunto visam à concentração e purificação de um extrato enriquecido em carotenoides sob condições brandas e que maximizem o rendimento e pureza do produto final. Por outro lado, o pedido de patente em análise trata da obtenção de um extrato purificado de carotenoides a partir da cenoura e outros legumes e frutas triturados e termicamente tratados para branqueamento. Neste caso é  
30 reivindicado um conjunto de operações e processos para a obtenção de uma massa enriquecida em carotenoides, principalmente o betacaroteno, fazendo-se inicialmente

um aquecimento para a inativação enzimática (branqueamento), seguido de triturações sucessivas em diferentes malhas para se obter uma massa de fina granulometria para ser em seguida tratada por liquefação enzimática e liberação dos carotenoides em meio aquoso. Na fase seguinte essa massa é tratada em membranas para uma pré-concentração e então filtrada com um ou dois volumes e água para eliminação de compostos hidrossolúveis. Ao final desta etapa de diafiltração a massa resultante é congelada e imediatamente descongelada para a concentração final dos carotenoides e a massa final é tratada por pasteurização flash para adquirir estabilidade microbiológica e bioquímica.

Assim, diferentemente da presente invenção, é descrito no documento em referência um sistema de trituração do material vegetal, tratando-o de forma agressiva ao conteúdo de interesse, salientando-se que os carotenoides são altamente sensíveis a temperaturas acima de 65 °C, mesmo em pH baixo como é indicado na descrição do mesmo. Além disso, diferentemente do mesmo documento, o presente pedido de patente não inclui aquecimento acima desta temperatura em nenhuma das etapas do processo em geral, visto que este procedimento degrada significativamente as moléculas de carotenoides e promove uma perda de qualidade do produto. Ademais, não há a necessidade no processo da presente invenção de uma crio-concentração, pois, o processo proposto pela presente invenção, que envolve a etapa de filtração em membranas microporosas, promove uma redução do volume em até 30 vezes, sendo, portanto, mais eficiente.

Similarmente, o documento de patente PI 0605425-0 descreve um processo de extração e purificação em série de substâncias ativas e com capacidade corante a partir de matrizes sólidas utilizando extração supercrítica com CO<sub>2</sub> para a produção de corantes a partir da bixina do urucum. O referido processo usa etapas de extração e purificação com uso de colunas de eluição e adsorção com extrator e fracionador montados em série e podendo ser utilizado em série ou em bateladas. Este processo usa solução aquosa como solvente, que ao final do processo é evaporado a temperaturas entre 30 e 700°C visando não degradar a bixina.

A recuperação de carotenoides mistos a partir de microalgas (*Dunaliella salina*) é descrito no documento de patente WO 98/28082. Neste documento é apresentado um

processo onde as células colhidas são rompidas, circulando a suspensão de algas em altas pressões através de bombeamento vigoroso. As células podem ser desidratadas por meio de técnicas de absorção de bolha de separação, incluindo um circuito de flotação, que tem uma zona de desbaste e uma zona de concentração. Se uma maior concentração

5 de carotenoides é requerida, o concentrado de algas pode ser filtrado em uma unidade de microfiltração em fluxo tangencial, na ausência de agentes flocculantes sem perdas de carotenoides no permeado.

O documento de patente PI 0006126-3 apresenta um processo de extração de carotenoides e outros antioxidantes a partir de tecidos vegetais previamente esmagados e incubados. As moléculas de interesse são recuperadas através de operações de

10 precipitação e de tratamentos térmicos, principalmente aquecimento seguido de resfriamento rápido; dessa forma um extrato contendo carotenoides é recuperado na forma de um precipitado.

O documento de patente PI 0416795-3 tem como objeto um processo integrado

15 para a extração e purificação de tocoferóis, carotenoides e esteróis a partir de óleos vegetais através do uso de processos de esterificação alcoólica. O relatório da referida patente relata como uma das vantagens de uso deste processo a obtenção de um produto enriquecido e purificado, com ausência de fatores de decomposição substancial destes componentes de interesse, como são os açúcares que são eliminados na diálise.

Além dos documentos citados, o documento de patente PI 0103885-0 tem como

20 objeto a produção de um extrato de bagaço de caju rico em pigmento, obtido por um processo compreendendo a umidificação do bagaço de caju residual da extração do suco, a prensagem da mistura resultante, a separação do extrato dos sólidos e concentração do mesmo por meio de operações de centrifugação e filtração.

O presente pedido de proteção representa um desenvolvimento da técnica

25 apresentada no PI 0103885-0, de titularidade e autoria comuns ao presente, agregando-o com etapas essenciais à obtenção de um produto com mais qualidade e empregando tecnologias que permitem uma otimização contínua em seu processamento.

Dessa forma, ao contrário dos documentos do estado da técnica o presente

30 desenvolvimento procura complementar a produção de um extrato bruto obtido a partir de resíduos de caju com novas tecnologias de processamento que envolvem a junção

das etapas de prensagem, maceração enzimática e técnicas de filtração empregando membranas em etapas sequenciais específicas, para a produção de um extrato final concentrado e purificado apto ao emprego industrial e a partir do qual são isoladas diversas substâncias de interesse comercial, desde corantes a suplementos alimentares.

5 Além disso, o estado da técnica não apresenta uma solução equivalente para o processamento de extratos brutos de resíduos de caju e falha em descrever um processo sinérgico, tal como o apresentado pela presente invenção, em que o extrato de fruta ou resíduo passa por pré-tratamentos integrados, tal com a prensagem e maceração enzimática visando otimizar a obtenção de compostos de interesse ao final do processo  
10 associados aos processos de filtração e diafiltração finais, que geram um produto de pureza elevada.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um processo para concentração e purificação de extratos de carotenoides a partir das fibras de pedúnculos de caju para uso como corante  
15 natural amarelo com uso de membranas de microfiltração e diafiltração. O processo proposto ocorre sob condições controladas sem uso de qualquer solvente orgânico, envolvendo, opcionalmente, a pré-maceração das fibras de caju com uso de enzimas desagregadoras de estruturas celulares (pectinase, amilase e celulase), que atuam sobre os tecidos fibrosos em combinação com prensagens controladas em ciclos sucessivos de  
20 extração aquosa. A concentração do extrato bruto obtido por maceração/prensagem é realizada à temperatura ambiente com uso de membranas cerâmicas de micro e/ou ultrafiltração em fluxo tangencial. O produto concentrado é então tratado por técnicas de diálise em membranas (diafiltração), eliminando-se grande parte dos componentes indesejáveis e que favorecem sua deterioração. O produto concentrado final possui  
25 potencial de aplicação como corante para alimentos de consumo humano e ração animal, sendo aplicável nas áreas de sucos e bebidas prontas para o consumo devido à considerável solubilidade em água. Estima-se, baseando-se nas propriedades de alguns carotenoides presentes no extrato final concentrado e purificado, que este material possui um potencial de aplicabilidade na área de suplementos alimentares como  
30 provitamina A e antioxidantes para as indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

## BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: apresenta esquematicamente as etapas gerais do processo em um fluxograma.

Os símbolos alfanuméricos nela dispostos possuem a seguinte correspondência:

- 5 E0: fibras residuais do processamento de pedúnculos de caju;  
A: prensagem;  
M1: adição de enzimas para maceração do extrato a ser prensado (opcional);  
E1: extrato aquoso bruto intermediário;  
B: peneiramento;  
10 E2: extrato aquoso bruto;  
C: filtração em membranas porosas de micro e/ou ultrafiltração e diálise;  
e  
E3: extrato final concentrado e purificado.

Figura 2: apresenta esquematicamente as etapas gerais do processo em um fluxograma com ênfase na etapa otimizada de prensagem. Os símbolos alfanuméricos nela dispostos possuem a seguinte correspondência:

- M0: massa de fibras de caju para a produção de suco;  
A0: prensagem para produção de suco;  
S0: suco integral produzido;  
20 E0: fibras residuais do processamento de pedúnculos de caju;  
M: Maceração enzimática (opcional);  
M1: adição de enzimas para maceração do extrato a ser prensado (opcional);  
A: etapa de prensagem do extrato E0;  
25 A1; A2; A3; A4; A5 e A6: ciclos de prensagem do extrato E0;  
F1; F2; F3; F4; F5 e F6: fibras residuais de cada ciclo de prensagem;  
S1; S2; S3; S4; S5 e S6: extrato aquoso de cada ciclo de prensagem;  
E1: extrato aquoso bruto intermediário;  
B: peneiramento;  
30 E2: extrato aquoso bruto;

C: filtração em membranas porosas de micro e/ou ultrafiltração e diálise;  
e

E3: extrato final concentrado e purificado.

5 Figura 3: representação esquemática de uma prensa helicoidal. Os símbolos alfanuméricos nela dispostos possuem a seguinte correspondência:

E0: fibras residuais do processamento de pedúnculos de caju;

R: saídas de fibras residuais de cada ciclo de prensagem;

E1: extrato aquoso bruto intermediário;

10 V: controle da velocidade de rotação; e

F: controle da força aplicada.

Figura 4: apresenta um esquema da unidade piloto de operação da diafiltração por membranas. Os símbolos alfanuméricos nela dispostos possuem a seguinte correspondência:

15

1: solvente;

2: retido;

20 4A: tanque de alimentação;

5A; 5B; 5C e 5D: unidades do sistema de membranas;

3A; 3B; 3C e 3D: saídas de permeado; e

25

4B: tanque de recolhimento do permeado.

Figura 5: apresenta um esquema da unidade piloto de operação da diafiltração por membrana com detalhes para os equipamentos que a compõe. Os símbolos alfanuméricos nela dispostos possuem a seguinte correspondência:

30

3A; 3B; 3C e 3D: saídas de permeado;

- 4A: tanque de alimentação;  
5A; 5B; 5C e 5D: unidades do sistema de membranas;  
6A: entrada de fluido do trocador de calor;  
5 6B: saída de fluido do trocador de calor;  
7A; 7B e 7C: manômetros;  
8: termômetro;  
9A: válvula de purga;  
9B: válvula de controle da pressão transmembranar;  
10 10: trocador de calor; e  
11: bomba.

Figura 6: gráfico do fluxo de permeado ( $L.h^{-1}.m^{-2}$ ) em função do fator de redução volumétrica para diferente pressões transmembranares ( $P_{tm}$ ).

15 Figura 7: gráfico do fluxo de permeado ( $L.h^{-1}.m^{-2}$ ) em função do fator de concentração para duas diferente situações – com e sem a adição de pectinases – durante toda a etapa de concentração (filtração em membranas porosas de micro e/ou ultrafiltração e diálise).

Figura 8: apresenta quatro gráficos, sendo (8-I) a evolução do fator de redução volumétrica (FRV), (8-II) o diavolume reduzido (DR), (8-III) a densidade do fluxo de permeado (FP) e (8-IV) o teor de sólidos solúveis (TSS), respectivamente, em função de  
20 tempo, no processo de concentração do extrato E2 para duas diferentes situações – com e sem a adição de pectinases.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 O presente pedido de patente de invenção se distingue do estado da técnica por meio da proposição de um processo que acopla procedimentos de concentração e purificação por diafiltração às técnicas usuais de obtenção de extrato purificado a partir de extratos brutos de fibras de caju.

O presente processo permite a produção em escala industrial de um líquido viscoso de coloração amarelo-intenso para usos diversos, tais como corante e  
30 antioxidante natural nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica.

O processo objeto deste pedido de patente consta de um conjunto de operações que visam à obtenção de um concentrado de carotenos e xantofilas, destacando-se a auroxantina na forma *cis* e *trans*, a  $\beta$ -criptoxantina, mutatoxantina e a zeaxantina. O  $\beta$ -caroteno e luteína vêm em seguida como de maior importância, possuindo, no entanto  
5 uma composição rica em diversos outros carotenoides.

O processo proposto compreende as seguintes etapas, correspondentes às indicações presentes na Figura 1:

A) Obtenção de um extrato aquoso bruto de carotenoides, E1, a partir das fibras residuais do processamento de pedúnculos de caju, E0, por meio de prensagem.

10 Nessa etapa, o tratamento enzimático é opcional, pode ocorrer por meio da adição de enzimas desagregadoras de estruturas celulares (pectinases, amilases e celulases) (M1);

B) Peneiramento do extrato bruto intermediário obtido (E1) visando uma padronização inicial para se evitar problemas de aumento excessivo de viscosidade nas fases finais do processamento com membranas, assim é obtido o extrato bruto E2;

15

C) Concentração do extrato bruto então obtido, E2, por meio de técnicas de microfiltração em membranas porosas, atingindo-se valores de fator de concentração entre 2 e 30 vezes; e subsequente eliminação do extrato seco solúvel (açúcares, minerais e vitaminas hidrossolúveis) contido no extrato concentrado através de um processo de diálise em membranas porosas de micro ou ultrafiltração, aumentando-se dessa forma a pureza dos carotenoides presentes promovendo estabilidade microbiológica e bioquímica. O produto resultante de (C) é o extrato final concentrado E3.

20

25

Considerando-se que o pH do extrato bruto (E2) já se encontra em uma faixa entre 3,5 e 5,0 não há necessidade de uma correção deste valor para se proporcionar uma maior estabilidade dos carotenoides presentes no extrato final concentrado e purificado.

A primeira etapa do processo (A) de obtenção do extrato bruto se baseia na  
30 otimização do processo proposto pelo documento de patente brasileiro PI 0103885-0. Dessa forma o desenvolvimento tecnológico descrito envolve o uso deste extrato para a operação/processo de concentração e purificação visando à obtenção de um produto com altas concentrações de carotenoides.

30

Antes do início do processo, os cajus são colhidos e levados para uma área de  
35 recepção da unidade processadora, sendo de imediato retiradas as castanhas, separando-

se os pedúnculos que são selecionados e lavados para a retirada de sujidades e componentes indesejáveis ao processamento de suco.

Em seguida os pedúnculos são diretamente prensados em prensas do tipo expeller, ou helicoidal, típicas do processamento de suco de caju e cajuína em unidades processadoras do Nordeste brasileiro. Nesta etapa são gerados cerca de 80% de suco integral e 20% de fibras residuais, conforme descrito em PI 0103885-0. Estas fibras (E0) são então umidificadas na proporção de uma a duas partes de fibras para cada parte de água para serem prensadas.

Posteriormente, inicia-se o processo proposto pela presente tecnologia, tem-se a etapa (A), que se refere à série de prensagens sob E0 para obtenção do extrato intermediário (E2). Nessa etapa podem ou não ser adicionadas enzimas comerciais com atividades pectinolíticas, amilolíticas e celulolíticas para aumentar o rendimento da prensagem, se necessário. A adição de enzimas pode ser de até 0,5% sobre a massa de fibras, usualmente o valor empregado é de 0,2%.

Após obtido um extrato bruto E2, esse é levado à etapa (B), onde é tratado em peneiras com abertura de furos entre 0,1 e 1,0 mm, visando uma padronização inicial para se evitar problemas de aumento excessivo de viscosidade nas fases finais do processamento com membranas.

O processamento do extrato bruto por filtração em membranas microporosas é então efetuado em (C) visando-se inicialmente à redução da água que foi adicionada para a extração assistida por enzimas na fase anterior, caso esta tenha ocorrido. Posteriormente, a etapa (C) se processa em fases distintas: uma primeira fase (C1) em que o volume do tanque de alimentação (1A) é mantido constante até que a concentração do extrato bruto atinja valores de FCV (fator de concentração volumétrica) entre 2 e 30 ou até o esgotamento do volume de extrato bruto a ser adicionado, iniciando-se neste momento uma fase (C2) de concentração com redução máxima do volume de extrato concentrado no interior do sistema de recirculação, aqui denominado retido, até o limite mínimo de recirculação no conjunto de membranas. Nesta situação deve-se evitar a aeração do retido mantendo-se um volume que não permita a aeração pela bomba de recirculação. Assim, é promovida uma pré-concentração a frio, usando a tecnologia de filtração em membranas microporosas em

óxido de alumínio, ou simplesmente alumina, podendo eventualmente ser empregados outros materiais. Estas membranas possuem a capacidade de retenção total dos carotenoides e outras moléculas hidrofóbicas e devido a esta característica são empregadas como meio de retenção dos carotenoides contidos no extrato.

5 Assim, nesta última etapa (C), posteriormente à C1 e C2, onde ocorre uma fase inicial de pré-concentração, aumentando o fator de concentração até uma recirculação no sistema no limite mínimo do tanque de alimentação da unidade de microfiltração, é então processada uma fase C3, na qual ocorre a purificação do extrato concentrado obtido após C1 e C2 com a execução do processo de diálise em membranas de  
10 microfiltração.

Assim, o retido ao final de (C2) é submetido à diálise (C3) com o volume de água pura (diavolume) adicionado até se atingir um teor de sólidos solúveis (°Brix) desejado.

Toda a operação é efetuada sob condições de temperatura entre 10 e 50<sup>0</sup>C  
15 visando à manutenção das propriedades funcionais dos carotenoides que serão obtidos na forma de uma solução concentrada e purificada por diálise o final do processo.

Devido à presença de baixa concentração de açúcares fermentescíveis o produto obtido pode ser estocado em temperaturas de refrigeração para usos posteriores.

O produto final pode adicionalmente ser tratado termicamente para proporcionar  
20 uma maior durabilidade, porém é evitado ao longo de todo o processo o uso de calor, pois, este deteriora o conteúdo em carotenoides, modificando seu perfil de moléculas e conseqüentemente sua atividade pro-vitáminica e antioxidante. Por outro lado, ainda que seja tratado termicamente, o produto final possui alto poder de coloração para usos na área alimentícia e farmacêutica.

25 O concentrado de carotenoides obtido (E3) possui as características de ser um extrato aquoso, na forma de uma emulsão de coloração amarelo brilhante e que possui capacidade de coloração de sucos de tonalidade amarela e amarelo-alaranjado para uso em alimentos e bebidas. Dessa forma o produto pode ser empregado como corante alimentar natural amarelo; antioxidante natural na forma de cápsulas (nutracêutica);  
30 provitamina A e é possível ainda o fracionamento para isolar grupos de carotenoides com funções específicas.

Em relação à etapa (C) é importante caracterizar a unidade piloto de microfiltração tangencial, representada esquematicamente pelas Figuras 4 e 5, em que o solvente empregado é a água.

A unidade de microfiltração possui um conjunto de quatro membranas, preferencialmente de óxido de alumínio (Membralox<sup>®</sup>), podendo ser opcionalmente empregados outros tipos de membrana, não se limitando a concretização da invenção, portanto, a essa. Seu tanque de alimentação (4A) possui capacidade de 3L a 10L com quatro módulos dispostos em série, cada um contendo uma membrana cerâmica com uma área de filtração de 0,0001 a 0,0900 m<sup>2</sup>, preferencialmente de pelo menos 0,0055 m<sup>2</sup> e um diâmetro de poro de 0,01 µm a 0,5 µm, idealmente de 0,2 µm. As pressões das quatro seções de microfiltração são: P1 = 2,75 bar; P2 = 2,25 bar; P3 = 1,75 bar e P4 = 1,25 bar, podendo todas, bem como a pressão do sistema, variar de 0,5 a 10,0 bar. Com base nos dados apresentados, as concretizações da invenção envolvem redimensionamentos que se baseiam nos mesmos parâmetros utilizando o conceito base para tratar os volumes desejados de resíduos de pedúnculos de caju.

Uma bomba de cavidade progressiva (Moineau) de potência igual a pelo menos 1,0 CV, podendo ser maior ou menor em função da quantidade de material a ser processado, representada pelo item (11) da Figura 5, permite a pressurização do líquido e seu fluxo tangencial no sistema. A velocidade tangencial é fixada em um valor de 0,1 m.s<sup>-1</sup> a 20,0 m.s<sup>-1</sup> e o retido é continuamente circulado no sistema de filtração. O volume morto do sistema é calculado para 1,3 L para um tanque de alimentação com capacidade de 3 L, distribuídos nos elementos de construção (bombas, tubos, membranas e bandeja).

A unidade de microfiltração permite o controle de uma série de parâmetros, dentre eles: pressão transmembrana, temperatura geral do sistema, velocidade tangencial e, conforme exposto, a fase que envolve a diafiltração em si segue um modelo com três fases, equivalentes às etapas C1, C2 e C3 descritas anteriormente: (1) pré-concentração, a volume constante (C1); (2) concentração a volume variável (C2); e (3) diafiltração/purificação a volume constante (C3).

As condições gerais de processamento para a purificação de carotenoides a partir das fibras residuais do processamento do pedúnculo de caju

envolveram controles de diversos parâmetros operacionais. A temperatura foi controlada através de um trocador de calor (10), conforme indicado na Figura 5, instalado no circuito de recirculação do retido com uso de alimentação em uma camisa externa aos tubos inox com água fria ou quente visando à obtenção de uma estabilização da temperatura na faixa requerida, que é de 38 a 42°C. Para o caso de trabalhos com carotenoides, essa temperatura pode ser ainda ampliada para uma faixa que vai de 10 a 85°C, dependendo da finalidade que será dada ao produto final desejado. Baseando-se em rotas metabólicas de degradação de carotenoides, pode haver ainda o interesse em certas moléculas que são produtos de degradação e possuem atividade corante mais acentuada que em seu estado natural e, em outros casos, a necessidade de se manter íntegra a molécula. Dessa forma, de acordo com o produto alvo trabalha-se com temperaturas mais brandas ou mais elevadas. A Velocidade tangencial foi fixada por meio do controle da rotação do motor da bomba utilizada (11), também ilustrada na Figura 5, podendo ser controlada através do uso de inversores de frequência para um aumento ou diminuição desta velocidade em função da natureza do material trabalhado (mais viscoso ou menos viscoso). E a pressão transmembrana tem seu controle por meio de uma válvula de controle final da pressão de entrada (9A) e de saída do sistema piloto (9B), indicadas na Figura 5. Dependendo da resistência mecânica da membrana utilizada, pode-se usar maior ou menor velocidade do fluxo de retido, aumentando assim o arraste e conseqüentemente o processo de autolimpeza das superfícies de filtração, favorecendo um aumento do fluxo médio de permeado. No caso, é recomendada uma pressão transmembrana média no sistema de 1 a 5 bar, preferencialmente 2,7 bar devido as características do sistema e da bomba utilizada como promotora da força motriz, porém, essa pressão pode ser ajustada para outros valores conforme necessidade/capacidade do sistema de produção.

A opção pelo sistema diafiltração a volume constante foi estabelecida visando-se a otimização do uso da água como insumo de diálise (solvente). Como este recurso natural é escasso nas regiões produtoras de caju e o sistema apresentado promove um menor uso de água, tem-se um ganho de processo relevante. No entanto não se descarta o uso de sistemas de diafiltração a volume variável para o extrato de fibras de caju.

Dessa forma, é importante frisar que a tecnologia é viável em uma grande gama

de aplicações e equipamentos passíveis de utilização, bem como parâmetros de operação, não sendo estes, portanto, restritos aos apresentados nos exemplos e/ou descrições da presente invenção.

### EXEMPLOS

5           A presente invenção é adicionalmente explorada por meio dos exemplos a seguir.

#### **Exemplo 1 – Obtenção do extrato purificado de carotenoides.**

Foi obtido de um extrato aquoso bruto de carotenoides, representado na Figura 1 como E1, a partir das fibras residuais do processamento de pedúnculos de caju (E0) por meio  
10 de seis ciclos consecutivos de prensagem, conforme indicado nas Figuras 1 e 2 pela operação (A), que inclui a adição de pectinases, conforme explicitado na Figura 2 pela operação (M). A massa de fibras de caju (M0) foi adicionada de água (1:1 massa/massa) e submetida à prensagem em uma prensa modelo INCOMAP-300 (capacidade nominal de 300 Kg/h) para produção de suco, resultando no extrato bruto residual (E0) e no suco  
15 integral (S0). Posteriormente, as fibras residuais (E0) foram adicionadas de água e pectinases (500 mg.kg<sup>-1</sup> de pectinase Pectinex SP-L - Ultrazymes<sup>®</sup>) e o material homogeneizado. A temperatura foi mantida em valores de 50 a 55°C e a mesma prensa foi empregada (força de 2500N) para submeter o material a seis ciclos consecutivos de prensagem, com a reincorporação dos extratos (S1 a S5) e as massa de fibras (F1 a F6)  
20 obtidas em cada etapa (A1 a A6) da prensagem (A), conforme ilustrado pela Figura 2. A Figura 3 apresenta uma representação esquemática da prensa empregada.

Após a prensagem, uma emulsão de coloração amarela, devido à presença dos carotenoides, foi obtida. Essa emulsão foi filtrada em peneira de aço inoxidável de malha de 0,30 mm para a remoção de partículas suspensas. O extrato então obtido após  
25 o peneiramento, E2, é denominado extrato aquoso bruto, que foi armazenado sob refrigeração (-20°C) em embalagens de polietileno de baixa densidade para estocagem anteriormente ao processo de concentração (C).

A etapa posterior de concentração (C) empregar técnicas de microfiltração tangencial. Foi usado um sistema de quatro membranas MEMBRALOS-PALL, com área de  
30 filtração de 0,022 m<sup>2</sup> e diâmetro de poro de 0,2 µm, feitas de óxido de alumínio, sendo do tipo monotubular. A pressão do sistema foi de 2,75 bar, sendo a temperatura

controlada a 40°C (±2°C). O processo foi conduzido sob um fator de concentração igual a 13. A concentração por meio de técnicas de microfiltração em membranas microporosas foi realizada em três fases: uma primeira fase em que o volume do tanque de alimentação é mantido constante até o esgotamento do volume de extrato bruto, iniciando-se neste momento uma fase de concentração com redução máxima do volume de extrato concentrado no interior do sistema de recirculação, aqui denominado retido ou retido, até o limite mínimo de recirculação no conjunto de membranas; e a terceira fase em que ocorre a diálise em membranas microporosas de microfiltração com o volume de água pura adicionado até se atingir um teor de sólidos solúveis entre 20 e 30 °Brix.

O rendimento da operação partindo-se de 1000 kg pedúnculos de caju é de cerca de 30 a 40 kg de concentrado diafiltrado (E3).

Foram analisados, por meio de cromatografia líquida, os teores dos carotenoides totais do extrato intermediário bruto (E1) e do extrato concentrado final (E3), conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Conteúdo em carotenoides (mg.kg<sup>-1</sup>) no extrato bruto de fibras de caju (E1) obtido em seis ciclos consecutivos de prensagem e no extrato final concentrado (E3).

Carotenoides	Extrato Bruto (E1)	Extrato Concentrado (E3)
	Teor (µg.g <sup>-1</sup> )	Teor (µg.g <sup>-1</sup> )
Auroxantina ( <i>cis e trans</i> )	3,08	16,10
Mutatoxantina <i>trans</i>	0,62	2,50
Luteína	1,04	4,70
Mutatoxantina <i>cis</i>	1,25	6,30
Zeaxantina	1,10	5,60
<i>Cis</i> antheraxantina	0,20	0,80
β-Cryptoxantina	1,52	8,00
13- <i>cis</i> -β-caroteno	0,13	0,70
α-Caroteno	0,09	0,60
β-caroteno	0,52	2,50
<i>Outros</i>	0,85	6,40
<b>Carotenoides Totais</b>	<b>10,40</b>	<b>54,20</b>

\* *Análises em triplicata*

## **Exemplo 2 – Comparação entre a extração com e sem o uso de enzimas.**

Foram empregados lotes de 100 kg de fibra bruta (E0), que foram prensadas usando-se a prensa INCOMAP 300 em seis ciclos de prensagem. Os extratos foram submetidos a dois processos: o primeiro (I) com o uso de 500 mg.kg<sup>-1</sup> de pectinase comercial (Pectinex SP-L - Ultrazymes<sup>®</sup>) e o segundo (II) sem a adição de pectinase, mantendo as outras condições de funcionamento estabelecidas como as condições otimizadas proporcionadas pelo processo proposto pela presente invenção.

Em ambos os processos desse exemplo (I e II) foram empregados 20 litros de extrato bruto resultante da prensagem descrita, submetendo-os a três fases em (C): a pré-concentração com uma concentração decrescente de volume do tanque de alimentação e; uma etapa de diafiltração final. A diafiltração é iniciada quando o sistema atinge um volume mínimo de circulação do retido, a partir desse ponto o volume circulante é mantido constante até o final do processo. O sistema empregado possui um tanque de alimentação com capacidade total de 3,0 L.

Dessa forma, foi realizada inicialmente a pré-concentração com o volume do tanque de alimentação constante, onde o fator de concentração atingiu valores de cerca de 5,0 e procedida uma segunda fase de concentração com uma diminuição do volume do tanque para um volume mínimo possível, quando o fator de concentração atinge o seu valor máximo, mas sem danificar o conteúdo carotenoide. Depois de alcançar o fator de concentração máximo no sistema de microfiltração, é realizada uma fase final de purificação por diálise (diafiltração) do retido na condição limite do volume circulante, que é de cerca de 1,3 a 1,5 L na unidade piloto de microfiltração.

Em todas as fases do processo as condições de funcionamento adotadas foram: temperatura de alimentação do extrato em bruto de 40°C ( $\pm$  2), pressão transmembranar média de 2,75 bar ( $\pm$  0,3) e velocidade de 6,0 m.sec<sup>-1</sup>.

Neste exemplo é explicitado o parâmetro do tratamento da etapa (C). A metodologia utilizada consistiu de uma fase inicial de pré-concentração, aumentando o fator de concentração até uma recirculação no sistema no limite mínimo do tanque de alimentação da unidade piloto de microfiltração seguida da fase de purificação do extrato concentrado com a execução de diálise em membranas de microfiltração, conforme apresentado anteriormente. Além disso, a cada 10 minutos foram coletadas

amostras para análise do desempenho do processo global, recolhendo-se alíquotas de permeado e medindo os volumes em provetas graduadas de precisão submetendo-as a análises físico-químicas. Durante a fase de diálise (diafiltração), em cada amostragem de permeado foi realimentado um volume equivalente de água destilada para manter o teor de sólidos solúveis totais próximo de zero ao final do processo, de forma que possa ser promovido um aumento na pureza dos carotenóides presentes no concentrado final. Tanto para (I) como em (II), o processo global para a concentração e diálise dos 20 litros usados em cada um dos experimentos foi de cerca de 10 horas para cada ensaio. Este procedimento levou à obtenção de um extrato concentrado que pode atingir fatores de concentração da ordem de 20 a 30 vezes quando comparada ao volume inicial usado na fase de concentração, mantendo boas performances de fluxos de permeados mesmo quando se atingem altos valores de fator de redução de volume (FRV).

Além dos ensaios (I) e (II) foram realizados trabalhos intermediários nas fases experimentais envolvendo tratamentos com enzimas pectinolíticas, celulolíticas e amilolíticas com o intuito de se verificar o comportamento do processo quando o extrato passa ou não por um pré-tratamento para depois se realizar a operação de concentração. Os fluxos de permeados foram elevados em todos os tratamentos, no entanto, para os tratamentos com pectinase e amilase os valores foram mais significativos. Dessa forma, é recomendada a continuação dos trabalhos com a etapa de diafiltração (diálise em membranas microporosas) realizada com os tratamentos com uso de enzimas. Os fluxos de permeados nesta etapa mantiveram-se ainda nos mesmos patamares elevados, visto que a diafiltração consiste em se adicionar um solvente (no caso, foi adicionado água, embora outros solventes possam ser empregados) para se eliminar os componentes hidrossolúveis que possam vir a ocasionar problemas posteriores, tais como fermentações e interações químicas e bioquímicas com os componentes de interesse. Nesta etapa os fluxos de permeados ficaram na faixa de  $130 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  para os tratamentos com enzima e de  $80 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  para os tratamentos sem enzima.

A Tabela 2 apresenta uma média global de todos os parâmetros observados no processo de concentração e purificação por diafiltração do extrato aquoso rico em carotenóides obtidos a partir das fibras residuais de pedúnculos de caju do processamento do suco integral para (I) e (II).

Tabela 2 – Média global de todos os parâmetros observados no processo de concentração e purificação por diafiltração.

<b>Parâmetros do Processo e Principais Resultados</b>	<b>Contendo 500 mg.kg<sup>-1</sup> de pectinase (I)</b>	<b>Sem pectinase (II)</b>
Volume de alimentação (mL)	20.000,00	20.000,00
Volume do tanque de alimentação (mL)	3.000,00	3.000,00
Volume em diafiltração (mL)	1.320,00	1.170,00
Volume de água utilizada em diafiltração (mL)	5.889,20	5.552,60
Fluxo médio de permeado (L.h <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )	130,80	80,40
Fator de Redução Volumétrica – FRV	19,06	17,80
Extrato Seco Solúvel inicial (g.L <sup>-1</sup> )	52,00	52,00
Extrato seco Solúvel final (g.100 mL <sup>-1</sup> )	2,00	5,00
Matéria seca total inicial (g.L <sup>-1</sup> )	64,80	64,70
Matéria seca total final (g.L <sup>-1</sup> )	256,80	237,80
Matéria seca insolúvel inicial (g.L <sup>-1</sup> )	12,80	12,50
Matéria seca insolúvel final (g.L <sup>-1</sup> )	244,00	223,00
Carotenoides totais – inicial (g.L <sup>-1</sup> ) *	0,38 x10 <sup>-2</sup>	0,33x10 <sup>-2</sup>
Carotenoides totais – final (g.L <sup>-1</sup> ) *	0,73 x10 <sup>-1</sup>	0,53x10 <sup>-1</sup>

\* *Análises em triplicata*

5 Adicionalmente, as variações das características físico-químicas observadas no produto final da diafiltração (extrato concentrado final) empregando-se (I) são apresentadas resumidamente na Tabela 3. A partir dos resultados foi possível se atingir no extrato final (E3) concentrações de seus constituintes até 10 vezes maiores do que aquelas presentes no extrato bruto (E1). É possível observar ainda que a sinergia entre os processos otimizados de prensagem em conjunto com o emprego de enzimas mais o uso das técnicas de microfiltração foi positiva, pois, possibilitou um aumento de até 75% na concentração de carotenoides totais.

Tabela 3 – Características físico-químicas do extrato final obtido após a diafiltração (E3).

<b>Parâmetros físico-químicos</b>	<b>Valores</b>
Sólidos solúveis totais (g.100 mL <sup>-1</sup> )	0,5 a 1,5
Extrato seco total (g.L <sup>-1</sup> )	237,8 a 250,5
Extrato seco insolúvel (g.L <sup>-1</sup> )	223 a 260

Carotenoides totais (mg.L <sup>-1</sup> )	0,053 a 0,53
pH	4,5 a 4,7
Ácido ascórbico (g.100 mL <sup>-1</sup> )	Abaixo do limite detectável
Total de açúcares (g.100 mL <sup>-1</sup> )	0,2 a 1,3
Acidez titulável em % de ácido cítrico (g.100 mL <sup>-1</sup> )	1,26 a 1,78
Polifenóis totais em ácido tânico (mg.100 mL <sup>-1</sup> )	250 a 500

### Exemplo 3 – Aplicação do extrato purificado como corante.

Em termos de aplicação do extrato concentrado e purificado obtido ao final do processo descrito no **Exemplo 1**, é verificado que uma adição entre 0,5 a 3,0% do extrato concentrado a sucos e bebidas é suficiente para se atingir uma coloração amarela típica.

### Exemplo 4 – Estudos comparativos na etapa de concentração (C).

Durante a etapa final do processo de filtração (C) empregando membranas microporosas foram realizadas coletas do permeado no sistema sem a substituição da fonte de alimentação até o limite de operação do equipamento piloto, com cerca de 1,5 litros de volume mínimo possível. A partir deste ponto, foi iniciada a etapa de diafiltração (C3), foram então adicionados volumes de água (diavolumes), usando como parâmetro de controle o teor de sólidos solúveis (°Brix) a cada 10 minutos.

A conclusão do processo é indicada pelo controle de sólidos solúveis quando atinge um valor compreendido na faixa de 0 a 10,0 g.kg<sup>-1</sup>, indicando que os materiais solúveis em água (açúcares, sais minerais e vitaminas) foram eliminados pela operação de diafiltração. As amostras para análise foram coletadas em três etapas: o extrato bruto de alimentação, o permeado e o retido final.

As Figuras 4 e 5 apresentam um detalhamento da operação de diafiltração – etapa (C), em que o solvente é a água. A diafiltração, conforme exposta na Figura 2 foi realizada em três fases:

- Primeira fase: pré-concentração com o volume do tanque constante de 3,0 litros e retroalimentação de extrato bruto até a exaustão do volume total a ser purificado por diafiltração.
- Segunda fase: ocorre a interrupção na re-alimentação de extrato bruto. O volume do tanque cai até atingir o ponto máximo de concentração.

- Terceira fase: esta é a fase de diafiltração em si, quando o volume de cada filtrado (permeado) é coletado, sendo posteriormente o tanque reabastecido com o mesmo volume de água desmineralizada para alcançar um mínimo teor de sólidos solúveis (perto de zero) no retido final.

5

A amostragem do permeado foi realizada somente com a medição da densidade do fluxo de permeado. Desde o início da fase de diafiltração, foi utilizado um refratômetro ATAGO digital para medir o teor de sólidos solúveis totais (°Brix), monitorando-o para mantê-lo em um valor próximo de zero. Todos os materiais solúveis presentes no permeado foram eliminados, deixando apenas dentro do sistema de recirculação a porção insolúvel do extrato com água, e enriquecido com carotenoides.

10

A decisão de realizar a diafiltração apenas na fase final de concentração, é devido ao fato de que o consumo de água nessas condições pode ser importante para o projeto de uma fábrica em escala industrial. Nota-se que, nas condições de volume mínimo de retenção do tanque de alimentação, a diafiltração é processada mais rapidamente e muita atenção deve ser tomada quanto à aeração do produto que é manipulado em tais condições.

15

Durante esta fase, a extração do permeado foi compensada pela adição de água destilada a cada 10 minutos no tanque de alimentação. O teor de sólidos é o indicador de lavagem que é medido no permeado a cada extração. A diafiltração é interrompida quando este parâmetro atinge valores de 0 e 10  $\text{g.kg}^{-1}$  no permeado. Durante diafiltração, o volume de retido permanece constante e o FRV não se altera.

20

A etapa de concentração em si (anterior à promoção da diafiltração) é dividida em duas fases: a pré-concentração a volume constante do tanque, com realimentação do mesmo com o extrato bruto e uma segunda etapa, com o contínuo declínio no volume do extrato até o limite mínimo do tanque de alimentação da unidade piloto. O sistema normalmente opera a diafiltração considerando o insumo de fibras de caju no extrato obtendo-se um volume de cerca de 1.500 mL no final da etapa de concentração. Foi empregado um volume de pouco mais do que o limite mínimo de 1.000 mL na unidade

25

30

piloto para evitar contatos indesejados com o ar. Para cada uma das etapas é importante estabelecer o fator de redução volumétrica, conforme exposto a seguir.

**Etapa de pré-concentração:** para calcular o fator de redução volumétrica correspondente foi utilizada a razão entre o volume do extrato alimentado no circuito e o volume do retido. Durante esta fase, o volume da alimentação com o extrato bruto ( $V_A$ ) é igual ao volume de permeado ( $V_P$ ) em todo o processo. O volume de retido ( $V_R$ ) corresponde ao volume do tanque ( $V_B$ ). O FRV é, portanto, calculado da seguinte forma nesta fase:

10

$$\text{FRV} = 1 + V_P / V_B, \text{ onde}$$

$V_P$ : volume de permeado extraído a cada coleta de amostra (ml).

$V_B$ : volume do tanque de alimentação (ml).

15

No caso, o volume do tanque é fixado em 3.000 ml durante toda a fase de pré-concentração.

20

**Etapa de concentração:** durante esta fase, o volume do tanque varia e o volume de permeado é continuamente extraído a cada 10 minutos, mas esta extração não é compensada pela adição de extrato no tanque de alimentação. Assim, o volume de produto circulante diminui mais rapidamente e se concentra de um modo não-linear. Neste ponto, o cálculo das mudanças no FRV muda com relação à etapa de pré-concentração e é calculado considerando-se que o volume circulante diminui na mesma proporção em que o volume de permeado é coletado. Isso quer dizer que o volume circulante representa o volume inicial menos o volume colhido acumulado a cada coleta de permeado durante esta fase. A fórmula do cálculo para cada coleta de permeado nesta etapa é:

25

$$\text{FRV} = 1 + [ V_{PC} / (V_B - V_P) ], \text{ onde}$$

$V_{PC}$ : volume acumulado de permeado durante todo o processo (mL).

30

$V_B$ : volume do tanque de alimentação (mL).

$V_P$ : volume acumulado de permeado acumulado na fase de concentração (mL).

**Etapa de purificação (diálise):** durante esta fase, não há concentração e o volume do tanque permanece constante até o final de diálise, com um teor de sólidos solúveis de 0 a  $10,0 \text{ g.kg}^{-1}$ , medido por um refratômetro em cada amostragem de diavolumes durante a diafiltração. No final desta etapa, a manipulação deve ser finalizada e as amostras de

5 retido final coletadas para análise de controle e modelamento.

Como resultado das diversas análises realizadas durante os ensaios, a evolução do fluxo de permeado como uma função do fator de redução volumétrica durante a etapa de micro e diafiltração é apresentado no gráfico da Figura 6, sob diferentes pressões transmembranares.

10 Adicionalmente, conforme indicado no exemplo anterior e apresentado no gráfico da Figura 7, a amostra submetida ao pré-tratamento com enzima teve uma estabilização média em  $130 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  e sem o pré-tratamento indica um valor abaixo de  $80 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$  e indicando um bom desempenho e aplicabilidade a nível industrial do processo proposto, mesmo para a amostra sem pectinase.

15 A análise do gráfico na Figura 7 indica ainda que o tratamento com pectinase tem um fator de concentração mais elevado, atingindo valores de cerca de 19, enquanto que a amostra sem pectinase tem um valor ligeiramente inferior, com um fator de concentração de cerca de 17,8. Mesmo se se considerar que os valores de fator de concentração estão muito próximos, é importante observar que o tempo necessário para

20 atingir este nível de concentração foi muito diferente para cada caso. O tratamento com pectinase mostrou um bom desempenho de fluxo de permeado que estabiliza na fase de pré-concentração (C1), enquanto que aqueles que não têm pectinase mostrou um fluxo estabilizado apenas no início da fase com concentração (C2) com redução do volume circulante sem realimentação.

25 Para melhor ilustrar esse fato, os gráficos da Figura 8 ilustram o comportamento geral da concentração e diafiltração do extrato em função da duração do processo. Dessa forma, a Figura 8 apresenta quatro gráficos, sendo (8-I) a evolução do fator de redução volumétrica, (8-II) o diavolume reduzido, (8-III) a densidade do fluxo de permeado e (8-IV) o teor de sólidos solúveis, respectivamente, em função do tempo, no processo de

30 concentração do extrato E2. Ao se fazer uma análise do comportamento do fator de concentração em função do tempo (Figura 8-I), a curva referente ao processo de pré-

tratamento com enzimas apresenta uma taxa de concentração crescente devido ao maior fluxo de permeado durante todas as fases do processo, comparado com os ensaios sem pré-tratamento enzimático. Esse fato pode ser atribuído à ação de pectinase como um fator de redução da viscosidade e de diminuição do tamanho médio de partícula no produto.

O comportamento do teor de sólidos solúveis totais (Figura 8-IV) mostra um pequeno aumento no início do processo para ambos os casos. Observa-se que o teor de sólidos solúveis em ambas as amostras iniciais estavam em torno de 5,2 °Brix. A leitura de 5,1 a 5,2 °Brix em ambos os casos pode ser atribuída à presença de água dentro da unidade piloto de microfiltração, que é estabilizada após as primeiras realimentações com o extrato bruto. A diminuição do teor total de sólidos solúveis mostrou um comportamento típico dos processos de diafiltração, onde o ponto final do processo adotado é quando o teor atingir valores próximos de zero. Em ambos os casos, o final do processo se deu quanto este parâmetro foi suficientemente baixo para evitar fermentações subsequentes e não haver nenhum prejuízo do teor de carotenóides total.

O diavolume reduzido (DR) é um valor que corresponde a uma razão entre o volume de água adicionado e o volume em recirculação no sistema. Este valor é normalmente utilizado para o redimensionamento do sistema, para o escalonamento de unidades industriais. Deve notar-se, portanto, na Figura 8-II que há um comportamento de crescimento linear deste parâmetro ao longo do tempo, indicando bom desempenho da diafiltração.

Como a fase de diafiltração foi realizada após a concentração máxima do extrato bruto, observa-se que o volume de água necessário para reduzir o teor de sólidos solúveis é muito baixa em comparação com o volume inicial de 20 litros de extrato bruto. A diafiltração neste exemplo foi realizada com um volume circulante de 1,45 L (calculado através da soma dos permeados extraídos) e com a adição de 5,9 L de água destilada para o tratamento com pectinase. O volume circulante calculado para a diafiltração quando não houve adição de pectinase na etapa anterior de prensagem, foi de 1,2 L e de 5,6 L de água destilada adicionada para atingir o teor de sólidos solúveis próximo de zero.

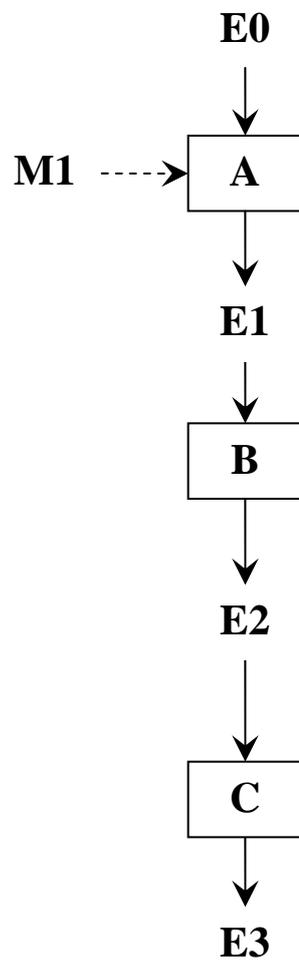
Os resultados obtidos demonstraram que a tecnologia proposta permite a

obtenção de fatores de concentração volumétrica próximos de 20 e que o emprego sinérgico de enzimas pectinolíticas como pré-tratamento durante a fase de prensagem tem um efeito positivo sobre o desempenho global do processo.

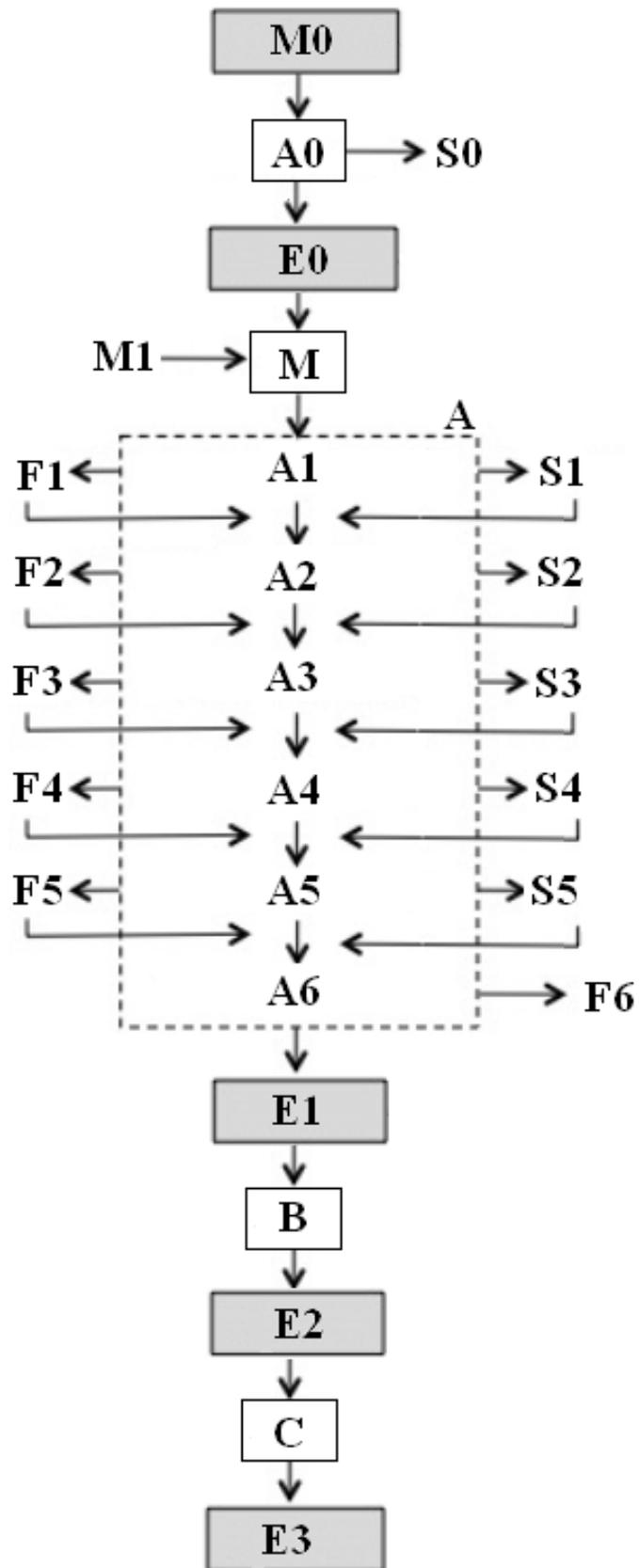
### REINVIDICAÇÕES

1. Processo de concentração e purificação de extrato obtido a partir de resíduos de pseudofruto de caju e produto de elevado teor de carotenoides compreendendo as etapas de lavagem dos resíduos de processamento de caju; sucessivas  
5 prensagens do material de fibras residuais de caju; e filtração da fase líquida total; caracterizado por compreender as etapas de:
  - A) opcionalmente, tratamento enzimático do extrato aquoso bruto durante a prensagem (A);
  - B) peneiramento do extrato aquoso bruto (B); e
  - 10 C) concentração e purificação do extrato aquoso em membranas microporosas de micro e/ou ultrafiltração (C).
2. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela etapa de prensagem (A) ocorrer com 5 a 10 ciclos de prensagem, preferencialmente 6.
3. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela adição opcional de  
15 enzimas comerciais com atividades pectinolíticas, amilolíticas e celulolíticas na etapa de prensagem (A).
4. Processo de acordo com a reivindicação 3 caracterizado pela adição de enzimas compreender valores entre 0,01 e 0,5% sobre a massa de fibras (E0), preferencialmente 0,2%.
- 20 5. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pelo peneiramento (B) ocorrer em peneiras com abertura de furos entre 0,1 e 1,0 mm.
6. Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado pela concentração (C) ocorrer por meio de filtração em membranas porosas de micro e/ou  
25 ultrafiltração, compreendendo as etapas de:
  - C1) adição do extrato (E2) ao tanque de alimentação (4A) sob condições de volume constante;
  - C2) concentração com redução máxima do volume de extrato concentrado no interior do sistema de recirculação até o limite de recirculação do conjunto de membranas; e
  - 30 C3) diálise em membranas com adição de solvente até se atingir um teor de sólidos solúveis de 0 a 10,0 g.kg<sup>-1</sup>.
7. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelo tanque de alimentação ser mantido sob volume constante em (C1) até que a concentração do extrato bruto atinja valores de fator de concentração volumétrica entre 2 e 30  
35 e/ou até o esgotamento do volume de extrato bruto adicionado.
8. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pela unidade de microfiltração ser composto por um conjunto 1 ou mais membranas, preferencialmente 4.

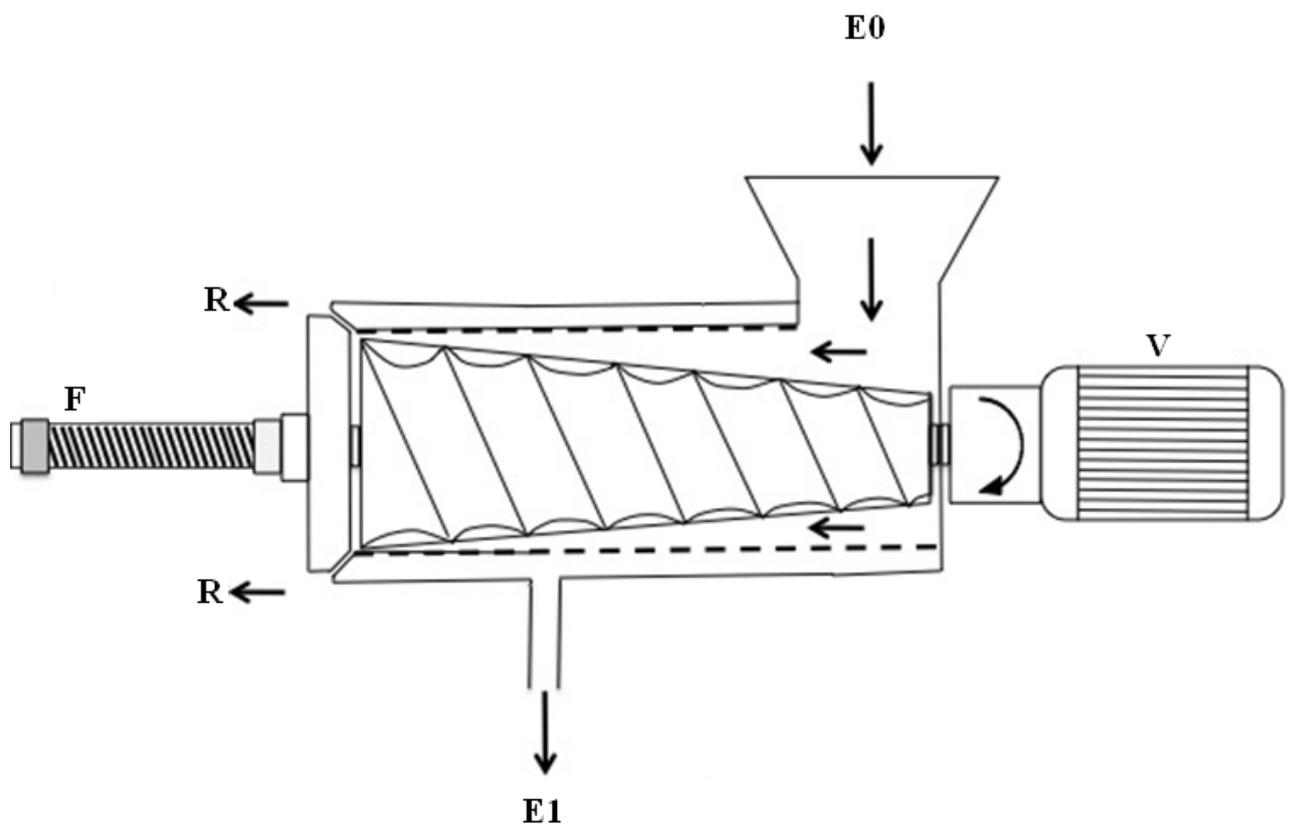
9. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelas membranas empregadas possuírem área de filtração de 0,0001 a 0,0900 m<sup>2</sup>, preferencialmente de 0,0055 m<sup>2</sup> cada.
- 5 10. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelas membranas empregadas possuírem diâmetro de poro de 0,01 µm a 0,5 µm, preferencialmente 0,2 µm.
11. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pelas pressões das seções de microfiltração serem de 0,5 a 10,0 bar, preferencialmente de 1,75 a 2,75 bar.
- 10 12. Processo de acordo com a reivindicação 6 caracterizado pela velocidade tangencial ser fixada em 0,1 a 20,0 m.s<sup>-1</sup>, preferencialmente 6,0 m.s<sup>-1</sup>.
13. Sistema de concentração e purificação de extratos aquosos caracterizado por compreender um conjunto de membranas de microfiltração, equipamento(s) de bombeamento de extrato, trocador(es) de calor, tanque(s) de alimentação e coleta, manômetro(s), termômetro(s) e válvula(s) de controle.
- 15 14. Processo de acordo com as reivindicações 1 e 13 caracterizado pela etapa de concentração e purificação do extrato ocorrer em temperaturas entre 10°C e 85°C, preferencialmente 38°C a 42°C.
- 20 15. Produto de elevado teor de carotenoides de fibras de caju caracterizado por ser obtido a partir de processo de concentração e purificação do extrato de resíduos de pseudofruto de caju e por compreender os componentes auroxantina; mutatoxantina; luteína; zeaxantina; antheraxantina; β-Cryptoxantina; 13-cis-β-caroteno; α-Caroteno e β-caroteno podendo opcionalmente ser associados a outros aditivos e/ou carotenoides de interesse.
- 25 16. Produto de acordo com a reivindicação 15 caracterizado por ser empregado como corante e/ou aditivo industrial.



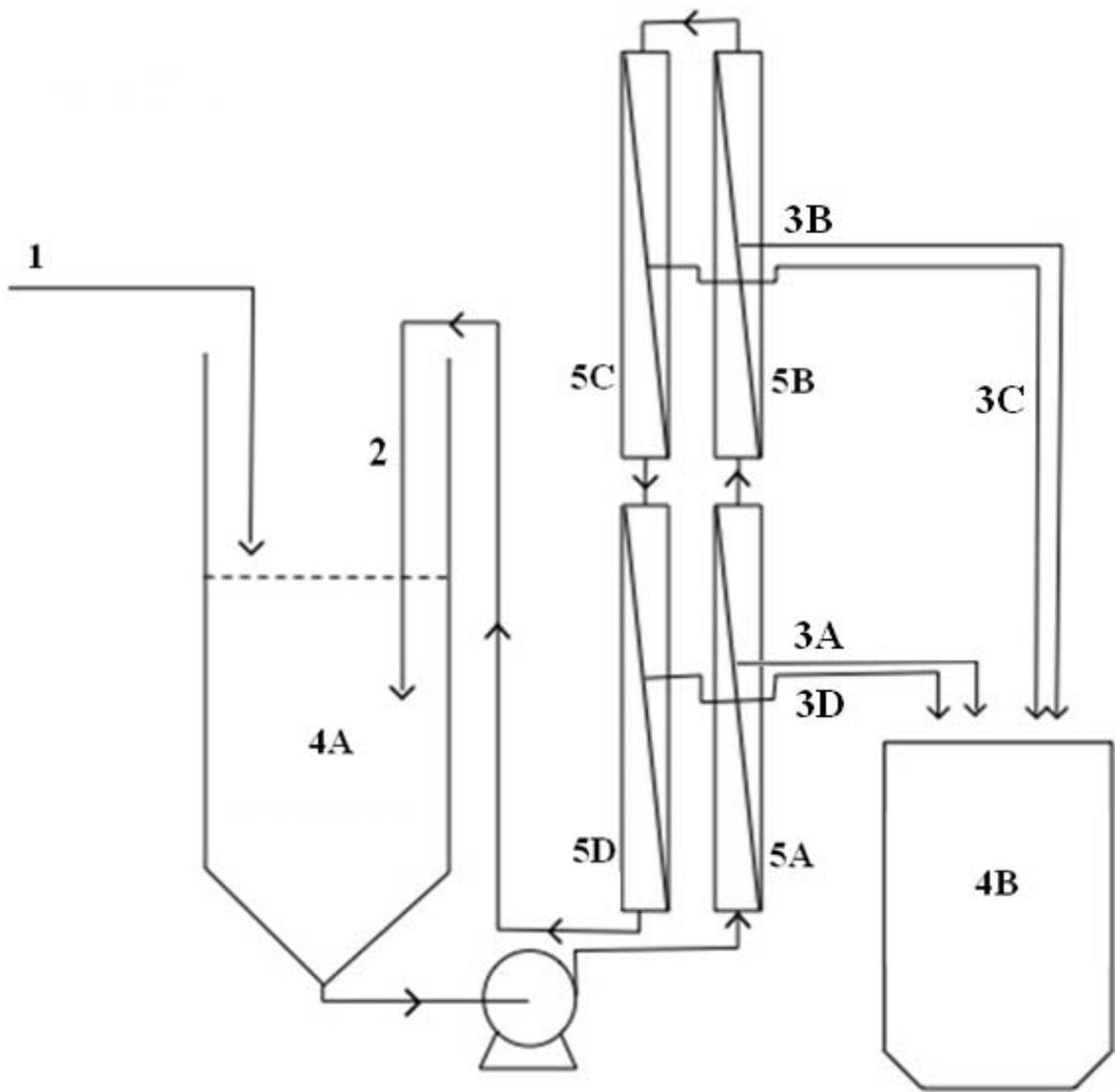
**Fig. 1**



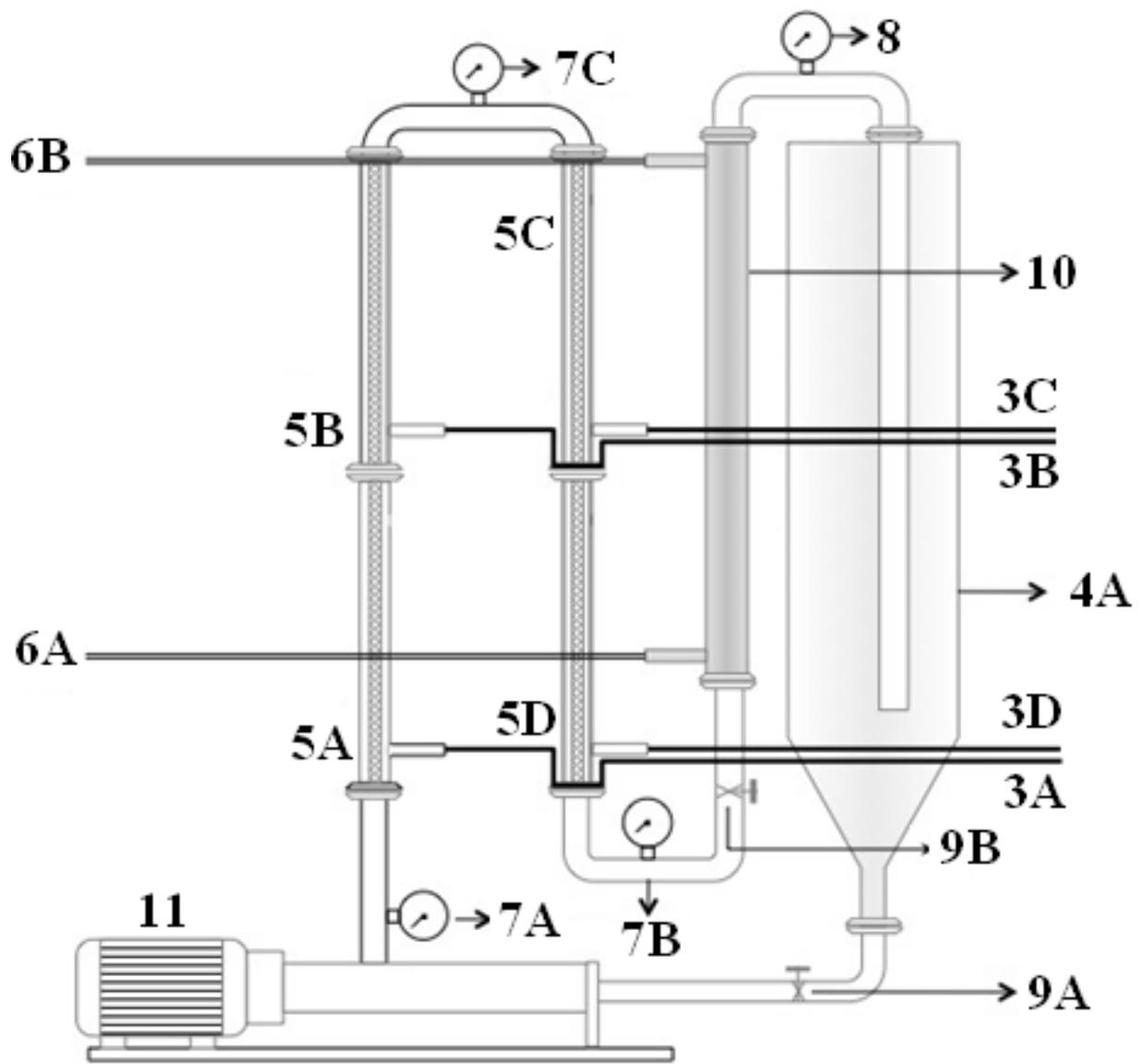
**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**

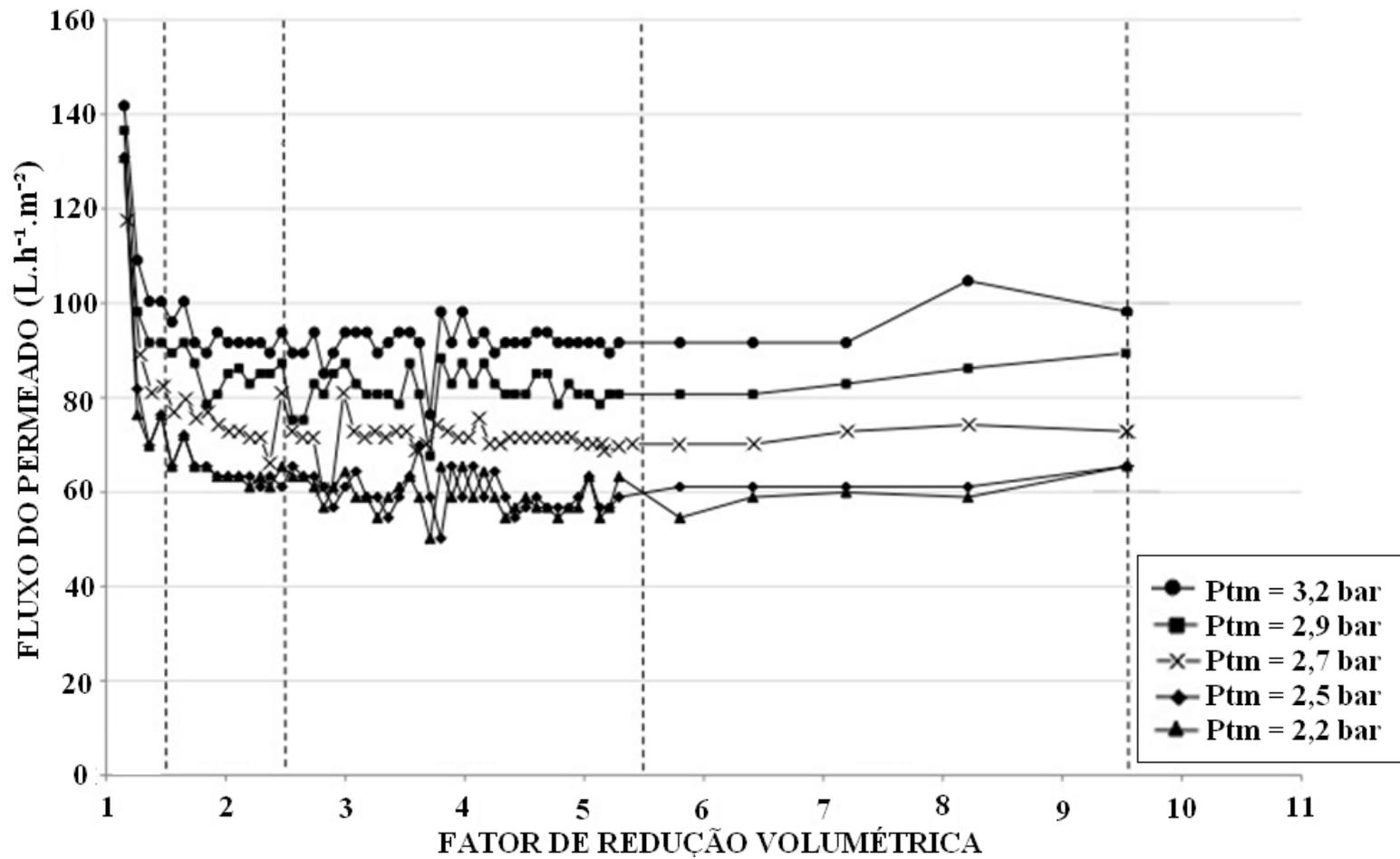


Fig. 6

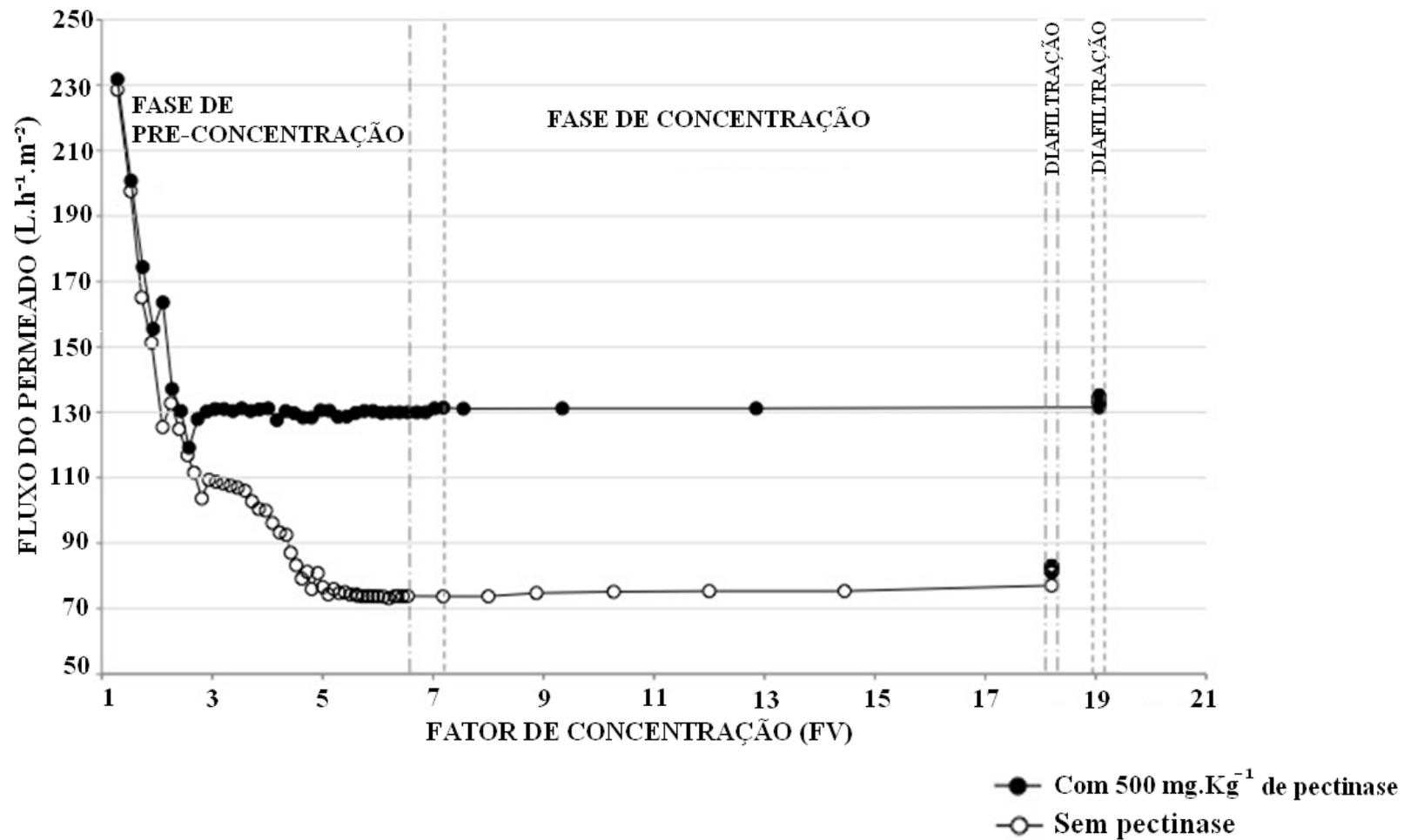


Fig. 7

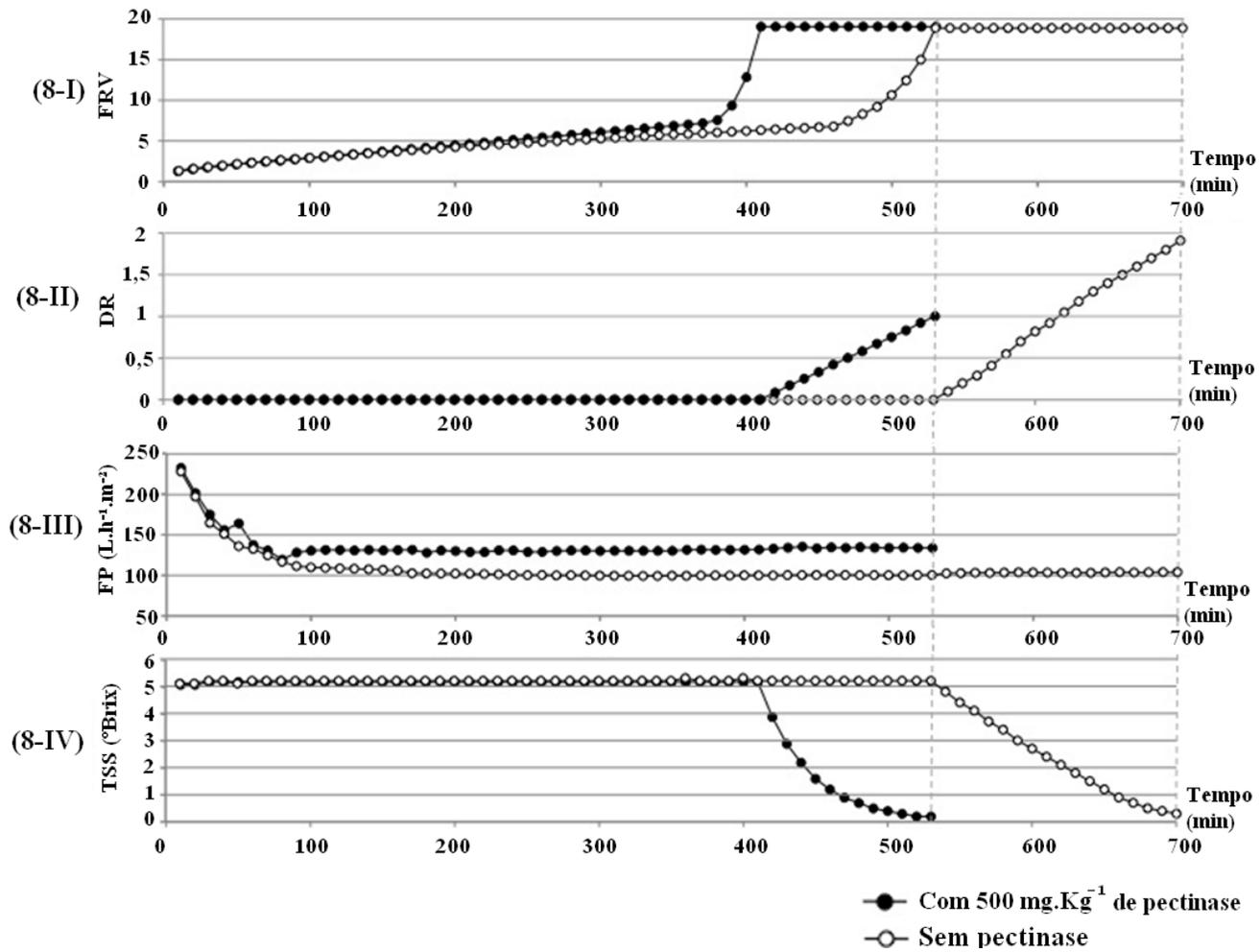


Fig. 8

**RESUMO****“PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE EXTRATOS DE CAROTENOIDES”**

A presente invenção apresenta um processo para concentração e purificação de carotenoides a partir de fibras residuais da produção de suco de caju integral sob condições controladas sem uso de qualquer solvente orgânico. O processo envolve uma pré-maceração das fibras de caju com uso de enzimas desagregadoras de estruturas celulares, que atuam sobre os tecidos fibrosos em combinação com prensagens controladas em ciclos sucessivos de extração aquosa. A concentração do extrato bruto obtido por maceração/prensagem é realizada à temperatura ambiente com uso de membranas de microfiltração em fluxo tangencial. O produto concentrado é então tratado por técnicas de diafiltração para ser purificado, eliminando-se grande parte dos componentes indesejáveis e que favoreçam a sua deterioração microbiana e bioquímica. O concentrado final possui potencial de aplicação como corante para alimentos de consumo humano e ração animal, sendo aplicável nas áreas de sucos e bebidas prontas para o consumo devido à considerável solubilidade em água.

## RÉSUMÉ

Quelle que soit la zone de culture, l'anacardier (*Anacardium occidentale* L.) est essentiellement cultivé pour la production de noix de cajou, filière d'une grande importance socio-économique notamment au Brésil. Le jus de cajou est un produit secondaire qui résulte du pressage du pédoncule hypertrophié de la noix appelé pomme de cajou (pseudo-fruit juteux). Le traitement des pommes engendre de grands volumes de déchets solides qui sont soit mis en décharge, soit utilisés pour l'alimentation animale. Dans ce contexte, le travail a pour objectif de proposer et d'évaluer un nouveau procédé permettant d'accroître la valeur ajoutée de ce sous-produit en extrayant les caroténoïdes qu'il contient. Le procédé comporte 3 opérations successives : une extraction par pressage associée à une macération enzymatique, une concentration à froid de l'extrait par microfiltration tangentielle et une purification par diafiltration. La première opération a été optimisée à l'aide de 2 plans d'expériences : un plan de criblage de facteurs de Plackett-Burman (matrice de Hadamard) pour sélectionner les paramètres opératoires les plus influents suivi d'un plan central composite pour les optimiser. La dose de pectinase utilisée durant la macération et la force appliquée lors du pressage sont les paramètres les plus influents sur le profil caroténoïdique de l'extrait. De fortes doses de pectinase associées à une force de pressage élevée permettent d'obtenir à la fois un extrait plus riche en caroténoïdes et une meilleure densité de flux de perméat en microfiltration. L'utilisation de plusieurs cycles successifs de pressage permet d'augmenter les teneurs en caroténoïdes de l'extrait mais augmente également son pouvoir colmatant en microfiltration. L'étude de la concentration de l'extrait par microfiltration tangentielle a montré qu'il est possible d'atteindre un facteur de réduction volumique (FRV) de 20 en maintenant des densités de flux de perméat supérieures à  $100 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ . Les caroténoïdes sont concentrés à hauteur du FRV choisi (jusqu'à 20 fois). La diafiltration a permis de purifier 5 fois les caroténoïdes par rapport à la matière sèche. Un modèle simple basé sur des bilans matières pour prévoir l'impact du FRV et du diavolume sur la composition de l'extrait a été développé et validé. L'extrait final obtenu présente une teneur en caroténoïdes de  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Parmi les 11 molécules identifiées par HPLC-DAD-MS, les caroténoïdes majoritaires sont les isomères cis et trans de l'auroxanthine et la  $\beta$ -cryptoxanthine. Les extraits finaux obtenus se présentent sous forme de liquides visqueux de couleur jaune intense, faciles à disperser dans l'eau. Ils possèdent un fort potentiel d'utilisation dans la formulation des aliments comme colorant naturel.

---

## RESUMO

Em qualquer que seja a região de plantio, o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é essencialmente cultivado para a produção da amêndoa, uma cadeia produtiva que possui grande importância socioeconômica, notadamente no Brasil. O suco de caju é um produto secundário que resulta da prensagem do pedúnculo hipertrofiado da castanha, conhecido como maçã de caju, um pseudofruto succulento. O processamento do pedúnculo gera grandes volumes de resíduos industriais sólidos que são geralmente descartados ou algumas vezes usado como ração animal. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo propor e avaliar um novo processo que proporciona uma agregação de valor a esse subproduto industrial, extraíndo os carotenoides que ali estão contidos. O processo comporta três operações sucessivas: uma extração por prensagem associada a uma maceração enzimática, uma concentração deste extrato a frio com uso de microfiltração em fluxo tangencial e uma purificação por diafiltração. A primeira operação foi otimizada com uso de dois planos de experiências: um plano de calibragem inicial dos fatores com possível interferência do tipo Plackett-Burman (Matriz de Hadamard) para selecionar os parâmetros operacionais mais influentes, seguido de um planejamento composto central para otimização. A dosagem de pectinase utilizada durante a maceração e a força aplicada na operação de prensagem são os parâmetros mais influentes sobre o perfil de carotenoides dos extratos. Fortes dosagens de pectinase associadas a uma força de prensagem elevada permitem aumentar os teores de carotenoides dos extratos, porém aumentam igualmente o poder colmatante em microfiltração. O estudo da concentração dos extratos por microfiltração tangencial mostrou que é possível se chegar a valores do fator de redução volumétrica (FRV) em torno de 20, mantendo as densidades dos fluxos de permeados superiores a  $100 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ . Os carotenoides são concentrados nos mesmos níveis do FRV. A diafiltração permite uma purificação dos carotenoides de 5 vezes em relação à matéria seca total. Um modelo simples, baseado sobre um balanço de massa para prever o impacto do FRV e do diavolume sobre a composição do extrato foi desenvolvido e validado. O extrato final obtido apresenta um teor de carotenoide de  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Entre as moléculas identificadas por HPLC-DAD-MS, os carotenoides majoritários são os isômeros cis e trans da auroxantina, a  $\beta$ -criptoxantina e o  $\beta$ -caroteno. Os extratos finais obtidos apresentam-se na forma de líquidos viscosos de coloração amarela-intensa e de fácil dispersão em água. Este concentrados possuem um forte potencial de utilização na formulação de alimentos e bebidas como um corante natural.

---

## ABSTRACT

Whatever is the area of plantation, cashew (*Anacardium occidentale* L.) is grown primarily for the production of nuts, a supply chain that has great socioeconomic importance, especially in Brazil. The cashew juice is a by-product that results from pressing the nut hypertrophied peduncle, known as cashew apple, a juicy pseudo fruit. Peduncle processing generates large volumes of industrial solid waste that are usually discarded or sometimes used as animal feed. In this context, this work aimed to propose and evaluate a new process that provides an added value to this industrial by-product, extracting carotenoids that were contained therein. The process comprised three successive operations: an extraction by pressing associated to an enzymatic maceration, a cold concentration of the extract by crossflow microfiltration and a purification by diafiltration. The first operation was optimized with the use of two experimental designs: a Plackett-Burman (Hadamard matrix) plan for factors screening to select the most influential operating parameters, followed by a central composite design for optimization. The dose of pectinase used during maceration and the applied force used during the pressing operation were the most influential parameters on the carotenoid extract profile. High doses of pectinase associated with a high pressing force led to a richer carotenoid extract and enhanced the density of permeate flux in microfiltration. The use of several successive cycles of compression increased the carotenoid content in the extract but also increased its fouling properties during microfiltration. The extract concentration by crossflow microfiltration study showed that it was possible to reach values of volumetric reduction ratio (VRR) of about 20, maintaining the permeate flux above  $100 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$ . The carotenoids were concentrated in the same levels of FRV (up to 20 times). The diafiltration allowed purification of carotenoids 5 times in relation to the dry matter. A simple model, based on a mass balance to predict the impact of VRR and diavolume on the extract composition was developed and validated. The final extract obtained presented a carotenoid content of  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Among the 11 compounds identified by HPLC-DAD-MS, the main carotenoids were cis and trans isomers of auroxanthine and  $\beta$ -cryptoxanthin. The final extracts obtained were in the form of viscous liquids of a yellow intense color, and easily dispersed in water. These concentrates have a strong potential for use in the formulation of foods and beverages as a natural dye.