UNIVERSITE DE MONTPELLIER - MONTPELLIER II

UNIVERSITE DE MONTPELLIER I

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Diplôme d'études approfondies

Sciences des Aliments

Les composés amers du café torréfié : recherche de dicétopipérazines

par

Florence FERNANDEZ

Maître es Sciences et Techniques

Présenté le 27 septembre 1991
devant le Jury de la Commission d'Examen

M.	BARRE
Prof.	CABANIS
Prof.	CROUZET
Prof.	GALZY
Prof.	GUIRAUD
Prof.	MONNIER

Travail réalisé sous la direction de : M. CROS

UNIVERSITE DE MONTPELLIER - MONTPELLIER II

UNIVERSITE DE MONTPELLIER I

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE AGRONOMIQUE DE MONTPELLIER

Diplôme d'études approfondies

Sciences des Aliments

Les composés amers du café torréfié : recherche de dicétopipérazines

par

Florence FERNANDEZ

Maître es Sciences et Techniques

Présenté le 27 septembre 1991
devant le Jury de la Commission d'Examen

M.	BARRE
Prof.	CABANIS
Prof.	CROUZET
Prof.	GALZY
Prof.	GUIRAUD
Prof.	MONNIER

Travail réalisé sous la direction de : M. CROS

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Chimie et Technologie de l'Institut de Recherches du Café, du Cacao et des autres plantes stimulantes (I.R.C.C.) de Montpellier.

Je tiens à remercier Monsieur J-C. VINCENT, Directeur du laboratoire de Chimie et Technologie de l'I.R.C.C. qui a eu la gentillesse de m'accueillir dans son laboratoire.

J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur E. CROS, Ingénieur Chimiste, qui a dirigé mon travail grâce à ses précieux conseils.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes de l'I.R.C.C. qui, par leur gentillesse et leur bonne humeur, m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions .

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le concours de l'équipe CNRS-INSERM de Pharmacologie-Endocrinologie de Montpellier, dirigée par Monsieur MARTINEZ. Je remercie particulièrement Monsieur RODRIGUEZ pour son accueil et sa sympathie.

I. INTRODUCTION

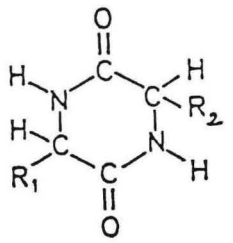
L'amertume est une des quatre saveurs fondamentales décrites communément pour caractériser le goût des aliments.
Ce terme d'amertume est très usité pour décrire le café boisson.
Cependant, non seulement la saveur amère peut provenir de composés divers décrivant un large éventail de groupes fonctionnels et de masses moléculaires, mais encore les individus se montrent-ils différents au niveau de la perception et de l'appréciation de celle-ci. En outre, la réponse gustative à cette saveur demeure très complexe.

Identifier de tels composés permettrait de mieux connaître le café en tant que matière première et ultérieurement d'avoir un outil analytique pour évaluer l'influence de la torréfaction sur le développement de l'amertume, ainsi que pour différencier arabica et Robusta.

BELITZ (1975) a dressé une liste de composés amers du café ; il distingue :

* des produits constitutifs, c'est-à-dire présents dans le café vert :
  - acides chlorogéniques
  - composés azotés : trigonelline, caféine, acides aminés, peptides et protéines
  - terpènes : mascaroside (C.vyannei) (DUCRUIX, HAMMONNIERE et al. 1977), mozambiozide (C.pseudozanguebariae), cafamarine (C.buxifolia) (CHASSEVENT et al. 1967)
  - acides carboxyliques,

* des produits pouvant apparaitre au cours de la torréfaction :
  - composés de Maillard
  - produits de la dégradation thermique de la trigonelline et des acides chlorogéniques
  - dicétopipérazines.



Structure générale des dicétopipérazines

Ces derniers composés ont déjà été identifiés dans la partie non volatile issue de fèves de cacao torréfiées (PICKENHAGEN et al. 1975, VAN DER GREEF et al. 1987) et dans le malt grillé (SAKAMURA et al. 1978). Les dicétopipérazines peuvent se former à partir de peptides sous l'influence de la chaleur. Elles proviennent d'une lyse intramoléculaire de la seconde liaison peptidique N-terminale.

Elles contribuent, en présence de théobromine, à l'amertume caractéristique du cacao. Cependant, le mécanisme d'intéraction entre ces deux composés n'a pas été élucidé à l'heure actuelle.

Quant au café, aucun travail définitif n'a pu fournir, à l'heure actuelle, l'identité des composés responsables de son amertume spécifique.

Au cours de ce travail, nous avons essayé de caractériser la présence de dicétopipérazines dans le café torréfié, et d'attribuer quelques structures par comparaison avec des témoins commerciaux et de synthèse.

II. GENERALITES

II.1. Aspect économique

II.1.1. Pays producteurs

Actuellement, deux grandes espèces de caféiers sont surtout exploitées dans le monde : Coffea arabica et Coffea canephora (variété Robusta).
La caféiculture a une répartition mondiale en étroite dépendance avec les facteurs climatiques. Ainsi, elle s'étend essentiellement sur les terres situées entre les tropiques où les conditions thermiques et hygrométriques sont très favorables.
L'Amérique du Sud est la principale région productrice de café (tab. 1).
Etant donné la surproduction mondiale excessive, des organismes nationaux et internationaux, chargés de planifier le commerce du café, ont été mis en place.
Dans le but d'une meilleure organisation, plusieurs pays se regroupent, comme dans le cas de l'OAMCAF, qui a amené la production des pays africains et malgaches aux environs de 500 000 tonnes.
L'OIC (Organisation Internationale du Café), supervise les échanges à l'échelle mondiale.

II.1.2. Importations

La production élevée, le coût unitaire de cette denrée, joint à l'importance du transit vers les pays consommateurs, font que le café vient au premier rang mondial des différentes denrées agricoles par sa valeur commerciale.
Au premier plan des importations de la CEE se place l'Allemagne fédérale suivie par la France, l'Italie et la Grande-Bretagne (tab. 2).
Le volume des importations a considérablement augmenté durant ces dernières années. L'Europe occidentale a importé en 1987 plus de trois fois la quantité de café vert qu'elle avait importé en 1955.
Les états de l'Est européen ont doublé leurs importations durant ces vingt dernières années. De 120 000 tonnes en 1966, elles sont passées à 250 000 tonnes en 1986.
L'Europe de l'Ouest se fournit principalement en cafés brésiliens (tab. 2), les cafés arabica représentant 75% des arrivages dans ces pays.
Les robustas de toutes origines, ont totalisé, 570 000 tonnes en 1987.
Ils ont été achetés pour 50% par la France (57% des tonnages reçus) ; le reste est principalement consommé par l'Italie (46% de ses importations) et les Pays-Bas (soit 23%). Par contre, les cafés de cette espèce ont peu de succès auprès des consommateurs allemands, suisses, ou scandinaves.

II.2. Technologie des cafés verts

Après récolte des fruits mûrs, ceux-ci sont traités sur les lieux même de production.
Les opérations post-récolte ont pour objet de dégager les graines de leurs enveloppes (pulpe, mucilage, parche, pellicule) (fig. 1).
L'obtention du grain marchand s'opère selon deux méthodes différentes :

Tableau 1 : EXPORTATIONS DE CAFE VERT, TORREFIE OU SOLUBLE EN 1987/88 ET 1988/89 (EN MILLIERS DE T**)

Pays	1987/88	1988/89*	Pays	1987/88	1988/89*
Afrique			**Amérique du Sud**		
Angola	12,3	7,7	Bolivie	6,8	7,0
Bénin	2,6	2,8	Brésil	1 007,9	972,5
Burundi	29,4	34,7	Colombie	546,7	616,0
Cameroun	95,0	89,6	Equateur	71,5	99,8
Rép. centrafricaine	16,1	21,1	Paraguay	44,9	22,2
Côte d'Ivoire	215,4	183,5	Pérou	43,1	66,6
Ethiopie	82,6	84,0	Venezuela	10,4	11,0
Gabon	1,6	1,8			
Guinée	5,3	5,8			
Kenya	77,5	99,8	Total	1 731,3	1 795,1
Libéria	3,4	4,8			
Madagascar	41,9	43,9	**Amérique Centrale**		
Malawi	3,1	2,7			
Nigeria	2,8	2,7	Costa Rica	117,2	127,6
Ouganda	139,1	186,7	Cuba	12,0	12,1
Rwanda	29,6	37,7	Rép. dominicaine ..	25,4	28,0
Sierra Leone	8,3	4,8	Guatemala	133,3	172,1
Tanzanie	37,9	49,9	Haïti	17,4	13,8
Togo	16,9	17,2	Honduras	73,4	87,8
Zaïre	62,8	68,0	Jamaïque	1,3	0,8
Zimbabwe	9,6	6,2	Mexique	153,1	218,0
			Nicaragua	34,0	35,9
			Panama	9,0	6,4
Total	893,2	955,4	Salvador	112,7	101,6
Asie					
			Total	688,8	804,1
Inde	83,2	114,7			
Indonésie	265,1	321,1	**Océanie**		
Philippines	26,4	28,9			
Sri Lanka	3,2	3,4	Pap.-Nvelle-Guinée.	38,6	76,9
Thaïlande	26,8	44,2			
			Divers	3,8	2,4
Total	404,7	512,3			
			Total mondial	3 760,4	4 146,2

Les pays cités sont membres de l'Accord international du café.
* Chiffres préliminaires.
** En équivalent de café vert (oct. à sept.).

(D'après OIC document ED-3186/89 *in Le Café*, oct. 1989)

Tableau 2 : IMPORTATIONS TOTALES DE CAFÉ VERT EN EUROPE - ANNÉE 1989
(en sacs de 60 kilos)

ORIGINES / PAYS IMPORTATEURS	RÉPUBLIQUE FÉDÉRALE D'ALLEMAGNE	FRANCE	EUROPE DE L'EST (1)	ITALIE	ESPAGNE (2)	PAYS-BAS	GRANDE-BRETAGNE	BELGIQUE LUXEMBOURG	SUÈDE	AUTRICHE	FINLANDE	SUISSE	DANEMARK	NORVÈGE	DIVERS (3)	TOTAL
AMÉRIQUE DU SUD																
BRÉSIL	1.071.825	1.029.147	418.899	1.201.000	719.361	421.063	176.337	228.400	697.133	462.985	290.674	203.275	414.910	376.609	827.725	8.539.343
COLOMBIE	2.600.293	332.422	1.250.692	166.800	248.786	513.179	236.032	123.700	470.983	89.792	289.793	106.976	144.122	152.692	27.672	6.775.884
ÉQUATEUR	64.418	2.485	—	15.400	24.480	—	18	1.600	—	62.172	—	8.840	395	—	—	179.808
Divers	77.902	102.051	13.100	77.300	186.485	14.854	3.520	3.400	—	83.544	—	15.811	30.392	928	38.594	647.881
AMÉRIQUE CENTRALE																
SALVADOR	415.565	35.385	—	6.500	24.821	31.539	5.819	13.600	1.450	30.880	—	14.313	6.015	—	10.233	596.120
GUATEMALA	280.945	63.170	37.600	132.500	27.054	46.919	23.003	32.500	61.133	50.295	101.436	87.901	17.279	28.381	28.435	1.018.553
COSTA RICA	301.896	127.638	258.482	117.900	24.337	55.258	182.071	15.400	81.583	57.000	129.417	86.322	20.087	9.383	29.812	1.496.386
MEXIQUE	113.598	85.508	72.334	33.600	8.476	15.601	5.874	6.400	7.900	27.940	2.114	46.042	1.911	21.741	10.443	461.482
NICARAGUA	218.008	39.885	8.333	10.900	55.330	26.469	1.412	7.700	50	39.867	10.462	42.318	1.504	—	210	462.448
HONDURAS	73.585	32.577	393.600	77.400	19.337	11.053	25.214	28.700	7.933	31.122	1.438	76.700	2.570	1.150	38.374	820.753
HAÏTI	3.273	47.522	—	100.900	741	8.549	—	44.700	—	1.328	—	8.761	1.461	—	—	217.235
Divers	26.582	35.255	—	40.200	87.558	9.062	1.055	1.700	200	4.161	5.657	10.266	7.508	1.150	8.350	238.804
AFRIQUE																
O.A.M.C.A.F.	262.600	1.736.594	164.253	1.212.600	551.236	229.483	189.251	116.700	1.367	123.563	—	80.894	22.602	1.246	168.967	4.861.356
UGANDA	99.954	350.952	590.436	91.600	267.131	389.734	285.547	85.900	—	2.165	1.254	3.874	32.545	1.519	74.920	2.277.533
ZAÏRE	79.433	250.080	—	629.300	58.103	17.721	10.524	21.200	—	38.920	548	5.451	9.517	—	24.294	1.143.091
KENYA	469.400	52.753	32.318	52.400	20.441	91.556	120.119	113.700	131.150	24.790	87.418	60.281	13.538	15.443	3.267	1.268.576
TANZANIE	300.768	43.830	32.300	63.400	1.133	61.215	34.344	17.600	600	4.913	29.914	557	17.078	8.583	—	616.235
ANGOLA	897	—	—	200	48.269	4.471	83	—	—	4.842	—	12.587	—	—	55.981	127.310
ÉTHIOPIE	365.578	128.235	108.335	46.200	25	71.312	11.843	25.100	1.650	80.177	40.672	14.013	3.441	355	26.017	922.951
RWANDA-BURUNDI	339.864	103.097	—	8.700	18.612	45.626	31.918	50.400	6.666	1.220	50.569	7.059	14.495	—	900	677.124
Divers	129.151	73.328	—	15.000	25.258	51.487	49.468	22.600	—	9.828	15.211	29.953	30.707	—	735	452.526
ASIE - OCÉANIE																
INDONÉSIE	370.418	255.453	550.296	150.800	90.856	52.492	148.365	24.400	4.350	71.910	272	31.090	97.274	6.683	42.024	1.894.683
INDE	71.426	33.918	865.725	127.400	23.128	1.715	4.129	9.500	2.550	34.850	18.220	45.076	4.487	16.923	129.327	1.406.374
PAPOUASIE - NOUVELLE GUINÉE	372.593	9.512	159.900	3.000	1.650	2.834	69.015	1.600	—	24.827	—	1.997	526	—	1.100	648.554
Divers	95.748	88.942	10.300	41.300	14.095	3.345	4.577	13.200	—	72.571	1.697	9.816	23.391	13.298	3.381	393.461
NON IDENTIFIÉS	131.574	10.058	—	82.100	87.776	121.707	124	556.100	35	8.775	42	12.065	—	512	216.637	1.227.505
TOTAUX	8.337.292	5.067.797	4.986.905	4.522.400	2.634.479	2.298.248	1.619.660	1.545.800	1.476.833	1.442.237	1.056.810	1.024.018	817.755	656.596	1.767.148	39.373.976

(1) Démocratique Allemande, Bulgarie, Hongrie, Pologne, Roumanie, Tchécoslovaquie, U.R.S.S. (indifférencié), Yougoslavie, l'archipel des Açores, Madère, Gibraltar, Grèce, Irlande, Islande, Malte, Portugal, Yougoslavie.

IMPORTATIONS TOTALES EN 1989 : 39.373.976 sacs
(non compris torréfiés et solubles)

Les chiffres ci-dessus ont été recueillis auprès de l'Organisation Internationale du Café et de diverses sources officielles, auprès des sources privées au bon bris des statistiques publiées par Georgy Gordon Foton et par F.O. UCHT GmbH.

* La voie humide

Elle nécessite plusieurs lavages et s'effectue ainsi :

- élimination de la pulpe à l'aide d'un appareil à cylindre ou à disque
- élimination du mucilage par une action mécanique, chimique (chaux), ou biochimique (fermentation des matières pectiques par des diastases).
- lavages
- séchage solaire (ou artificiel).

On obtient ainsi le café "parche".
Le recours à la voie humide (cafés "milds") est de règle pour les cafés arabica de qualité supérieure (Centre-Amérique, Colombie, etc...).

* La voie sèche

Ce procédé ne fait appel à aucun lavage.
Les différentes étapes sont les suivantes :

- séchage solaire (ou artificiel) des fruits mûrs entiers. On obtient ainsi le café "coque".
- décorticage mécanique

Le traitement par voie sèche (cafés "nature" ou "hard-coffee") concerne environ 80% des Arabicas brésiliens et l'ensemble des Robustas africains et asiatiques.

Le recours à l'une ou l'autre méthode est suivi par des opérations de conditionnement comprenant triages, calibrage, ensachage.

II.3. La torréfaction

La torréfaction consiste à porter le café vert à une haute température (180 à 300°C). Cette opération entraîne une modification de l'aspect physique du grain (couleur, volume, texture) et de la composition chimique.
Cette dernière a pour conséquence une diminution de l'acidité et une augmentation de l'amertume du café boisson. Ces variations sont d'autant plus importantes que la torréfaction est élevée.
De plus, à chaque valeur des paramètres de torréfaction (durée, température) correspond un profil aromatique particulier du café.

II.4. L'amertume des composés alimentaires

II.4.1. Les composés amers dans les aliments

II.4.1.1. Les composés amers naturels

Les produits naturellement amers sont trouvés le plus souvent dans le règne végétal plutôt qu'animal.
Non seulement les végétaux ont souvent une saveur amère avant maturité, mais encore cette amertume est présente dans certains fruits (olive, citron...), ou légumes (patate douce, laitue...) (OBERDIECK 1977).
Les composés phénoliques sont souvent cités comme responsables de l'amertume (ROUSEFF 1990).

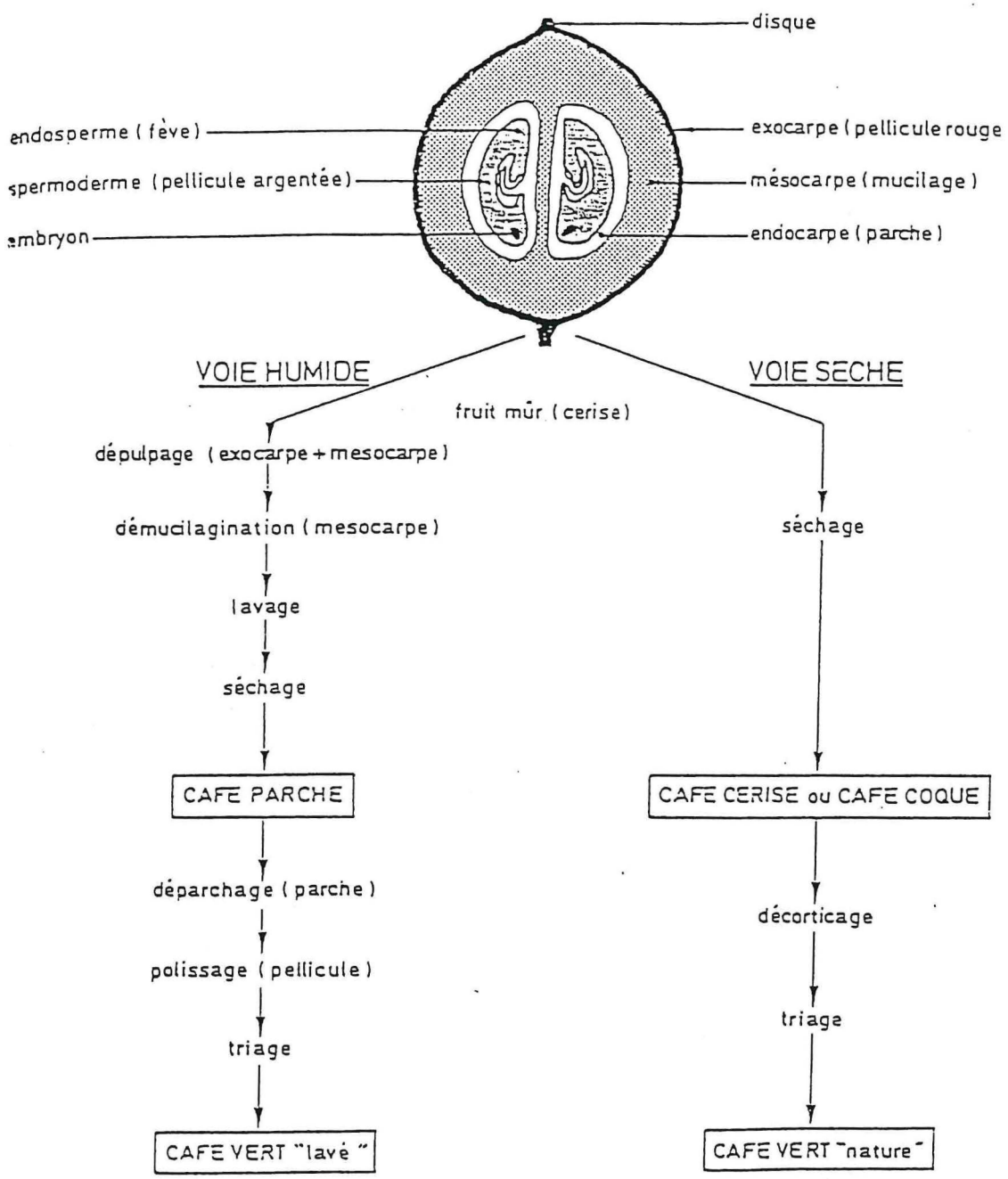


Figure 1. : Café : coupe du fruit et traitements technologiques.

Certains composés amers sont également toxiques (exemple : les glycosides cyanogénétiques contenus dans le haricot de Lima ; ROUSEFF 1990).

II.4.1.2. Les produits amers issus d'un traitement technologique

Les traitements technologiques conduisant à une oxydation des lipides, à un brunissement enzymatique ou non, modifient l'arôme et peuvent être à l'origine de la présence de composés amers.

Les peptides et acides aminés produits lors de la protéolyse du lait sont responsables de l'amertume de certains fromages.
SHIBA et al. (1981) ont identifié une dicétopipérazine, cyclo (LEU-TRYP), dans l'hydrolysat de caséine. Les quatre stéréoisomères développent une amertume comparable. Ces mêmes auteurs ont trouvé une bonne corrélation entre l'amertume des dicétopipérazines et leur caractère hydrophobe.

Dans le cacao, les dicétopipérazines formées lors de la torréfaction, en association avec la théobromine, présentent une amertume (PICKENHAGEN et al. 1975).
Les dicétopipérazines identifiées à l'heure actuelle, dans le cacao,le malt et l'hydrolysat de caséine sont répertoriées dans le tab. 3.

Tableau 3. Dicétopipérazines identifiées dans l'hydrolysat de caséine, le cacao et le malt.

Cyclo (LEU-TRYP)	H
Cyclo (PRO-PHE)	C,M
Cyclo (PRO-LEU)	M,C,C'
Cyclo (PRO-VAL)	M
Cyclo (PRO-ILE)	M
Cyclo (PRO-PRO)	M
Cyclo (PRO-GLY)	C,C'
Cyclo (ASN-PHE)	C
Cyclo (ASN-PRO)	C,C'
Cyclo (PHE-GLY)	C,C'
Cyclo (PHE-VAL)	C,C'
Cyclo (PHE-ALA)	C,C'
Cyclo (ALA-GLY)	C,C'
Cyclo (ALA-VAL)	C,C'

H : hydrolysat de caséine (SHIBA 1974), C : cacao (PICKENHAGEN 1975), C' : cacao (VAN DER GREEF 1987), M : malt (SAKAMURA 1978)

II.4.2. Les composés amers du café

Les principales connaissances sur l'amertume du café demeurent encore empiriques.

II.4.2.1. Les composés amers du café vert

La caféine est amère. Elle est présente dans le café à une concentration environ dix fois plus grande que la concentration correspondant à son seuil de perception (BELITZ 1975).
En fait, VOILLEY et al. (1979) ont estimé que la caféine contribue pour seulement 10% à l'amertume totale du café.

PANGBORN (1960) a souligné les synergies et antagonismes entre différents composés, pouvant gêner la recherche de la saveur et l'évaluation de l'amertume ; HARDWICK (1977) rapporte que la perception amère de la caféine est diminuée par les polyphénols et que l'astringence des polyphénols est diminuée par la caféine.

Les polyphénols sont associés depuis longtemps à l'astringence et à l'amertume. Le café contient de 5 à 12% d'acides chlorogéniques (terme regroupant les esters quiniques des acides caféiques et féruliques ; fig. 2).
NAGEL et al.(1987), ont étudié l'amertume de l'acide 5-cafeoylquinique lorsque son caractère acide est masqué par addition de bitartrate de potassium. Dans ces conditions, l'acide chlorogénique n'est pas amer à une concentration de 100 mg/l.
ORDYNSKY (1965) a mis en évidence l'amertume de la trigonelline et d'un complexe formé par l'association d'un acide chlorogénique et de la caféine à des concentrations respectives de 0,25% et 0,2%.
Les terpènes comme le mascaroside (C.vyannei) (DUCRUIX, HAMMONNIERE et al. 1977), le mozambiozide (C.pseudozanguebariae) et la cafamarine (C.buxifolia) (CHASSEVENT et al. 1967) ont été décrits comme étant amers (cité par VIANI 1988).

II.4.2.2. Les composés amers du café torréfié

Plusieurs substances et classes de composés sont supposées intervenir dans l'amertume du café (BELITZ 1985) (tab. 4).

Les composés formés au cours des réactions de brunissement thermique sont souvent associés au développement de l'amertume. Par analogie, certains composés obtenus à la torréfaction du café sont supposés contribuer à l'amertume de la boisson ; ce phénomène complexe n'a pu cependant être étudié jusqu'à présent.
Les acides chlorogéniques sont dégradés (fig. 3) en acide quinique et acide cinnamique, lesquels conduisent à la formation de "phénols" (hydroquinone, phénol, pyrocatéchol...) (TRESSL 1977).
L'acide quinique présente une saveur amère, et serait présent à une concentration supérieure à 200 ppm dans le café boisson (HUGHES et al. 1987).
Les produits de thermolyse de la trigonelline comme l'acide nicotinique sont amers (BELITZ 1975).

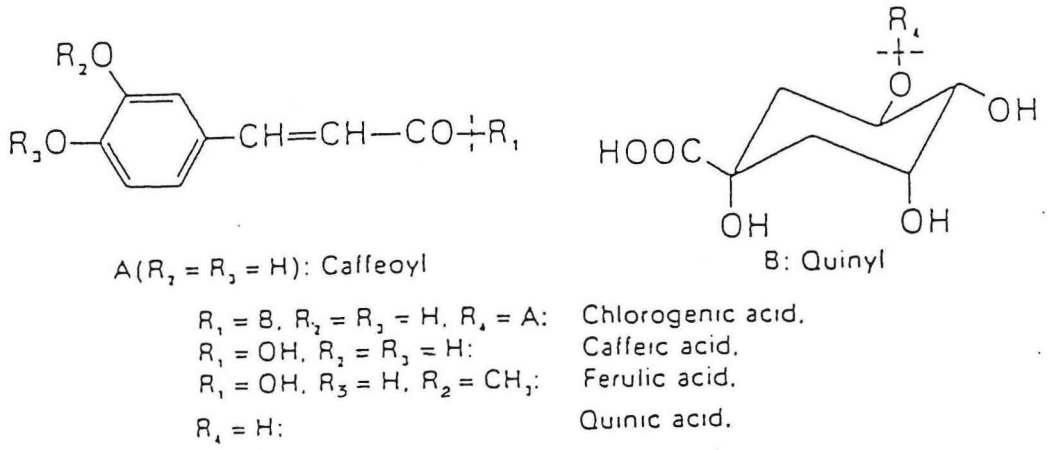


Figure 2. : Structure des acides chlorogéniques du café.

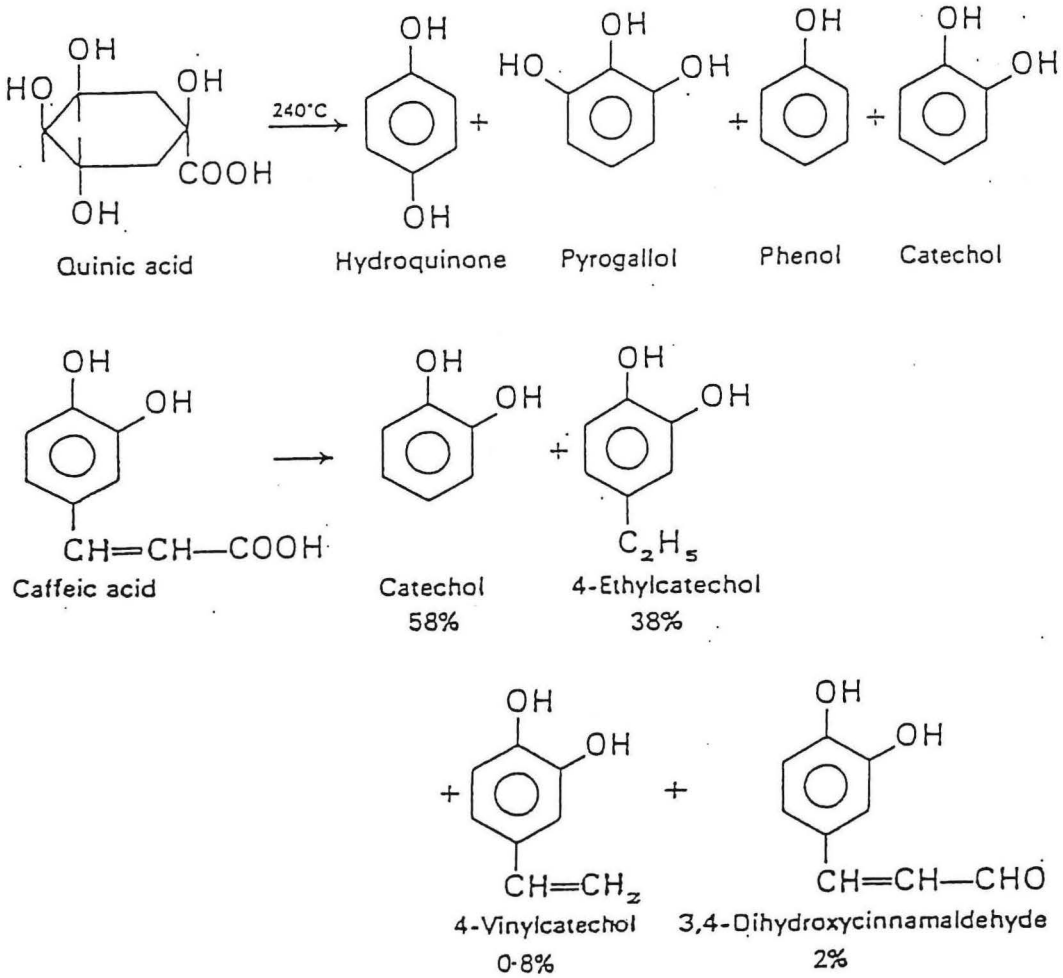


Figure 3. : Dégradation thermique des acides quiniques et caféiques (TRESSL 1977)

Tableau 4 : Composés supposés amers du café torréfié selon BELITZ et al. (1985)

Compound Class	Compound	Taste Threshold (mg/mL)
	Quinic Acid	10
	5-Hydroxymethyl-Furfural	200
	2-Methyl Furan	
	Furfuryl Alcohol	19,24,40
	Trigonelline	
Phenolic Acids	Chlorogenic Acid	20,26,27
	Caffeic Acid	10-90
Carboxylic Acids	Citric Acid	96-590
	Malic Acid	107-350
	Lactic Acid	144-400
	Pyruvic Acid	
	Acetic Acid	22-70
Heterocyclics	Pyrazines e.g. 2,5-dimethyl-pyrazine	1
	Thiazole	
	Quinoline	
Bicyclic Compounds	Phenyl pyridine	
	Caffeine	78-155
Amino Acids, Peptides, Proteins	5-80	
Diketopyrazines		
Alicyclic Ketones		25
Aromatic Ketones		25

III. MATERIELS ET METHODES

Matériel : café décaféiné moulu torréfié Nuit & Jour de J. Vabre.

III.1. Préparation de l'extrait brut

Les différentes étapes conduisant à l'obtention de l'extrait brut sont représentées sur la fig. 4.

III.1.1. Délipidation

Trois lots de 250 g de café sont délipidés à l'appareil de Soxhlet durant 8 h, par de l'éther de pétrole (40-60°C). La poudre délipidée (1) est séchée sous courant d'air.

III.1.2. Extraction à l'eau

La totalité de la mouture délipidée est portée à reflux pendant 1 h dans 2,5 l d'eau. Le marc résiduel est ensuite ré-extrait successivement par 1,6 l d'eau, puis 1 l d'eau.
Les filtrats sont réunis, puis lyophilisés pour conduire à 170 g d'extrait sec (2). Le rendement est de 22,7% par rapport au café de départ.

III.1.3. Extraction au méthanol

Chaque extraction est conduite comme suit :
34 g de poudre lyophilisée sont extraits successivement (12 fois), par 150 ml de méthanol (2 min sous ultra-sons, 10 min sous agitation magnétique), jusqu'à quasi décoloration de l'extrait. A chaque étape, ce dernier est filtré.
Les différents filtrats sont réunis. Le solvant est évaporé sous vide. L'extrait (3) représente 43% de l'extrait sec (2).

III.1.4. Extraction au chloroforme

La fraction méthanolique (3) est extraite successivement 10 fois par 150 ml de chloroforme comme décrit précedemment (cf.III.1.3). L'extrait (4) représente 0,85% de l'extrait sec (2).

III.1.5. Purification sur XAD-4

25 ml de résine amberlite XAD-4 Fluka (20-50 mesh) sont conditionnés pendant 1 h dans de l'eau distillée, puis placés dans une colonne en verre (l=22 cm, d=1,5 cm). La phase est rincée à l'eau, puis au méthanol, et reconditionnée dans l'eau.
L'extrait (4) est repris dans un minimum d'eau, déposé en tête de colonne, et élué successivement par 15 ml d'eau et 250 ml de méthanol. La solution alcoolique est évaporée sous vide, et l'eau restante est éliminée par lyophilisation.
On obtient 230 mg de (5), soit 80% de l'extrait (4).

III.1.6. Purification sur silice : obtention de l'extrait brut

60 g de silice Merck (230-400 mesh) sont préalablement conditionnés pendant 1/2 h dans le solvant d'élution, puis placés dans une colonne en

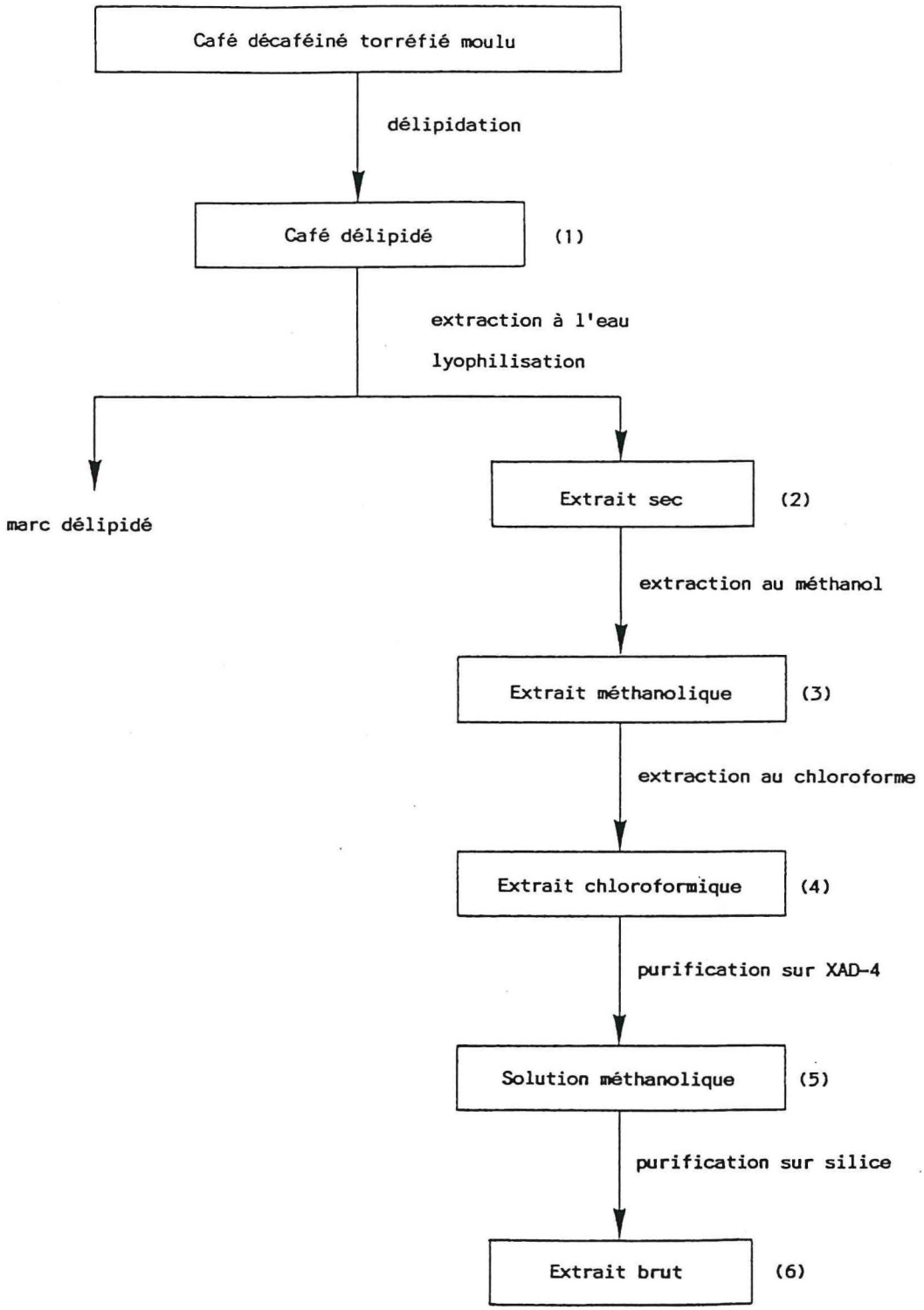


Figure 4. : Schéma d'extraction du café : Obtention de l'extrait brut.

verre (l=28 cm, d=1,9 cm). L'extrait (5) est déposé en tête de colonne et élué par 150 ml de chloroforme/méthanol 8/1 (V/V).
Après élimination du solvant, on obtient 150 mg d'extrait brut (6), soit 66% de (5) ou 0,1% du café de départ. Cet extrait brut doit être conservé à -18°C.

III.2. Caractérisation de l'extrait brut

III.2.1. Techniques chromatographiques

III.2.1.1. Analyse des dicétopipérazines

*** Chromatographie sur couche mince**

- plaques de silice 60 : analytique (Merck 5626) et préparative (Merck 5745)

- solvant d'élution : chloroforme/méthanol 8/1 (V/V)

- révélation : une solution (V/V) de iodure de potassium à 85% et d'acide acétique à 2% est saturée par de l'ortho-toluidine.
La plaque est placée 10 min en atmosphère de chlore (eau de Javel + HCl fumant), laissée 1 min sous courant d'air, puis révélée. Les taches obtenues sont assez fugaces.

*** Chromatographie en phase gazeuse**

Conditions chromatographiques :

- Chromatographe : Varian 3300 (détecteur FID), Hewlett-Packard 5710 A (détecteur NPFID)
- Enregistreur-intégrateur : Hewlett-Packard 3390 A, Shimadzu CR-3A

- colonne capillaire J & W Scientific DB 210 l=30 m, épaisseur de la couche de phase stationnaire : 0,25 µm

- températures : injecteur : 250°C
  détecteur : 250°C
  four : programmation 140 à 240°C - 2°C/min
- gaz : débit d'hydrogène: 35 ml/min
  débit d'air: 240 ml/min
  gaz vecteur: hélium
  colonne: 3 ml/min
  rapport de la division à l'injecteur: 16
  ajout de gaz vecteur: 35 ml/min (24 ml/min avec le détecteur NPFID).

III.2.1.2. Analyse des acides aminés

* Chromatographie sur couche mince

- plaques de silice analytique (Merck 5721)

- solvant d'élution : butanol/ acide acétique glacial/ eau (80/20/20 V/V/V)

- révélation : 0,3 g de ninhydrine sont dissous dans 100 ml de butanol, puis 3 ml d'acide acétique glacial sont ajoutés (la révélation est assez fugace).
Les Rf des acides aminés sont comparés à ceux de témoins commerciaux.

*** Chromatographie liquide haute pression**

Chromatographe Beckman 420 (four isotherme)

- colonne RP 18
- détecteur à fluorimétrie
- débit : 1,2 ml/min
- éluant : A acétate de sodium 0,01 M pH 6 + 1% THF
  B méthanol
- gradient : 0 min 12,5% de B, 8 min 45% de B, 16 min 67% de B, 28 min 100% de B, 31 min 12,5% de B.

Préparation de l'échantillon : tout échantillon est dissous dans un tampon borate de sodium 0,4 N (pH 9,5) et soumis à une dérivatisation pré-colonne par l'OPA (orthophtaldialdéhyde).

III.2.2. Analyse de l'extrait brut

L'extrait brut et ses fractions sont analysés par CCM et par CPG.

III.2.3. Fractionnement de l'extrait brut

*** Chromatographie sur colonne de silice**

La colonne est préparée selon III.1.6 et 150 mg de l'extrait brut sont élués par du chloroforme/méthanol 9/1 (V/V). 150 tubes de 4ml sont recueillis.

*** Chromatographie préparative sur couche mince**

Après élution de 75 mg d'extrait brut, trois bandes I (Rf 1-0,85), II (Rf 0,60-0,50) et III (Rf 0,48-0,32) sont récupérées par du méthanol. Le profil chromatographique des fractions II et III présente d'importantes analogies avec l'extrait brut.

*** Hydrolyse des fractions I, II et III**

Les trois fractions sont hydrolysées par HCl 6 N, à 110°C pendant 24 h. Les hydrolysats sont analysés par CCM et par HPLC.

III.2.4. Synthèse de dicétopipérazines : cyclo (LEU-PHE)

Remarque : les dicétopipérazines commerciales dont nous disposons sont : cyclo (PHE-SER), cyclo (PRO-GLY), cyclo (LEU-GLY) et cyclo (LEU-ALA).

La préparation de cyclo (LEU-PHE) est représentative de celle des cinq autres dicétopipérazines cyclo (PHE-VAL), cyclo (ALA-VAL), cyclo (LEU-VAL), cyclo (ILEU-VAL) et cyclo (ILEU-PHE).

Toutes les réactions sont effectuées à température ambiante.
Réactifs:
- N-tertiobutoxycarbonyl phénylalanine (BOC-PHE-OH)

- 1,8 diazabicyclo- 5,4-O undec-7-ène (DBU) 6,71 mmol/ml
- acide trifluoroacétique (TFA)
- N-tertiobutyloxycarbonyl leucine (BOC-LEU-OH)
- diméthylformamide (DMF)
- (benzotriazolyl)oxy tris(diméthylamino-phosphonium) (BOP)
- N-méthylmorpholine (NMM) 9,01 mmol/ml
- N,N- diisopropyléthylamine (DIEA) 5,81 mmol/ml

III.2.4.1. Préparation de BOC-PHE-CAM

10 g (37 mmol) de BOC-PHE-OH en solution dans 40 ml d'acétonitrile sont estérifiés, sous agitation magnétique, par 3,08 g de chloroacétamide (33 mmol), en présence de 5,5 ml (37 mmol) de DBU.
La réaction est suivie par CCM (plaque de silice 60, éluant: acétate d'éthyle, révélation à chaud en deux temps : ninhydrine, puis acide sulfurique), et arrêtée lorsque l'apparition de l'ester BOC-PHE-CAM est significative par rapport à la disparition du chloroacétamide.
Après ajout d'acétate d'éthyle, la solution est lavée successivement par KHSO4 1N, NaHCO3 et NaCl (saturés).
La phase acétate d'éthyle est évaporée sous vide et conduit à 9,44 g (29 mmol) d'ester BOC-PHE-CAM (rendement de 89% par rapport à l'acide aminé de départ).

III.2.4.2. TFA-H-PHE-CAM

Dans un ballon surmonté d'une garde remplie de Silicagel, 9,34 g (29 mmol) de BOC-PHE-CAM réagissent avec un minimum de TFA pendant 30 min. Après co-évaporation à l'hexane, le composé est précipité à l'éther. La filtration sur fritté conduit à 7,28 g (22 mmol) de TFA-H-PHE-CAM (rendement de 75% par rapport à l'ester de départ).

III.2.4.3. BOC-LEU-PHE-CAM

2 g (5,95 mmol) de TFA-H-PHE-CAM en solution dans un minimum de DMF, sont couplés avec 1,51 g (6,07 mmol) de BOC-LEU-OH, en présence de 2,68 g (6,07 mmol) de BOP et de 1,33 ml (12,02 mmol) de NMM, sous agitation magnétique.
La réaction est suivie par CCM (cf.III.2.4.1) et arrêtée lorsque l'apparition de BOC-LEU-PHE-CAM est significative par rapport à la disparition de TFA-H-PHE-CAM.
Après ajout d'acétate d'éthyle, la solution est lavée successivement avec KHSO4 1N, NaHCO3 et NaCl (saturés).
La phase acétate d'éthyle est évaporée sous vide et conduit à 2,67 g (5,89 mmol) de BOC-LEU-PHE-CAM (rendement de 99% par rapport à TFA-H-PHE-CAM).

III.2.4.4. TFA-LEU-PHE-CAM

Dans un ballon surmonté d'une garde remplie de Silicagel, 2,44 g (5,38 mmol) de BOC-LEU-PHE-CAM réagissent avec un minimum de TFA pendant 30 min. Après co-évaporation à l'hexane, le composé est précipité à l'éther. La filtration sur fritté conduit à 2,45 g (5,24 mmol) de TFA-H-LEU-PHE-CAM (rendement de 97% par rapport à BOC-LEU-PHE-CAM).

III.2.4.5. Cyclo (LEU-PHE)

2,21 g (4,72 mmol) de TFA-H-LEU-PHE-CAM, en solution dans 10 ml d'acétonitrile sont cyclisés en présence de 0,81 ml (4,72 mmol) de DIEA (8) pendant 24 à 48 h, sous agitation magnétique.
On obtient 0,48 g (1,85 mmol) de cyclo (LEU-PHE), soit un rendement de 39% par rapport à TFA-H-LEU-PHE-CAM.

Synthèse des autres dicétopipérazines

La réaction de cyclisation peut être lente comme dans le cas de cyclo (PHE-VAL) où il est nécessaire de laisser la réaction se poursuivre pendant plusieurs jours, voire de chauffer à 50°C.

III.2.5. Analyse des dicétopipérazines synthétisées

Les dicétopipérazines synthétisées sont analysées par spectrométrie de masse (LKB 2091, mode IE 70 eV, introduction directe), résonnance magnétique nucléaire (Brüker 300 MHz, DMSO (D6)), CPG et par spectrophotométrie UV (Beckman 25).

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Afin de s'affranchir d'une partie des problèmes d'extraction et de purification, la présence de dicétopipérazines est recherchée dans du Robusta décaféiné torréfié (caféine 0,1%). Le choix de cette matière première se justifie si l'on considère que les cafés décaféinés ou non développent également un potentiel amer à la torréfaction.

IV.1. Analyse de l'extrait brut

Le protocole d'extraction, dérivant de ceux déjà publiés (PICKENHAGEN et al. 1975, SAKAMURA et al. 1978, VAN DER GREEF et al. 1987), permet d'obtenir 150 mg d'extrait brut correspondant à 150 g de café de départ (cf.III.1).

L'élution sur couche mince de silice par du chloroforme/méthanol 8/1, suivie d'une révélation à l'iodure de potassium permet de mettre en évidence la présence de treize taches brun pâle et de deux taches qui apparaissent quantitativement plus importantes (Rf 0,58 brun foncé et Rf 0,51 brun orangé).
L'ensemble de ces composés présente des Rf compris entre 0,25 et 0,80 (tab. 5).

Tableau 5. Rf des composés de l'extrait brut et de ses fractions I, II et III (gel de silice, élution chloroforme/méthanol 8/1)

Extrait brut	0,80	0,75	0,70	0,65	0,62	0,58	0,55	0,51	0,48
	0,45	0,42	0,35	0,32	0,29	0,25			
Fraction I	0,91								
Fraction II	0,91	0,74							
Fraction III	0,65	0,55							

Dans les mêmes conditions chromatographiques, des témoins d'origine commerciale ou de synthèse conduisent à des taches jaune orangé dont les Rf sont compris entre 0,34 et 0,66 (tab. 6).

Le profil chromatographique en phase gazeuse a été déterminé sur deux appareils différents, l'un équipé d'un détecteur FID, l'autre d'un détecteur spécifique NP-FID, (fig. 5 et 6). Les profils obtenus sont très comparables et permettent de confirmer que l'extrait brut est pratiquement constitué de dérivés azotés (le composé n°13 n'est pas azoté).
Dans les mêmes conditions chromatographiques, les témoins commerciaux et de synthèse ont des temps de rétention du même ordre (fig. 7, tab. 6).

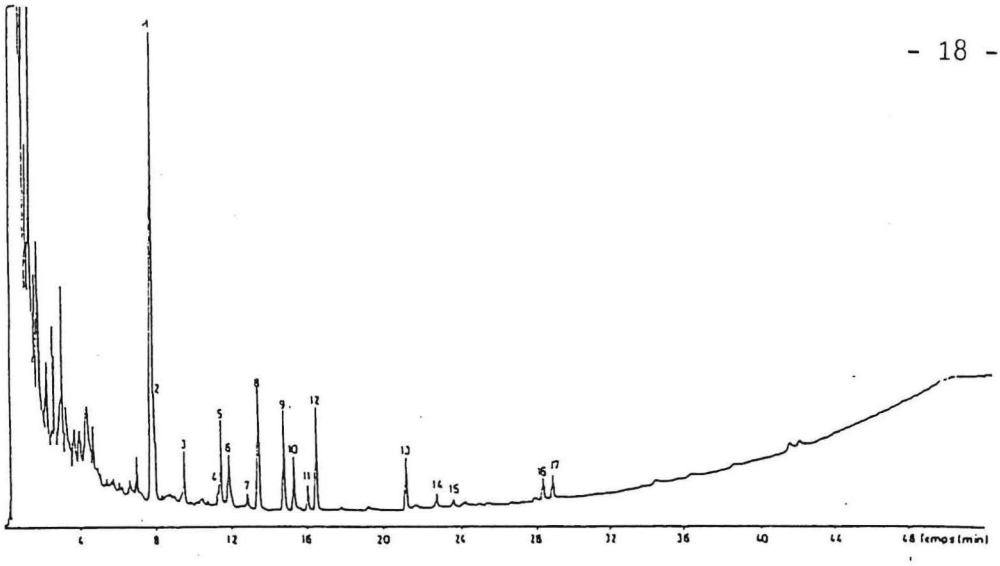


Figure 5. : Profil chromatographique de l'extrait brut
— détecteur FID (conditions Cf. III.2.1.)

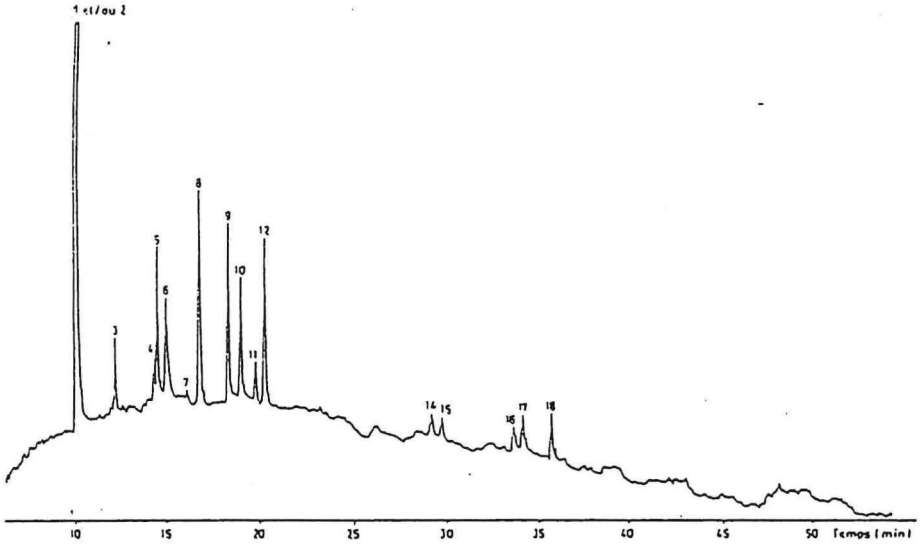


Figure 6. : Profil chromatographique de l'extrait brut
— détecteur NP FID (conditions Cf. III.2.1.)

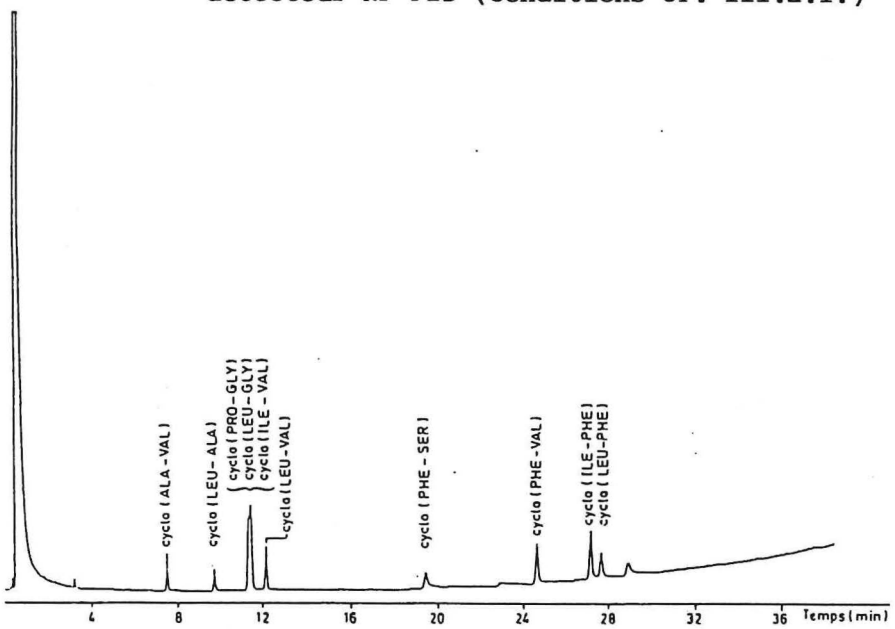


Figure 7. : Profil chromatographique des dix decétopipérazines témoins — détecteur FID (conditions Cf.III.2.1)

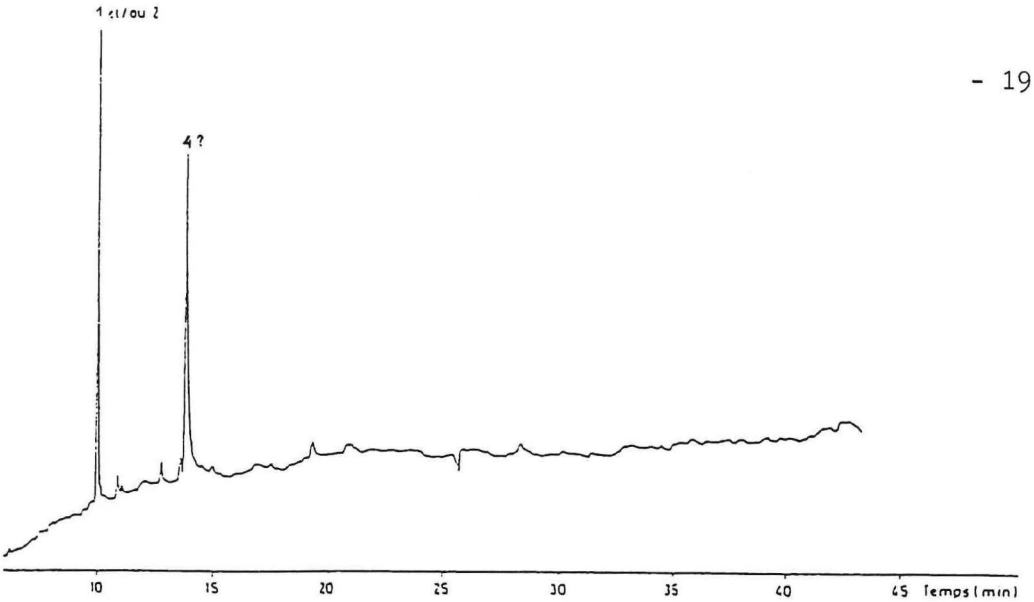


Figure 8. : Profil chromatographique de la fraction I — détecteur NP-FID (Conditions Cf. III.2.1.)

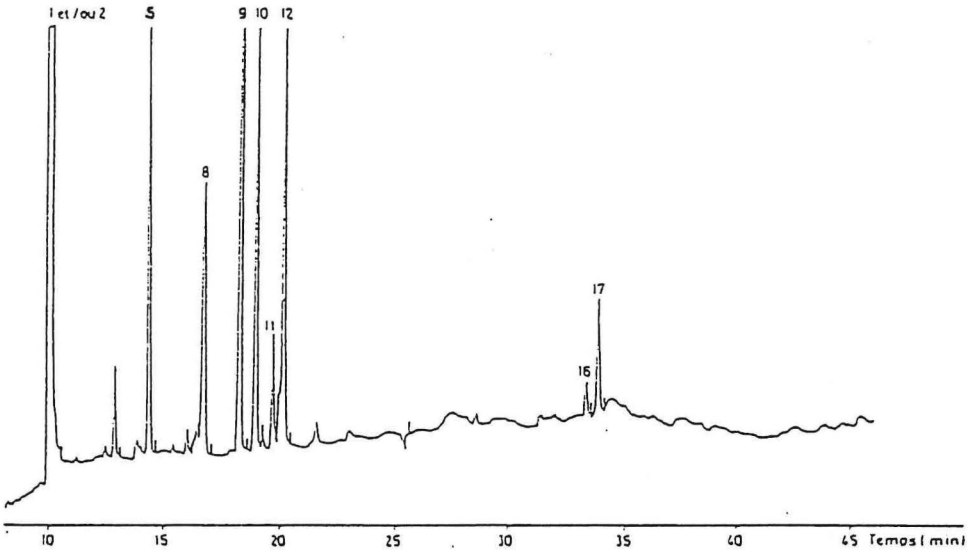


Figure 9. : Profil chromatographique de la fraction II — détecteur NP-FID. (Conditions Cf. III.2.1.)

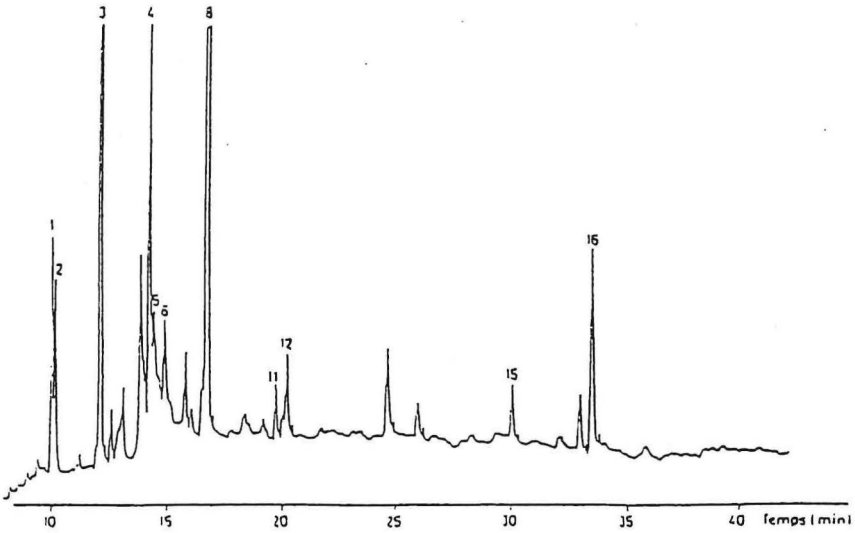


Figure 10. : Profil chromatographique de la fraction III — détecteur NP-FID. (Conditions Cf. III.2.1.)

Tableau 6. Caractéristiques chromatographiques des dicétopipérazines synthétisées et commerciales.

	dicétopipérazines	tr (min)	Rf
	cyclo (ALA-VAL)	7,96	0,54
s	cyclo (ILE-PHE)	27,85	0,58
y	cyclo (LEU-VAL)	12,88	0,61
n	cyclo (ILE-VAL)	12,01	0,63
t	cyclo (PHE-VAL)	25,15	0,64
	cyclo (LEU-PHE)	28,43	0,66
c	cyclo (PHE-SER)	19,62	0,34
o	cyclo (PRO-GLY)	11,74	0,44
m	cyclo (LEU-GLY)	11,89	0,48
	cyclo (LEU-ALA)	9,93	0,53

tr : CPG-FID (conditions cf.III.2.1.1),
Rf : CCM (conditions cf.III.2.1.1).

L'analyse de l'extrait brut par HPLC révèle la présence d'acides aminés libres en faible quantité par rapport à celle des acides aminés obtenus après hydrolyse de l'extrait brut (tab. 7).
Les acides aminés libres les plus abondants avant hydrolyse sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'asparagine et la sérine.

Les acides aminés les plus abondants dans l'extrait brut hydrolysé sont l'alanine, la leucine, la valine, l'acide glutamique, l'isoleucine, la glycine et la phénylalanine (tab. 7).

IV.2. Analyse des fractions I, II et III de l'extrait brut

Les trois fractions obtenues par CCM préparative (cf.III.2.3) contiennent des acides aminés libres en faible quantité par rapport aux acides aminés présents dans ces mêmes fractions hydrolysées (tab. 7).

IV.2.1. Fraction I

L'élution sur couche mince de silice par du chloroforme/méthanol 8/1, suivie d'une révélation à l'iodure de potassium ne met en évidence que la présence d'un seul composé (tab. 5).

L'analyse chromatographique (CPG-FID) met en évidence la présence du composé non azoté n°13. L'utilisation d'un détecteur spécifique (NP-FID) montre que cette fraction contient deux composés azotés principaux l'un correspond au pic n°1 et/ou 2, l'autre pourrait correspondre au pic n°4 de l'extrait brut (fig. 8).

La fraction I hydrolysée contient peu d'acides aminés. Ce résultat est confirmé par l'absence de taches sur couche mince de silice.

IV.2.2. Fraction II

L'analyse chromatographique sur couche mince révèle la présence de deux composés (tab. 5).

Tableau 7. Acides aminés libres (AAL) et totaux (AAT) de l'extrait brut et de ses fractions I, II et III.

A.aminés	Extrait brut		Fraction I		Fraction II		Fraction III	
	AAL	AAT	AAL	AAT	AAL	AAT	AAL	AAT
ASP	42,1	105,6	0,46	1,39	0,47	4,28	0,27	4,00
GLU	30,5	316,1	0,24	3,42	0,39	9,37	0,21	10,97
ASN	15,2		0,10		0,25		0,10	
SER	16,1	69,6	1,75	2,39	0,58	2,83	0,37	2,69
GLN	nd		0,04		0,05		0,03	
HIS	nd	3,1	0,10	0,37	0,07	0,33	0,07	0,57
GLY	11,9	211,6	0,49	3,19	0,44	7,13	0,19	5,80
THR	5,9	67,1	0,44	0,96	0,17	1,64	0,58	1,84
ARG	0,6	10,7	0,10	0,55	nd	0,88	nd	1,16
ALA	9,5	677,3	0,75	2,10	0,78	12,85	0,64	49,1
MET	nd	5,1	0,02	0,12	0,02	0,71	0	0,25
VAL	2,9	403,2	0,19	1,28	0,31	74,4	0,21	40,50
PHE	1,7	175,1	0,13	0,73	0,16	31,68	0,10	14,31
ILE	1,3	217,0	0;10	2,79	0,29	43,10	0,31	9,76
LEU	2,2	474,0	0,20	1,49	0,75	143,8	0,17	15,15
LYS	nd	25,4	nd	nd	nd	1,44	nd	nd

Extrait brut : nmol/ml ; fractions : nmol/échantillon. Les résultats ne peuvent être comparés entre eux car la concentration des solutions n'est pas connue.

Les profils chromatographiques obtenus par CPG (FID/NPFID) sont respectivement qualitativement comparables à celui de l'extrait brut, à la différence près que les composés n°3 et 6 sont absents de cette fraction. Les composés majeurs de la fraction II correspondent aux pics n°1 et/ou 2, 5, 8, 9, 10 et 12 de l'extrait brut (fig. 9).

Les acides aminés les plus abondants de la fraction II hydrolysée sont la leucine, la valine, l'isoleucine et la phénylalanine (tab. 7).

IV.2.3. Fraction III

Deux composés sont révélés par chromatographie sur couche mince (tab. 5). Six composés azotés principaux sont mis en évidence par CPG. Ces derniers correspondent aux pics n°1, 2, 3, 4, 8 et 16 de l'extrait brut (fig. 10).

La fraction III hydrolysée contient principalement quatre acides aminés, l'alanine et la valine, la leucine et la phénylalanine étant respectivement présents en quantité quasi équimolaire (tab. 7).

IV.3. Comparaison des composés de l'extrait brut et de ceux des fractions à des dicétopipérazines témoins

La présence de dicétopipérazines dans l'extrait brut a été recherchée par couplage GC-MS. Malheureusement les résultats se sont révélés infructueux. Vu la difficulté d'isoler les constituants du mélange, nous avons postulé la présence de dicétopipérazines dans cet extrait. Les fractions I, II et III ont alors été comparées à des composés témoins. La synthèse de ces derniers s'impose en raison du nombre limité de dicétopipérazines commercialisées.
Parmi les sept acides aminés les plus abondants de l'extrait brut, cinq d'entre eux (la valine, l'alanine, la phénylalanine, la leucine et l'isoleucine) se retrouvent dans les fractions II et III. Les différentes combinaisons deux à deux conduisent à dix possibilités de dicétopipérazines. Seule cyclo (LEU-ALA) est commercialisée.
Nous avons choisi de synthétiser six de ces composés : cyclo (LEU-VAL), cyclo (ILE-VAL), cyclo (ALA-VAL), cyclo (LEU-PHE), cyclo (ILE-PHE) et cyclo (PHE-VAL).
Les caractéristiques spectrales de ces composés sont données dans les annexes 1 à 8.

Les chromatogrammes des fractions I, II et III supplémentées respectivement avec les dix dicétopipérazines témoins mettent en évidence trois groupes de composés :

* Cyclo (ALA-VAL) et cyclo (LEU-PHE) correspondent respectivement aux composés n°2 et 16. Leur présence dans la fraction III est confirmée par les deux taches en CCM (Rf 0,55 et 0,65 respectivement), et par les acides aminés de l'hydrolysat, alanine et valine, leucine et phénylalanine présents respectivement en quantité quasi équimolaire.

* La présence des trois dicétopipérazines cyclo (PRO-GLY), cyclo (LEU-GLY) et cyclo (ILE-VAL) n'a pu être définitivement ni confirmée, ni infirmée ; cependant leurs temps de rétention sont tout à fait comparables avec ceux des différents composés constitutifs du pic n°6. Ce pic correspond à un mélange d'au moins quatre composés (démontré par des conditions différentes d'analyse par CPG).

* Cyclo (LEU-ALA), cyclo (LEU-VAL), cyclo (PHE-VAL), cyclo (ILE-PHE) et cyclo (PHE-SER) sont vraisemblablement absents de l'extrait brut ou ne peuvent au mieux que correspondre à des composés très minoritaires.

Différents arguments plaident en faveur de la présence de dicétopipérazines dans l'extrait brut :

1) l'identification de cyclo (ALA-VAL) et cyclo (LEU-PHE) n'est pas définitive, mais l'ensemble des résultats analytiques conduit logiquement à postuler la présence de ces deux composés dans l'extrait brut. Ceux-ci ne correspondent cependant qu'à des composés mineurs.

2) l'extrait brut est constitué d'au moins une quinzaine de composés azotés qui ne sont ni des acides aminés libres, ni des peptides (composés peu solubles dans le chloroforme/méthanol et dont le Rf est trop faible) et qui conduisent à la libération d'acides aminés après hydrolyse.

3) nous n'avons comparé l'extrait brut qu'à un nombre limité de dicétopipérazines et les résultats de l'hydrolyse de cet extrait montrent que les possibilités restantes sont nombreuses (impliquant la participation de l'acide aspartique, l'acide glutamique et la glycine). Toutefois la présence d'autres dicétopipérazines dans l'extrait brut impliquerait qu'elles soient minoritaires. En effet, cyclo (ALA-VAL) et cyclo (LEU-PHE) conduisant pourtant à des concentrations élevées en acides aminés dans les hydrolysats, sont minoritaires dans l'extrait brut. De plus, les couleurs développées (brun-orangé) par la révélation en CCM des principaux constituants de l'extrait brut sont relativement différentes de celles obtenues à partir de dicétopipérazines témoins (jaune-orangé).

4) la formation de dicétopipérazines a été montrée dans des produits alimentaires ayant subi un traitement thermique. Cependant, la température du traitement est, dans le cas du cacao par exemple, beaucoup plus faible que celle rencontrée au cours de la torréfaction du café. Il reste donc à savoir si une température élevée ne conduit pas à la dégradation des dicétopipérazines après leur formation in-situ.

Ce travail demande à être poursuivi par un fractionnement complet afin d'individualiser chaque composé.

V. CONCLUSION

L'amertume du café torréfié peut être attribuée à la présence de nombreux composés constitutifs tels qu'acides phénols, caféine... ou formés lors de la torréfaction.
Par analogie avec les travaux effectués sur le malt et le cacao, nous avons cherché à caractériser la présence de dicétopipérazines dans le café, composés formés par cyclisation intramoléculaire de peptides lors d'un traitement thermique.
Le protocole d'extraction dérivant de ceux déjà publiés a conduit à l'obtention d'un extrait brut (rendement 0,1% par rapport au café de départ) contenant une quinzaine de composés azotés, qui ne sont ni des acides aminés libres, ni des peptides, mais qui libèrent des acides aminés après hydrolyse.
La teneur en acides aminés totaux des trois fractions issues de l'extrait brut a conduit à synthétiser six dicétopipérazines témoins. Ces composés ainsi que quatre témoins commerciaux ont été comparés aux trois fractions de l'extrait brut. Cette comparaison a permis de postuler la présence de cyclo (ALA-VAL) et de cyclo (LEU-PHE) qui ne sont cependant que des composés mineurs.
Les résultats montrent que si l'extrait brut contient d'autres dicétopipérazines, elles sont minoritaires.

ANNEXES 1 A 8 :

CARACTERISTIQUES SPECTRALES DES DICETOPIPERAZINES SYNTHETISEES AU COURS DE CE TRAVAIL.

Annexe 1

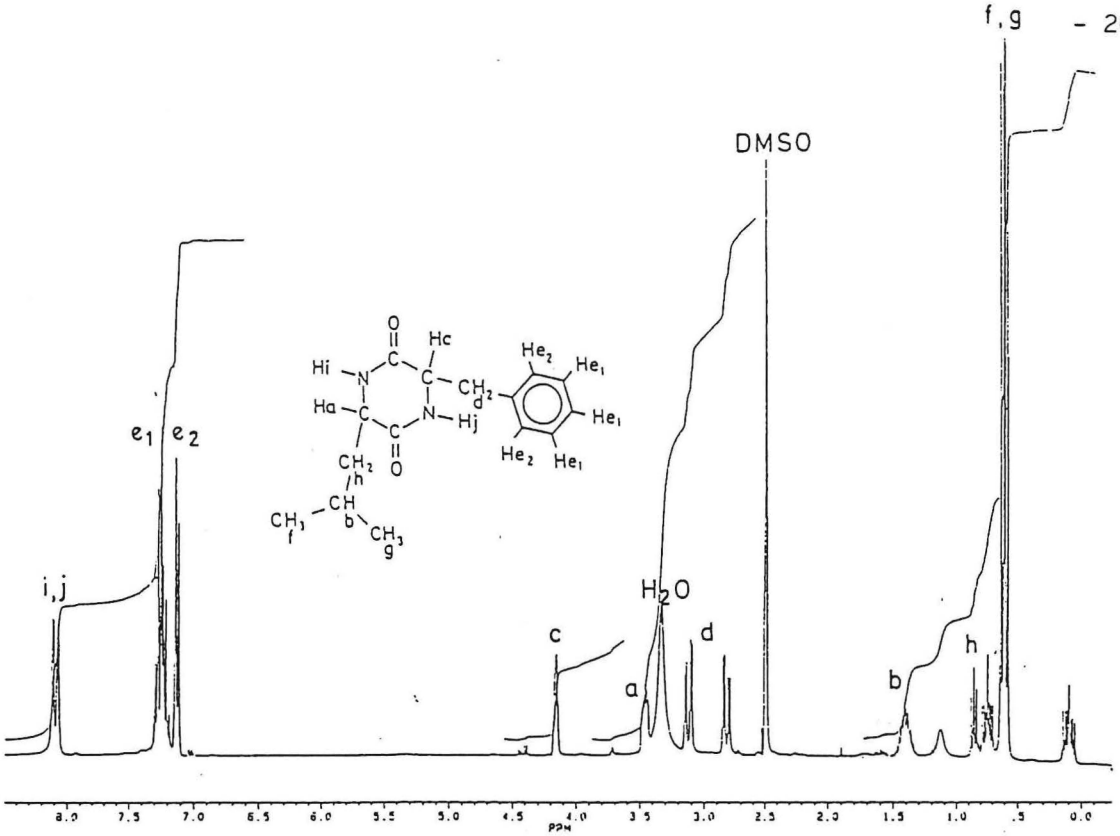
Principaux fragments (et abondance relative) en spectrométrie de masse des dicétopipérazines synthétisées (* Pic moléculaire).

c.(PHE-VAL)	c.(ILE-PHE)	c.(LEU-PHE)	c.(LEU-VAL)	c.(ILE-VAL)	c.(ALA-VAL)
91 (100)	91 (100)	91 (100)	156 (100)	113 (100)	44 (100)
127 (64)	113 (46)	141 (85)	72 (98)	156 (100)	128 (100)
85 (50)	85 (44)	204 (59)	113 (89)	72 (75)	72 (75)
246* (42)	141 (40)	44 (50)	86 (77)	86 (61)	113 (56)
72 (31)	204 (34)	113 (45)	43 (52)	85 (53)	99 (42)
113 (29)	41 (21)	72 (39)	41 (47)	41 (50)	127 (37)
155 (28)	260* (19)	43 (36)	114 (45)	170 (33)	43 (32)
92 (25)	86 (18)	260* (34)	212*(0,8)	212*(0,4)	170*(0,7)

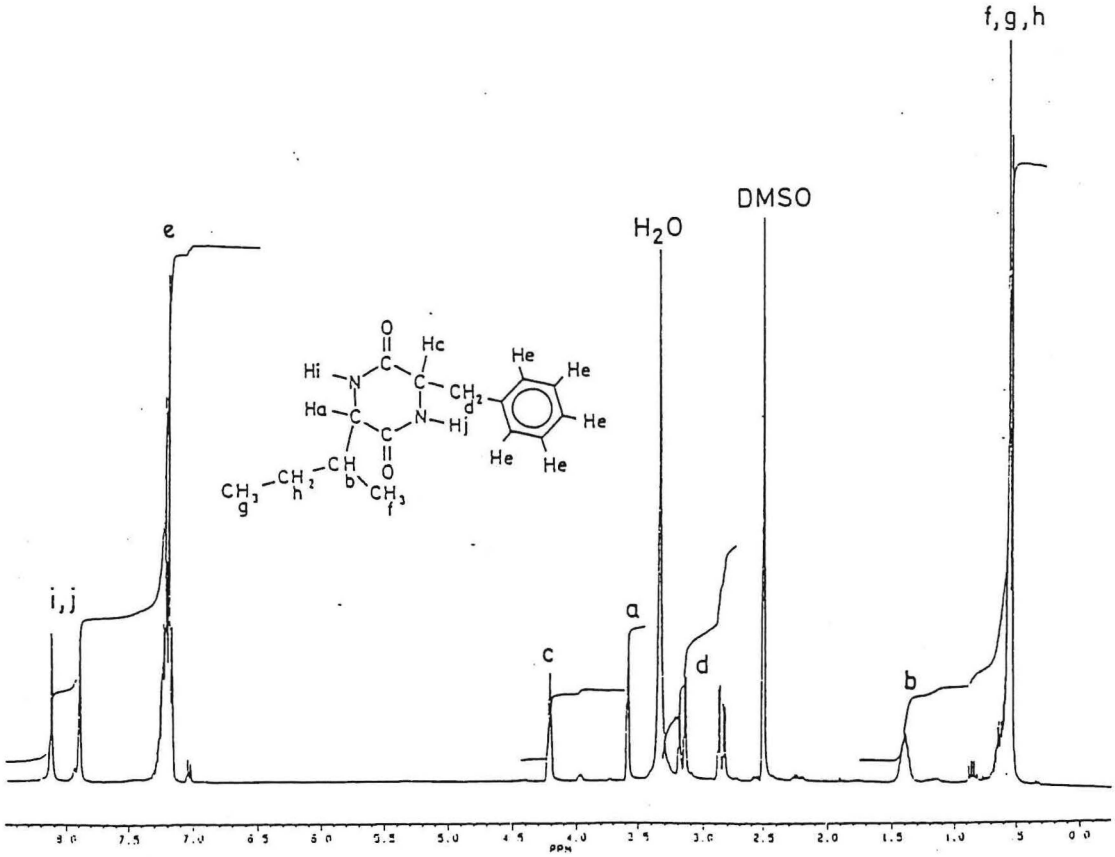
Annexe 2

Caractéristiques spectrophotométriques (UV) des dicétopipérazines synthétisées.

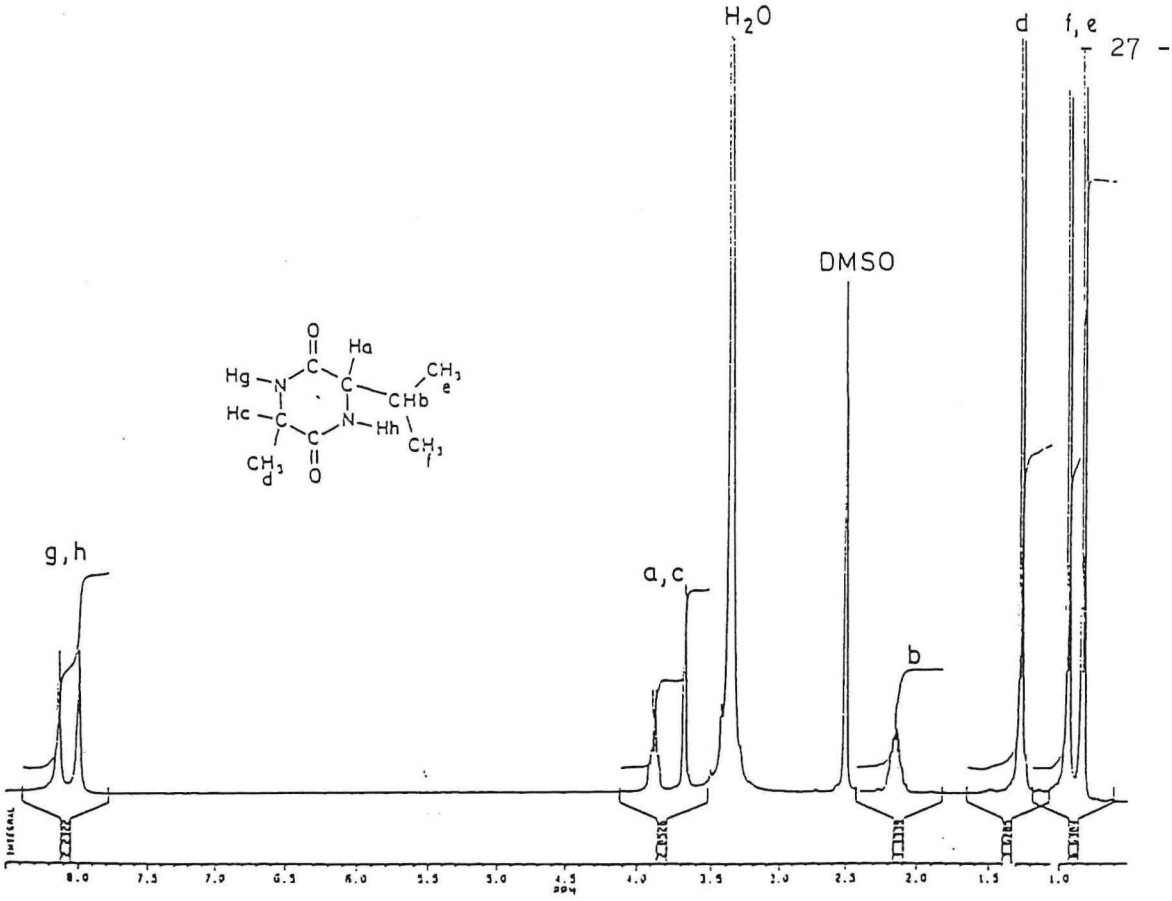
dicétopipérazines	λ max (nm)	log ϵ (molaire)
cyclo (PHE-VAL)	221	3,24
cyclo (ALA-VAL)	215	2,98
cyclo (LEU-VAL)	215	3,05
cyclo (ILE-VAL)	215	2,98
cyclo (LEU-PHE)	220	3,10
cyclo (ILE-PHE)	219	3,29



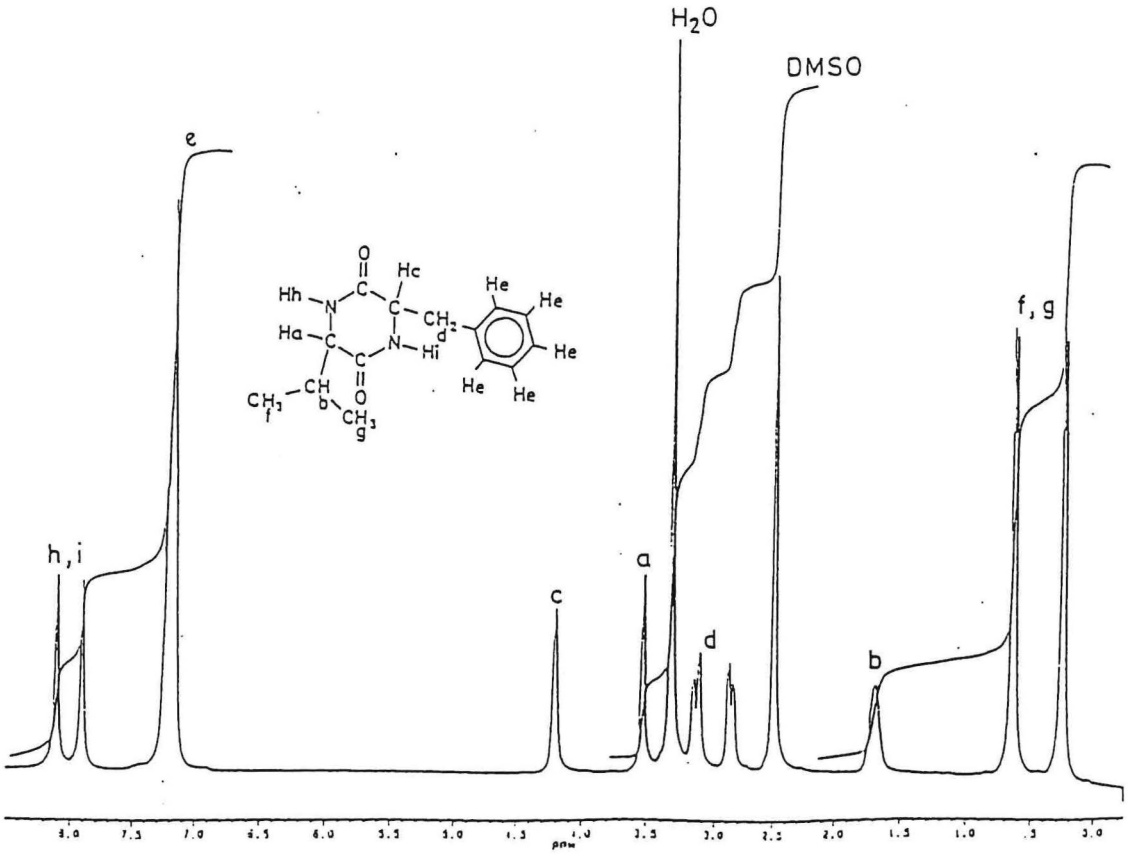
Annexe 3 : Spectre RMN (proton) de cyclo (LEU-PHE)



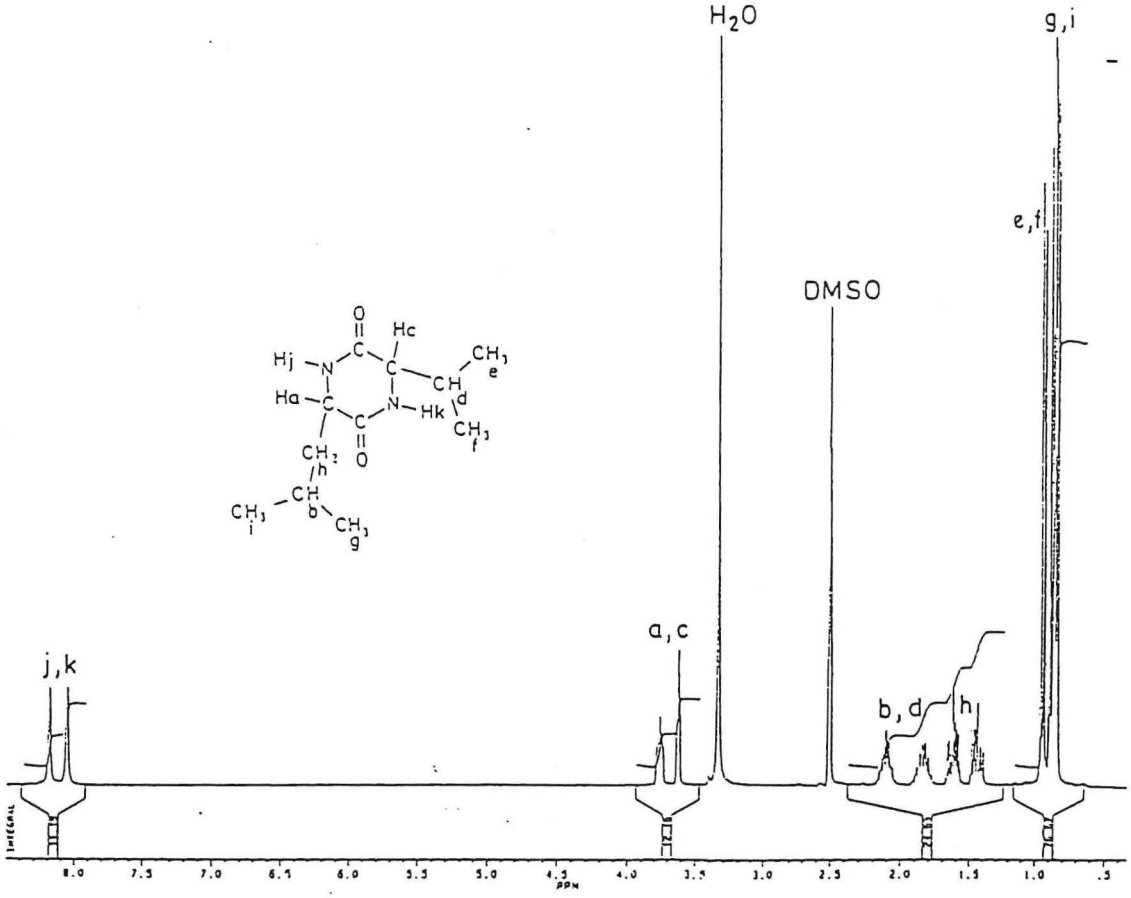
Annexe 4 : Spectre RMN (proton) de cyclo (ILE-PHE)



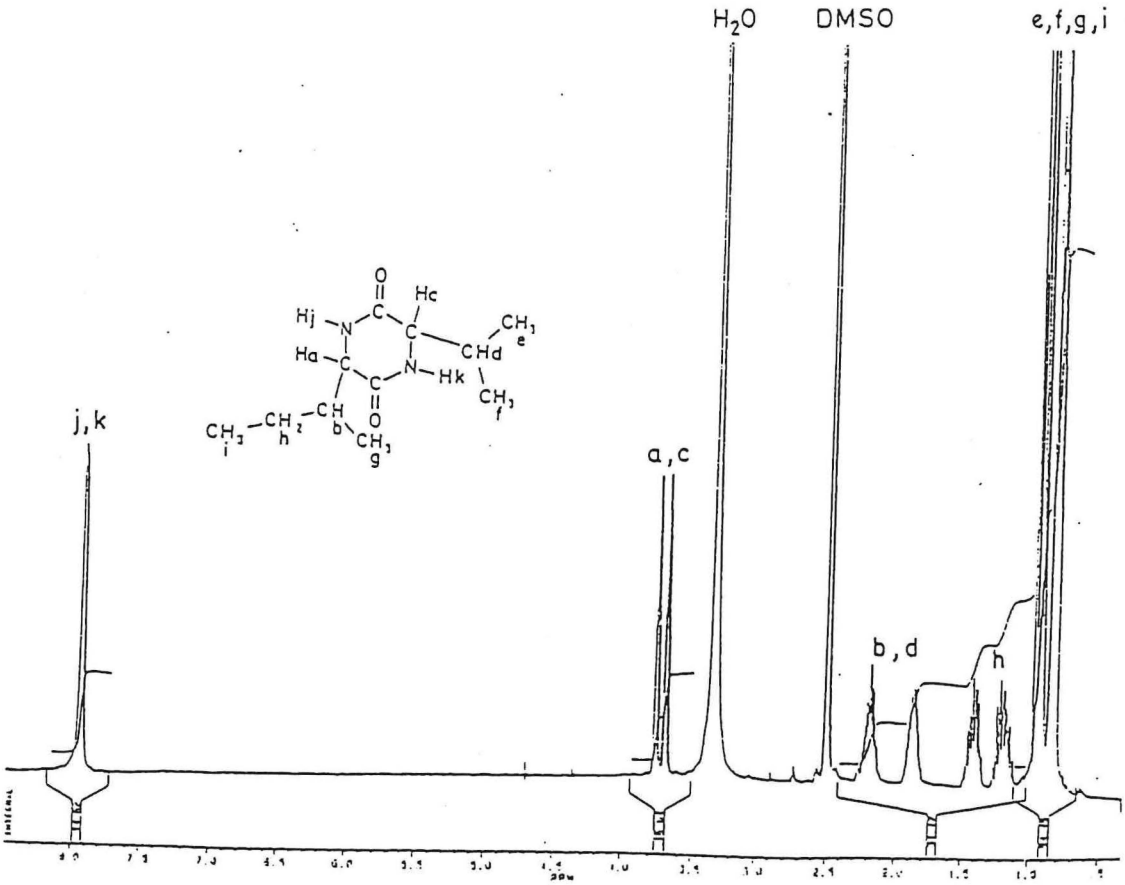
Annexe 5 : Spectre RMN (proton) de cyclo (ALA-VAL)



Annexe 6: Spectre RMN (proton) de cyclo (PHE-VAL)



Annexe 7 : Spectre RMN (proton) de cyclo (LEU-VAL)



Annexe 8 : Spectre RMN (proton) de cyclo (ILE-VAL)

BIBLIOGRAPHIE

BELITZ H.D. 1975. Geschmacksaktive Substanzen in Kaffee. ASIC. 7th.Colloq, Hamburg, 243-252.

BELITZ H.D., WIESER H. 1985. Bitter compounds : occurence and structure-activity relationships. Foods Reviews International, 1, 2, 271-354.

BRIESKORN C.H. 1990. Physiological and therapeutical aspects of bitter compounds. In "Bitterness in Foods and Beverages". Ed : ROUSEEF R. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

CHASSEVENT F., ORNANO M., POUGNEAUD S. 1967. Composition et caractéristiques chimiques de Coffea sauvages de Madagascar. IV. Isolement et étude de la structure de la cafamarine, substance amère de C. Buxifolia. Café, Cacao, Thé, XI, 4, 343-349.

DUCRUIX A., PASCARD C., HAMMONNIERE M., POISSON J. 1977. The crystal and molecular structure of mascarozide, a new bitter glycoside from coffee beans. Acta Cryst, 33, 2846-2850.

HARDWICK W.A. 1977. Interactive Flavor Influence of Some Materials in Different Foods and Beverages, ch.6. In Flavor : Its Chemical Behavioral, and Commercial Aspects. Ed : APT C.M., Westview Press. Boulder, CO, USA.

HUGHES W.J., THORPE T.M. 1987. Determination of Organic Acids and Sucrose in Roasted Coffees by Capillary Gas Chromatography. J. Food Science, 52, 1078.

NAGEL C.W., HERRICK E.W. and GRABER W.R. 1987. Is Chlorogenic Acid Bitter ? J. Food Science, 52, 1, 213.

OBERDIECK R. 1977. Bitter drugs and bitter substances. Riechst., Aromen, Kosmet., 27, 153-157.

ORDYNSKY G. 1965. The Taste of Chlorogenic Acids. Z. für Ehrnahrungswissenschaft, 5, 3-4, 206.

PANGBORN R.M. 1960. Taste Interrelationships. Food. Research, 25, 2, 245.

PICKENHAGEN W., DIETRICH P. 1975. Identification of the Bitter Principle of Cocoa. Helvetica Chimica Acta, 58, 4, 1078-1086.

ROUSEFF R. 1990. Bitterness in foods products : an overview. In "Bitterness in Foods and Beverages". Ed : ROUSEEF R. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

SAKAMURA S., FURUKAWA K., KASAI T. 1978. Bitter Diketopiperazines in Roasted Malts for Beer Brewing. Agric. Biol. Chem., 42, 3, 607-612.

SHIBA T. and NUNAMI K. 1974. Structure of a bitter peptide in casein hydrolysate by bacterial proteinase. Tetrahedron Letters, 6, 509-512.

TRESSL R. 1977. Study of the Phenols and Diphenols in Different Varieties of Roasted Coffee by Gas Chromatography and Mass Spectrometry. ASIC. 8th. Colloq., Abidjan, 115.

VAN DER GREEF J., TAS A.C., NIJSSEN L.M. and JETTEN J. 1987. Identification and quantification of diketopiperazines by liquid chromatography-mass spectrometry by using a moving-belt interface. J. Chromatog., **394**, 77-88.

VIANI R. 1988. Physiologically Active Substances in Coffee. In "Coffee vol.3 : physiology". Ed : CLARKE R.J. and MACRAE R. Elsevier Science Publishers. Amsterdam.

VOILLEY A., SAUVAGEOT F., DURAND D. 1979. Influence of Some Extraction Parameters on the Bitter Taste of a Coffee Beverage. ASIC. 8th Colloq., Abidjan, 251.

SOMMAIRE

Pages

I. INTRODUCTION 1

II. GENERALITES 3

II.1. Aspect économique 3

II.1.1. Pays producteurs 3

II.1.2. Importations 3

II.2. Technologie des cafés verts 3

II.3. La torréfaction 5

II.4. L'amertume des composés alimentaires 5

II.4.1. Les composés amers dans les aliments 5

II.4.1.1. Les composés amers naturels..... 5
II.4.1.2. Les composés amers issus d'un traitement technologique..... 7

II.4.2. Les composés amers du café 7

II.4.2.1. Les composés amers du café vert 7

II.4.2.2. Les composés amers du café torréfié 8

III. MATERIELS ET METHODES..... 11

III.1. Préparation de l'extrait brut 11

III.1.1. Délipidation 11

III.1.2. Extraction à l'eau 11

III.1.3. Extraction au méthanol 11

III.1.4. Extraction au chloroforme 11

III.1.5. Purification sur XAD-4 11

III.1.6. Purification sur silice : obtention de l'extrait brut..... 11

III.2. Caractérisation de l'extrait brut 13

III.2.1. Techniques chromatographiques 13

III.2.1.1. Analyse des dicétopipérazines..... 13

III.2.1.2. Analyse des acides aminés..... 13

III.2.2. Analyse de l'extrait brut 14

III.2.3. Fractionnement de l'extrait brut 14

III.2.4. Synthèse de dicétopipérazines : cyclo (LEU-PHE)..... 14

III.2.4.1. Préparation de BOC-PHE-CAM..... 15

III.2.4.2. TFA-H-PHE-CAM..... 15

III.2.4.3. BOC-LEU-PHE-CAM..... 15

III.2.4.4. TFA-LEU-PHE-CAM..... 15

III.2.4.5. Cyclo (LEU-PHE)..... 16

III.2.5. Analyse des dicétopipérazines synthétisées..... 16

IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS 17

IV.1. Analyse de l'extrait brut..... 17

IV.2. Analyse des fractions I, II et III de l'extrait brut.... 20

IV.2.1. Fraction I..... 20

IV.2.2. Fraction II..... 20

IV.2.3. Fraction III..... 22

IV.3. Comparaison des composés de l'extrait brut et ceux des fractions à des dicétopipérazines témoins..... 22

V. CONCLUSION..... 24

Annexes..... 25

Bibliographie..... 29

RESUME

Le protocole d'extraction appliqué au café robusta décaféiné torréfié, impliquant différentes étapes d'extraction par solvant (eau, méthanol, chloroforme) et de purification sur colonne (résine XAD-4, gel de silice) conduit à l'obtention d'un extrait brut (0,1% du café de départ) contenant une quinzaine de composés azotés.

Cet extrait est séparé en trois fractions par chromatographie sur couche mince préparative, dont deux conduisent, après hydrolyse acide, à la libération de leucine, valine, alanine, isoleucine et phenylalanine.

La co-chromatographie (CPG) des fractions et de dicétopipérazines témoins (commercialisées et de synthèse) indique la présence de cyclo (ALA-VAL) et cyclo (LEU-PHE), composés qui sont cependant minoritaires dans l'extrait brut.

Les résultats indiquent en outre que d'autres dicétopipérazines pourraient être présentes dans l'extrait brut, mais également en tant que composés mineurs.