

République Algérienne Démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche scientifique
UNIVERSITE ABBES LAGHROUR – KHENCHELA
Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie
Département D'écologie & Environnement
Spécialité : Ecologie fondamentale appliquée

Mémoire de fin d'étude

Pour l'obtention du diplôme de master II (L.M.D)

Thème:

**Valorisation des
sous-produits du Café**

Présenter par :

MEKERSI Chaima

DERRARDJA Sarra

Membre de jury :

Président : Mme . OUANES Miyada

MCR.Univ .Khenchela

Encadreur : BADIS Zakaria

MCR.Univ .Khenchela

Examineur :Mme. MEZHOUD Amel

MCR.Univ .Khenchela

Année Universitaire
2020/2021

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dédicace

*Je dédie ce petit travail aux personnes qui ont partagé ma
Souffrance
et ma joie. A toi qui ne m'a jamais refusé un souhait une Vol
A mes chers frères et mes chères sœurs ontés
Un rêve.
A ma chère mère qui m'encourage et m'aide
Mon cher papa
A mon professeur B.A.D.I.F. Fakaria.*

Derrardja sarra

Dédicace

Je dédie ce petit travail aux personnes qui ont partagé ma

Souffrance

et ma joie. A toi qui ne m'a jamais refusé un souhait une

Volonté

Un rêve.

A ma chère mère qui m'encourage et m'aide

Mon cher papa

A mon professeur B.A.D.I.F. Fakaria.

A mes chers frères et mes chères sœurs

MEKERSI Chaima

Remerciement

Tout d'abord Je remercie Dieu le tout-puissant pour la volonté la santé et la patience qu'il m'a données durant toutes ces années d'études. Je tiens à remercier exceptionnellement mon cher encadrant monsieur *BADJ Fakaria* pour son soutien permanent et ses recommandations qu'il m'a fait vous êtes l'un des meilleurs enseignants on t'aime trop cher prof.

Je remercie également tous les professeurs du département d'écologie et environnement sans exception.

Je remercie les collègues de promotion pour leurs encouragements et leur soutien moral.

Enfin j'adresse mes remerciements à ma famille qui a fait tout pour me mettre dans de bonnes dispositions afin que je puisse accomplir ce travail. Un grand merci à ceux et à celles qui nous ont aidés de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire de Master.

Résumé :

Une étude comparative entre une huile grasse extraite à partir de l'un des sous-produits de l'industrie cafetière, à savoir le marc de café, et une autre commerciale destinée à l'alimentation des volailles est entreprise. L'objectif principal de notre étude est la valorisation de cette huile chimiquement et biologiquement et savoir la possibilité de l'inclure en tant qu'un complément alimentaire dans l'alimentation animale. En effet, la production des huiles grasses, est une voie de valorisations possibles parmi tant d'autres.

L'analyse chimique du marc de café révèle sa richesse en lipides. L'évaluation de l'activité antioxydante à travers quatre tests différents (DPPH, ABTS, CUPRAC et FRAP) montre que les deux huiles ont une activité tantôt absente tantôt très faible comparativement aux standards. Ces mêmes échantillons ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis le cholinestérase et le butyryléstérase, ainsi une activité antidiabétique considérable à l'encontre de l'alpha-amylase. Un potentiel antifongique pratiquement absent est ainsi enregistré pour les deux échantillons.

Les deux huiles semblent avoir un comportement biologique pratiquement similaire, cependant, l'inclusion de telle huile grasse dans l'alimentation animale nécessite d'autres tests *in vitro* et *in vivo*.

Mots clés: valorisation, marc de café, huile grasse, activités biologiques, comparaison.

Abstract :

A comparative study was carried out between fatty oil extracted from one of the by-products of the coffee making industry, namely **coffee grounds**, and another commercial product intended for poultry feeding. The main objective of our study is the valorization of this oil chemically and biologically as well as the possibility of including it as a food supplement in animal feed. Indeed, the production of fatty oils is one way of possible valuations among many others.

The chemical analysis of the coffee grounds reveals its richness in lipids. The evaluation of the antioxidant activity through four different tests (DPPH, ABTS, CUPRAC and FRAP) shows that the two oils have an activity sometimes absent or very low compared to the standards. These same samples showed an inhibitory activity vis-à-vis cholinesterase and butyrylésterase, as well as a considerable anti-diabetic activity against alpha-amylase. A practically absent antifungal potential is thus recorded for both samples.

The two oils appear to have a practically similar biological behaviour; however, the inclusion of such fatty oil in animal feed requires further *in vitro* and *in vivo* testing.

Keywords: valuation, coffee grounds, fatty oil, biological activities, comparison.

ملخص:

تم إجراء دراسة مقارنة بين الزيوت الدهنية المستخرجة من أحد المنتجات الثانوية لصناعة القهوة ، وهي القهوة المطحونة ، ومنتج تجاري آخر مخصص لتغذية الدواجن ، والهدف الرئيسي من دراستنا هو تقيم هذا الزيت كيميائياً وبيولوجياً ، كماكانية تضمينه كمكمل غذائي في تغذية الحيوانات. وبالفعل ، فإن طريقة الإنتاج في التقييمات المحتملة بين العديد من الآخرين.

يكشف التحليل الكيميائي لحبوب القهوة عن ثرائها في الدهون. يُظهر تقييم نشاط مضادات الأكسدة من خلال أربعة اختبارات مختلفة (DPPH) و (ABTS) و (CUPRAC) و (FRAP) أن الزيتين لهما نشاط أحياناً غائب أو منخفض جداً مقارنة بالمعايير. أظهرت هذه العينات نفسها نشاطاً مثبطاً تجاه الكولينستيراز و البوتيريلستيراز ، وكذلك النشاط المضاد للسكري ضد ألفا أميليز.

تبدو الثوابت ان سلوكاً بيولوجياً متماثلاً عملياً ؛ ومع ذلك ، فإن إدراج علف حيواني مثل دهون الدهن يتطلب مزيداً من الاختبارات المعملية والحيوية.

Table Des Matières

Résumés.....	
Abstract.....	
ملخص	
Introduction générale.....	1
<u>Chapitre I : Le marc du café</u>	
1. Le café, définition, variétés et préparation.....	4
2. Définition du marc de café.....	4
3. Les propriétés du marc de café.....	5
3.1. Propriétés physiques.....	6
3.2. Propriétés chimiques.....	6
3.3. Propriétés bioactives.....	6
4. Les utilisations possibles du marc de café.....	10
4.1. Production de biocarburants.....	10
4.2. Industrie agroalimentaire	10
4.3. Industrie alimentaire.....	11
4.4. Utilisation diverses.....	11
<u>Chapitre II : Les procédés d'extraction des huiles grasses</u>	
1. Généralités sur les huiles végétales.....	14
2. Les méthodes d'extraction des huiles grasses.....	14
2.1. Méthodes classiques.....	14
2.1.1. Extraction par Soxhlet.....	14
2.1.2. Extraction par décoction.....	14
2.2. Méthodes alternatives.....	16
2.2.1. Extraction assistée par ultrasons(EAU).....	16
2.2.2. Extraction assistée par micro-ondes (EAM).....	17
2.2.3. Extraction par fluide supercritique (EFS).....	18
3. Méthodes d'analyses physiques.....	19
3.1. Densité relative.....	19
3.2. L'indice de réfraction.....	19

4. Méthodes d'analyses chimiques	20
4.1. L'indice d'acide (IA).....	20
4.2. L'indice de saponification (Is).....	21
4.3. L'indice d'iode (ID).....	21
4.4. L'indice de peroxyde.....	22
4.5. La chromatographie à phase gazeuse couplée avec la masse (CPG-MS).....	23

Deuxième partie : Matériels et Méthodes

1. Préparation des échantillons	26
1.1. Préparation du marc de café	27
1.2. Préparation de l'huile grasse du marc de café par soxhlet.....	29
2. Evaluation du potentiel chimique du marc de café	30
2.1. Détermination de la teneur en eau (humidité).....	30
2.2. Détermination de la teneur en cendres	32
2.3. Détermination de la teneur en matière grasse (MG).....	33
3. Etude comparée de la caractérisation biologique de l'huile du marc de café et l'huile commerciale	34
3.1. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons	34
3.1.1. Activité du piégeage du radical libre DPPH [•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil).....	35
3.1.2. Activité du piégeage du radical-cation (ABTS ⁺)	36
3.1.3. Le pouvoir réducteur des ions cupriques (CUPRAC).....	37
3.1.4. Réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxydant power).....	38
3.2. Evaluation du potentiel enzymatique des échantillons	39
3.2.1. L'activité anti-Alzheimer.....	39
3.2.1.1. L'activité anticholinestérase.....	39
3.2.1.2. L'activité butylcholinestérase.....	40
3.2.2. L'activité antidiabétique.....	40
3.3. Evaluation du potentiel microbiologique des échantillons	42
3.3.1. Préparation des milieux de culture.....	43
3.3.2. Inoculation et incubation.....	43
3.3.3. La lecture.....	44
4. Analyse statistique	44

Troisième partie : Résultats et Discussion

1. Analyse chimique du marc de café	45
1.1. La teneur en eau (humidité%).....	45
1.2. La teneur en cendres	46
1.3. La teneur en matière grasse.....	46
2. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons	46
2.1. Rendement d'extraction de l'huile grasse.....	46
2.2. Piégeage du radical libre DPPH.....	46
2.3. L'activité du piégeage du radical-cation (ABTS +).....	48
2.4. Le pouvoir réducteur des ions cupriques (CUPRAC).....	51
2.5. L'activité de réduction du fer ferrique (FRAP).....	53
3. Evaluation de l'activité enzymatique des échantillons	55
3.1. L'activité anti-Alzheimer.....	55
3.1.1. L'Activité anticholinestérase	56
3.1.2. L'Activité antibutyrylésterase.....	58
3.2. L'activité anti diabétique (L'activité inhibitrice de l' α -amylase).....	60
4. Evaluation du potentiel microbien des échantillons (L'activité antifongique)	63
Conclusion générale	66
Références bibliographique	70
Annexes	77

Liste des tableaux

Tableau 01	Caractéristiques physiques du marc de café en fonction de l'humidité	7
Tableau 02	Les principaux composants du marc de café	8
Tableau 03	Composition des principaux minéraux du marc de café	8
Tableau 04	Activité radicalaire du marc de café	9
Tableau 05	Les doses utilisées des huiles et le DMSO	43
Tableau 06	Le taux d'humidité, les teneurs en minéraux, et en matières grasses de marc du café (%MS).....	45
Tableau 07	Evaluation de l'activité antifongique de l'HG, l'HC et le témoin positif et négatif en fonction de la concentration des extraits	63

Liste des figures

Figure 01	Le principe de l'expresso.....	5
Figure 02	la poudre de marc de café	5
Figure 03	Possibilités de valorisation du même marc de café	10
Figure 04	Schéma du dispositif du Soxhlet	15
Figure 05	Schéma du dispositif du bain ultrason.....	17
Figure 06	Schéma du dispositif de la micro-onde.....	17
Figure 07	Schéma simplifié d'une installation d'extraction par CO ₂ supercritique	18
Figure 08	Schéma explicatif de la CPG	24
Figure 09	Schéma explicatif de la spectrométrie de masse	24
Figure 10	Graine de café	26
Figure 11	étapes de préparation du marc de café (A : broyeur de laboratoire. B : Café moulu. C : Machine Espresso (GAGGLA).....	27
Figure 12	Préparation du marc de café (A: MC récupéré; B: MC séchée).....	28
Figure 13	Extraction de l'huile du marc de café par Soxhlet (A: Montage du Soxhlet ; B: l'huile grasse récupérée).....	29
Figure 14	Détermination de la matière sèche (A: Etuve ventilée; B: Echantillons secs)	31
Figure 15	Détermination de la matière organique (A: Four à moufle ; B: Marc de café incinéré).....	32
Figure 16	Détermination de la matière grasse (A: Appareil de Soxhlet; B: Dessiccateur; C: Creusets secs).....	33
Figure 17	L'huile commerciale.....	34
Figure 18	Réaction de test DPPH (2,2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl).	35
Figure 19	Structure chimique d'ABTS.....	36
Figure 20	Réduction de néocuproïne/cuivre (II) complexe.....	37
Figure 21	La microplaque 96 puits pour l'activité α - amylase.	41
Figure 22	Culture pure de <i>Fusarium oxysporum</i> .f.sp.....	42
Figure 23	Disques mycéliens préparé pour l'activité antifongique.....	43
Figure 24	Plaque des résultats de l'activité DPPH pour les huiles testées et les standards (HM: huile de marc de café ; HC: huile commerciale).....	47
Figure 25	Profil de l'activité scavenging du radical DPPH des huiles et des standards à différentes concentrations	47
Figure 26	IC ₅₀ pour l'activité antiradicalaire DPPH des échantillons et des standards exprimée en $\mu\text{g/ml}$	48

Figure 27	Plaque des résultats de l'activité du piégeage du radical-cation ABTS pour les huiles testées et les standards.	50
Figure 28	Profil de l'activité antiradicalaire ABTS + des huiles et des standards à différentes concentrations.....	50
Figure 29	IC50 pour l'activité antiradicalaire ABTS+ des échantillons et des standardsexprimée en $\mu\text{g/ml}$	51
Figure 30	Plaque des résultats de l'activité CUPRAC pour les huiles testées et les standards.....	52
Figure 31	Profil de l'activité CUPRAC des huiles et des standards à différentes concentrations.....	52
Figure 32	A 0.50 pour l'activité antioxydante CUPRAC des échantillons et des standardsexprimée en $\mu\text{g/ml}$	53
Figure 33	Activité FRAP de l'huile de marc du café et le huile commercial et des standards à différentes concentrations.....	54
Figure 34	A 0.50 pour l'activité antioxydante FRAP des échantillons et des.....	54
Figure 35	Activité AChE des deux échantillons et du standard à différentes concentrations.....	56
Figure 36	Plaque des résultats de l'activité anti cholinestérase pour les deux huiles testées. Les valeurs d'IC50.....	57
Figure 37	IC50 pour l'activité AChE des échantillons et du standard exprimé en $\mu\text{g/ml}$	57
Figure 38	Activité BChE des deux échantillons et du standard à différentes concentrations.....	58
Figure 39	Plaque des résultats de l'activité anti butyryléstérase pour les deux huiles testées.....	59
Figure 40	IC50 pour l'activité BChE des échantillons et du standard exprimé en $\mu\text{g/ml}$	59
Figure 41	L'activité de l' α -amylase des échantillons et du standard (a : pourcentage d'inhibition des huiles ; b : pourcentage d'inhibition du standard, c ; Valeurs d'IC50 des huiles du standard).....	62

Figure 42	Plaque des résultats de l'activité d' α -amylase pour les huiles testées.....	62
Figure 43	Résultats de l'activité antifongique des huiles testées.....	65

Liste des abréviations:

<i>Abréviation</i>	<i>Signification</i>
MC	Marc de café
HC	Huile commerciale
HG	Huile grasse
HM	Huile du marc de café
MS	Matière sèche
MO	Matière organique
MM	Matière minérale
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
MeOH	Méthanol
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde
DPPH	2,2-Di-Phényl-1 -Picryl-Hydrazyl
BHA	Butyl-hydroxy-anisole
BHT	Butyl-hydroxy-toluène.
ABTS	2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique).
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
ACHE	Acétylcholine estérase
BCHE	Butyrylcholine estérase
HCl	Hydrochloric acid.
DTNB	5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid.
IC50	Concentration d'inhibition à 50%.
A0.5	Concentration à A=0,5.
PDA	POTATO, DEXTROSE, AGAR

Introduction

L'une des boissons les plus consommées dans le monde est le **café**, les grains de café sont considérés comme un produit agricole important du commerce international. Selon les dernières statistiques de l'Organisation internationale du café, la consommation mondiale de café pour l'année 2019-2020 a atteint 169 millions de sacs de 60 Kg, l'Europe représentant environ un tiers de la consommation mondiale (Zengin et *al.*, 2020). En 2014, selon l'USDA (United States Département of Agriculture), l'Algérie est classée la septième parmi les pays importateurs de café avec en moyenne 125 000 tonnes de café importée par année. Dans le même contexte, selon l'UGCAA (Union Générale des Commerçants et Artisans Algériens), l'Algérie est classée onzième parmi les pays consommateurs de café et la première consommatrice du café parmi les pays Africains et Arabes (Benamar, 2016).

Par conséquent, pour satisfaire l'énorme demande de produits, les entreprises de café doivent traiter une quantité énorme de matière première, provoquant un rejet d'une quantité notable de résidus solides et liquides, étant donné qu'environ 90 % en poids des baies de café sont rejetées au cours de la fabrication sous forme de déchets et de sous-produits agricoles (Iriondo-DeHond et *al.*, 2019). Pour cette raison, plusieurs auteurs ont proposé le recyclage possible de différents résidus de café dans divers secteurs industriels, tout en réduisant la quantité se retrouvant dans les décharges (Malara et *al.*, 2018 ; Severini et *al.*, 2020). Parmi eux, le résidu obtenu en grande partie par l'entreprise de café soluble et le processus de brassage, est le marc de café (Janissen et Huynh, 2018).

De nombreuses études ont été réalisées sur le marc de café et sa potentielle mise en valeur, notamment dans le cadre des énergies verte (biodiesel) (Kondamudi et *al.*, 2008). D'autres relatent les propriétés chimiques du marc de café pour en extraire les différents composés bioactifs au profit de l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Iriondo-DeHond et *al.*, 2019 ; Kamgang Nzekoue et *al.*, 2020). Aussi, il existe d'autre étude sur la valorisation du marc de café comme une source appréciable de la matière grasse (Hadouddi et *al.*, 2014).

Ce travail de recherche est considéré une première initiative contribuant à une caractérisation physico-chimique et biologique d'une huile grasse extraite du marc de café. Cette même huile est étudiée en comparaison avec une huile grasse commercialisée comme additif dans l'alimentation des volailles. L'étude comparative menée entre les deux huiles est considérée comme un essai de valorisation avec des avantages socio-économiques et environnementaux appréciables.

Cette investigation est suivie selon l'échéancier suivant :

- ✓ Obtention du marc de café à partir d'un café composé de 20% Arabica et 80% Robusta auprès d'un café public en utilisant la méthode « Espresso » ;
- ✓ Caractérisation chimique du marc de café obtenu via la détermination de sa composition pariétale et cytoplasmique ;
- ✓ Extraction de l'huile grasse du marc de café en utilisant la méthode la plus communément utilisée « Soxhlet » ;
- ✓ Caractérisation chimique des huiles en utilisant quelques indices descriptifs ainsi que la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ;

Détermination de l'aptitude biologique des huiles à travers quel

Notre manuscrit est subdivisé en trois parties fondamentales, une partie bibliographique dont nous avons mis en lumière le marc du café, sa composition, ses caractéristiques et sa valorisation. Dans le même contexte, nous avons exposé les différentes méthodes d'extraction de l'huile grasse pour aboutir, enfin aux techniques de sa caractérisation physico-chimique.

Deuxièmement, une partie expérimentale est déroulée comme mentionnée en ci-dessus. L'activité antioxydante des deux huiles est déterminée à travers quatre principaux tests, en l'occurrence, le DPPH, l'ABTS, CUPRAC et le FRAP. Les activités enzymatiques à savoir l'activité antidiabétique et anti Alzheimer ont été entreprises via la détermination de l'activité des enzymes directement impliqués dans les deux pathologies, à savoir, l' α -Amylase et l'acétylcholinestérase et le butyrylcholinestérase, respectivement. Le potentiel antimicrobien des échantillons est parallèlement entrepris à travers l'étude de leur effet une souche mycétale phytopathogène. La troisième et dernière partie du travail apporte les différents résultats obtenus et discutés séparément.

Il paraît très intéressant à noter que pour des raisons échappant à la volonté relatives à la pandémie du coronavirus et aux exigences de confinement imposées par les hautes instances, nous n'avons pas pu accomplir plusieurs tests à l'instar de : l'activité anti-inflammatoire de nos échantillons pour confirmer leur aptitude biologique *in vitro*; l'analyse statistique de nos résultats ; détermination du potentiel antimicrobien de nos échantillons vis -à-vis quelques souches bactériennes pathogènes. Analyses physico-chimiques des huiles (indices et CPG). Ces travaux vont être accomplis dès que le retour aux conditions de la vie quotidienne soit autorisé.

Chapitre I

1- Le café, définition, variétés et préparation

Depuis le début du XIX^{ème} siècle, la production du café a été en constante augmentation. Il est donc un produit de première importance sur le marché mondial des produits agroalimentaires et constitue la deuxième boisson après l'eau. Sa composition varie selon la variété de café, le mode de production des grains de café vert, les conditions de leur torréfaction et les méthodes de préparation de la boisson (Sekeroglu et *al.*, 2012).

Il existe un grand nombre d'espèces de caféiers (plus de 80) mais seules deux d'entre elles sont réellement exploitées dans le monde: *Coffea arabica* et *Coffea canephora* (Campa et *al.*, 2005). Le café arabica constitue la variété la plus répandue de *Coffea canephora*. Les graines d'Arabica présentent un goût plus fin et un arôme plus fruité que les grains de robusta (Sekeroglu et *al.*, 2012), et aussi la variété arabica contient plus d'huiles aromatiques, mais il a deux fois moins de caféine que les grains de café de la variété Robusta. Les meilleurs cafés du monde sont produits uniquement à partir de grains de café 100% Arabica et sont donc beaucoup plus chers que les mélanges contenant des grains de café Robusta (Kreichbergs et *al.*, 2011).

On dénombre plusieurs modes de préparation du café (décoction, La percolation sous haute pression ou un espresso et filtration...etc.), chacun conférant à la boisson obtenue des propriétés organoleptiques et compositions bien distinctes.

Comme utilisé dans notre étude, un espresso (de l'italien espresso, extrait par pression ou très vite), ou café express, est un café très corsé avec un fort arôme, obtenu en faisant passer rapidement de l'eau chaude sous une pression de 9 bars et un temps de passage de 22-28 s à travers du café finement moulu et torréfié. Cette opération se fait à l'aide d'une cafetière à espresso. Le procédé utilisé permet à l'eau et à la mouture d'avoir un contact minimum, ce qui évite de diluer les saveurs et les arômes (Sekeroglu et *al.*, 2012).

2-Définition du marc de café

Le marc de café est le résidu insoluble après la déshydratation, la mouture et l'infusion des grains de café. Il existe deux sources:

Celles générées par l'industrie du café soluble représentent environ 50% de la récolte mondiale de café chaque année, et celles générées par les cafés et le public, représentant les 50% restants (Cruz *et al.*, 2015).

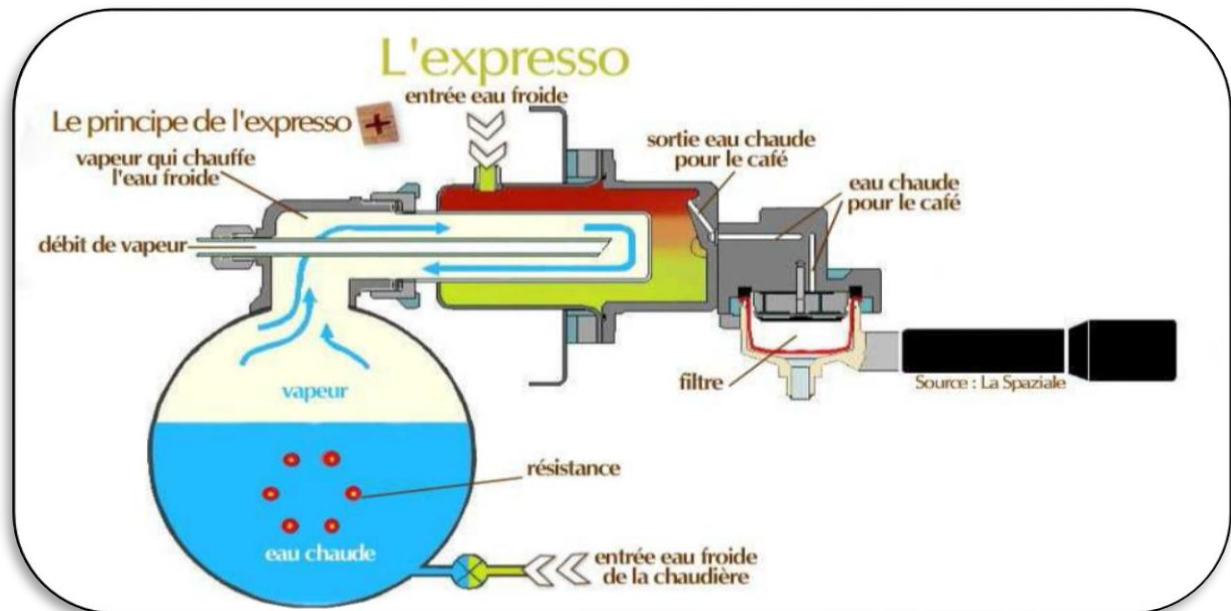


Figure 01: le principe de l'expresso (www.le grande restaurant.com).



Figure 02: La poudre du marc de café.

3-Les propriétés du marc de café :

Le marc du café possède plusieurs propriétés physiques, chimiques et phytochimiques

3-1- Les propriétés physiques

➤ Le taux d'humidité

Il varie entre 55 et 80 % (Cruz *et al.*, 2015). Plus l'humidité est grande plus la croissance microbienne est favorisée, donc des stratégies de conservations optimales sont nécessaire afin de récupérer une matière de qualité. Ces stratégies peuvent représenter des coûts économiques supplémentaires pour le transport (Cruz *et al.*, 2012).

➤ Le diamètre

Le diamètre des grains du marc de café séchés varie entre 50 et 100 μm pour le marc de café commercial. Cependant, ce diamètre augmente avec le taux d'humidité. En effet, lorsque le marc de café devient de plus en plus humide, l'adhésion entre les grains augmente et ces derniers forment des agglomérats de plus grande taille.

➤ L'angle de talus

Une donnée utile pour déterminer les superficies nécessaires des aires d'entreposage du marc de café après l'avoir récupéré. L'angle de talus quant à lui reste le même, peu importe le taux d'humidité du marc de café.

➤ La densité apparente

La densité apparente du marc de café est environ 12 de $0,42\text{g/cm}^3$.

➤ La densité réelle

La densité réelle est d'environ $1,16\text{ g/cm}^3$.

➤ Porosité

Les grains du marc de café ne possèdent pas de micropores. En général, la porosité est de 0,63, peu importe le taux d'humidité et la taille des pores est d'environ $10\ \mu\text{m}$ (Chen *et al.*, 2013). Toutefois, cette porosité peut être augmentée si nécessaire en diminuant la cristallinité du marc de café en dégradant sa matrice cellulose-lignine (Ballesteros *et al.*, 2014). Enfin, la surface des grains est de charge négative (Shen et Gondal, 2017).

3-2- Les propriétés chimiques

La composition du marc de café est essentiellement faite de polysaccharides, de lipides, de protéines, de polyphénols et de minéraux (Jiménez-Zamora *et al.*, 2015).

➤ Matrice lignocellulosique

Le marc de café est reconnu comme une source importante de glucane (cellulose), des hémicelluloses et de la lignine étant les principaux composants de la biomasse lignocellulosique.

Tableau 01: Caractéristiques physiques du marc de café en fonction de l'humidité (Silva et al., 1998)

Humidité (%)	Angle de talus (°)	Densité apparente (g/cm ³)	Densité réelle (g/cm ³)	Diamètre (µm)	Porosité
0,00	s.d.	s.d.	1,20	50-100	s.d.
15,2	38,7	0,43	1,16	583	0,63
17,7	37,8	0,43	1,16	617	0,63
43,1	37,7	0,41	1,11	880	0,63

La teneur en lignine est faible dans les grains de café, environ 5 % cependant, après la production de café soluble, le marc de café s'enrichit en teneur de lignine (Franca et Oliveira, 2016).

➤ Les glucides

Ils sont les éléments les plus abondants dans le marc de café. Plus précisément, le marc de café contient 46,8 % de mannose, 30,4 % de galactose, 19 % de glucose et 3,8 % d'arabinose. Ces données varient d'une étude à l'autre, cela pouvant être dû à la variété des grains de café utilisés. Dans le marc de café expresso, le galactomannane est le plus abondant et représente 50 % des glucides ((Mussatto *et al.*, 2011).

➤ Les lipides

Les données varient principalement entre 9,3 % et 16,2 %, parfois aux alentours de 20 %. De plus, cet ordre de grandeur ne varie pas significativement entre l'arabica et le robusta. Aussi, les lipides du marc de café sont composés de 84,4 % de triglycérides (Campos-Vega *et al.*, 2015).

➤ **Les protéines**

Selon les études et est de même ordre chez l'arabica ou le robusta les données varient principalement entre 6,7 et 14 %. Cependant, il se peut que ces estimations soient sur évaluées à cause de la présence d'autres composés contenant de l'azote tel que la caféine ainsi que plusieurs acides aminés. En effet, 17 acides aminés présents sont présents dans le marc de café, dont les neuf acides aminés essentiels. Ces derniers représentent presque 50 % des acides aminés présents (annexe 01). Il possède une forte concentration en acides aminés à chaîne latérale ramifiée (BCAA) (Campos-Vega *et al.*, 2015).

Tableau 02: Les principaux composants du marc de café (Limousy *et al.*, 2013)

Éléments	Quantités
Glucides	45.3
Lipides	9.3-16.2
Protéines	14
Minéraux	6800 mg/kg de matière sèche
Polyphénols	13-18 mg acide gallique éq

➤ **Les minéraux**

Ils sont présents dans le marc de café à expresso. Le tableau 03 détaille les principaux minéraux du marc de café.

Tableau 03: Composition des principaux minéraux du marc de café (Mussatto *et al.*, 2011a).

Minéraux	Quantités (mg/kg)
Potassium	8824 ± 4662
Phosphore	1534 ± 503
Magnésium	2201 ± 1341
Calcium	349 ± 122
Fer	46 ± 21
Manganèse	27 ± 10
Cuivre	25 ± 12

➤ Composés secondaires

Le marc de café contient également d'autres éléments d'intérêts, tels que des antioxydants. Plusieurs tanins sont présents dans le marc de café, parmi eux, la catéchine, la gallocatéchine, la gallocatéchine galate et l'acide chébulique. La catéchine est un antioxydant puissant qui possède une action complémentaire à la vitamine C (Low *et al.*, 2015). Les tanins ne sont pas les seuls antioxydants présents dans le marc de café. En effet, d'autres polyphénols sont présents ainsi que de la caféine. Parmi ces polyphénols, les principaux sont les flavonoïdes, l'acide protocatéchuïque et l'acide chlorogénique. Ce sont les acides chlorogéniques qui sont retrouvés en plus grande abondance, celui-ci étant plus important dans le marc de café arabica que dans le marc de café robusta (Carassou, 2015).

3-3-Les propriétés bioactives

Le marc de café possède une activité anti-radicalaire semblable selon l'espèce de café.

Tableau 04: Activité radicalaire du marc de café (Bravo *et al.*, 212).

Concentration	200 ppm	100 ppm	50 ppm
Marc de café arabica	89,2 ± 4,5	87,9 ± 4,1	86,9 ± 5,0
Marc de café robusta	84,3 ± 5,9	83,8 ± 5,1	82,0 ± 5,0

Le marc de café arabica possède une activité anti-radicalaire légèrement supérieure à celle du marc de café robusta. Cependant, le marc de café robusta montre une meilleure capacité d'absorption de l'oxygène radicalaire que le marc de café arabica. Aussi, le marc de café des deux espèces possède une activité anti tumorale assez similaire. Cette activité est sans doute liée à la présence de pigments bruns (mélanoïdes et polyphénols) formés lors de la torréfaction des grains de café. De plus, il a été montré que le marc de café possède également des propriétés anti-allergènes et dans une moindre mesure des propriétés anti-inflammatoires (Ramalakshmi *et al.*, 2009).

2- Les utilisations possibles du marc de café:

De multiples voies de valorisation et d'utilisations sont possibles avec le marc de café.

Parmi celles-ci se retrouvent:

3-1- Production de biocarburants

Les productions successives de différents biocarburants sont possibles avec le marc de café. Cependant, certaines étapes sont nécessaires afin d'obtenir un rendement optimal. La production de biocarburant nécessite au préalable le séchage du marc de café. En effet, éliminer l'humidité est nécessaire afin d'obtenir des solvants de qualité dans la production de biocarburant (biodiesel, bioéthanol, biohuile). De plus, l'utilisation directe du marc de café comme granule de combustion nécessite la recherche d'un équilibre d'humidité afin d'améliorer les paramètres énergétiques du biocarburant. Aussi, la production de biodiesel, de bioéthanol, de biohuile et de granule de combustion peut se faire après une unique étape de séchage. Ainsi, les coûts de transformation du marc de café en sont diminués (Gomez-de la Cruz et *al.*, 2015).

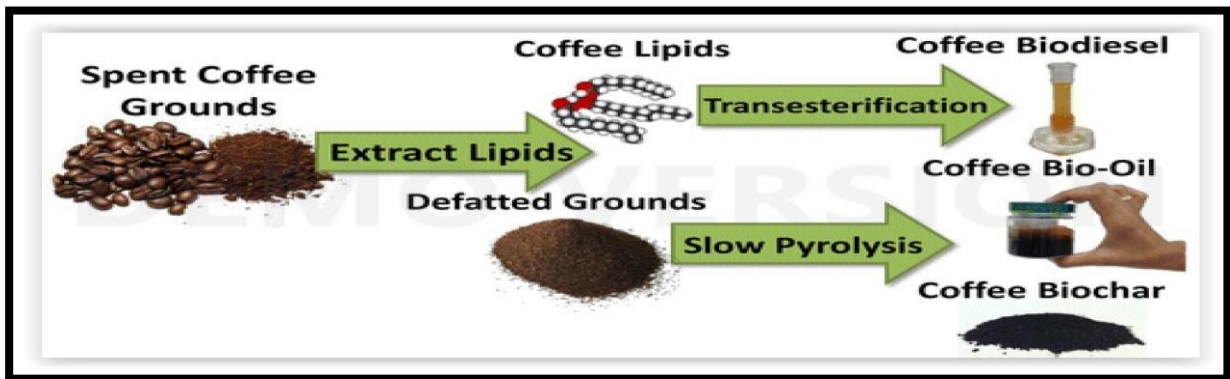


Figure 03: Possibilités de valorisation du même marc de café (Vardon et *al.*, 2013).

3-2- Industrie agroalimentaire

Le marc de café peut être utilisé comme substrat pour la production de caroténoïde grâce à la culture de levure. Les caroténoïdes sont utilisés dans les industries agroalimentaires (colorant), cosmétiques et pharmaceutiques et sont donc des composés d'intérêts (Petrick et *al.*, 2014) et peut aussi servir de substrat pour la culture de champignons comestibles sans

ajout de supplément nutritionnel (Leifa et *al.*, 2001). La haute teneur en protéines et en humidité du marc de café explique certainement ce phénomène, car ce sont deux paramètres essentiels à la croissance de micro-organismes et de champignons (Mussatto et *al.*, 2011a).

3-3-Industrie alimentaire

De nombreux constituants du marc de café cités précédemment peuvent être utilisés dans l'industrie de l'alimentation. En effet, le marc de café peut, par exemple, être utilisé pour la fabrication de spiritueux à saveur de café (Sampaio et *al.*, 2013). Les polyphénols présents dans le marc de café sont aussi des composés d'intérêt pour l'industrie alimentaire. Ensuite, la composition en protéine du marc de café donne la possibilité de l'utiliser dans l'alimentation humaine. (Campos-Vega et *al.*, 2015).

Les tanins sont également des composés d'intérêt dans cette industrie. De cette manière, il est intéressant d'étudier les possibilités dans ce domaine (Mussatto et *al.*, 2011). La morphologie du marc de café peut également servir à l'industrie de l'alimentation. En effet, les grains de marc de café peuvent servir de support enzymatique pour des processus d'enrichissement en isoflavones dans le lait de soya (Chen et *al.*, 2013).

En ce qui concerne la nourriture animale, le marc de café peut être incorporé à la nourriture des ruminants, des cochons, des poulets et des lapins. Cependant, la haute teneur en lignine dans le marc de café pose des limites à cette option (Mussatto et *al.*, 2011).

3-4- Utilisations diverses

Les propriétés mécaniques du marc de café sont propices à son utilisation comme remblai pour les abords des routes, mais ne le sont pas pour le remblai des routes elles-mêmes. L'utilisation du marc de café comme remblai ne semble poser aucun problème environnemental selon une étude. Cette dernière affirme que la concentration des composants du marc de café est inférieure aux limites de l'Agence de protection de l'environnement (EPA) des États-Unis, dans la désignation d'un déchet dangereux. Cependant, cette étude ne fait pas référence à la présence de caféine et de polyphénols. Ainsi, leur extraction serait peut-être nécessaire avant l'utilisation du marc de café comme remblai (Arulrajah et *al.*, 2014).

Le marc de café est plein de propriétés cosmétiques, c'est un très bon exfoliant. Il permet d'éliminer les cellules mortes de la peau. La caféine permet d'activer la circulation et de régénérer la peau. Les grains très fins sont antioxydants et vont stimuler le renouvellement cellulaire. Avec un bon ratio C/N, le marc de café peut être utilisé comme fertilisant. Ainsi,

trois méthodes de compostage avec du marc de café ont été comparées, soit le vermicompostage, le compostage encuve et le compostage en andain (Adi et Noor, 2009).

Chapitre II

1. Généralités sur les huiles végétales

Les huiles végétales sont des substances dérivées de plantes oléagineuses; les triglycérides sont l'un de leurs composants qui contiennent principalement des acides gras polyinsaturés et mono-insaturés. Elles se composent principalement de tricylglycérides et d'un mélange complexe de composés mineurs (2-5%) avec une diversité de structures chimiques (Cañabate-Díaz et *al.*, 2007). Les huiles et les graisses ont la plus grande énergie par rapport aux hydrates de carbone et les protéines, elles contiennent des acides gras essentiels pour la santé qui ne sont pas fabriqués par le corps humain (O'Brien, 2008).

2. Les méthodes d'extraction des huiles grasses

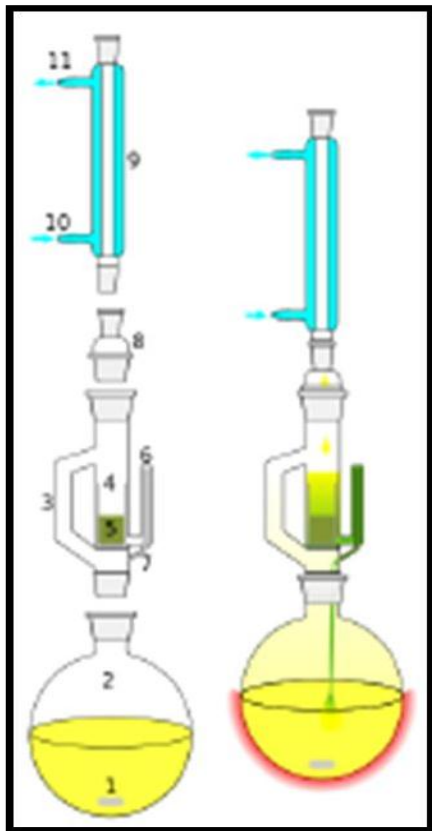
Il existe plusieurs techniques d'extraction des huiles grasses à partir de sources végétales. Les techniques d'extraction à pression ambiante, sans ou avec agitation et/ou chauffage utilisées longtemps sont considérées comme technique classique (conventionnelles) et les techniques plus récentes sont appelées alternatives.

2.1. Méthodes classiques

Il existe plusieurs méthodes d'extraction classique des huiles grasses, parmi lesquelles: extraction soxhlet et extraction par décoction.

2.2. Extraction par Soxhlet

C'est la technique qui permet d'avoir les meilleurs rendements parmi les techniques classiques (De Castro et Garcia-Ayuso, 1998). Le principe consiste à extraire les matières grasses contenues dans l'espèce végétale par un solvant organique (éther de pétrole / n-hexane) non polaire et d'une manière continue (Figure 04).



- 1- Agitateur magnétique.
- 2- Ballon à col rodé.
- 3- Retour de distillation.
- 4- Corps en verre
- 5- Filtre
- 6- Haut de siphon
- 7- Sortie de siphon
- 8- Adaptateur d'expansion
- 9- Condenseur
- 10- Entrée de l'eau de refroidissement
- 11- Sortie de l'eau de refroidissement

Figure 04: Schéma du dispositif du Soxhlet (Genthon, 2015).

Le Soxhlet se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en papier filtre épais(5), d'un tube siphon (6-7) et d'un tube d'adduction (3). Dans le montage, l'extracteur est placé sur un ballon(2) contenant le solvant d'extraction (1). Dans l'extracteur, est insérée une cartouche dans laquelle est placée l'échantillon en poudre contenant l'espèce à extraire; puis un réfrigérant (9, 10, 11), est adapté au-dessus de l'extracteur (il est souhaitable d'utiliser un chauffe ballon avec agitation magnétique intégrée). Quand le ballon est chauffé, les vapeurs de solvant passent par le tube adducteur, se condensent dans le réfrigérant et retombent dans le corps de l'extracteur, faisant ainsi macérer le solide dans le solvant (chauffé par les vapeurs se trouvant en dessous). Le solvant condensé s'accumule dans l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du tube-siphon, qui provoque alors le retour du liquide dans le ballon, accompagné des substances extraites, et le solvant contenu dans le ballon s'enrichit

donc progressivement en composés solubles. Le solvant continue alors de s'évaporer, alors que les substances extraites restent dans le ballon. Le solvant est ensuite distillé et le résidu obtenu est composé essentiellement de triglycérides cette méthode est connue sous le nom de méthode directe (Genthon, 2015).

Extraction par décoction

La décoction est l'opération dans laquelle le solide est plongé dans le solvant liquide mis en ébullition. Il s'agit d'une opération brutale qui doit être réservée à l'extraction de principes actifs non thermolabiles. Elle est cependant très rapide et parfois indispensable (Leybros et Frémeaux, 1990). Généralement, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant est introduit une quantité de la poudre végétale et du solvant, le mélange est porté à ébullition puis subit une filtration sur Büchner pour récupérer le solvant enrichi en substance soluble, suivie d'une distillation au rota-vapeur pour obtenir la fraction lipidique (Haddoudi et *al.*, 2014).

2.3. Méthodes alternatives

Actuellement, il y a une demande croissante concernant la mise en point de nouvelles techniques d'extraction permettant des temps d'extraction plus courts, une réduction de la consommation d'énergie et de solvants organiques et une réduction de la pollution. Ces opérations sont considérées comme des éco-extractions. L'extraction assistée par ultrason, l'extraction assistée par micro-onde, et l'extraction par fluide supercritique, aussi appelés durables ou procédés propres, sont considérées comme des éco-extractions.

2.3.1. Extraction assistée par ultrasons(EAU)

L'extraction assistée par ultrasons est une technologie émergente dont l'utilisation des ultrasons permet d'effectuer des extractions en quelques minutes avec une reproductibilité élevée, ce qui simplifie l'opération et donne une plus grande pureté au produit final. Les ultrasons interagissent avec le matériel végétal et modifient ses propriétés physiques et chimiques. Le choix approprié du solvant, de la température ainsi que la fréquence, la puissance des ultrasons, le temps d'extraction et la distribution d'ondes ultrasonores augmentent le rendement d'extraction et permet une meilleure extractibilité des huiles grasses (Wang et Weller, 2006).



Figure 05 : Schéma du dispositif du bain ultrason.

Extraction assistée par micro-ondes (EAM)

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, possédant un champ électrique et magnétique perpendiculaires l'un par rapport à l'autre, qui se propagent dans le vide avec des fréquences situées entre 300 MHz et 300 GHz. Elles sont positionnées sur le spectre électromagnétique entre les infra-rouges et les radiofréquences, avec des valeurs de longueurs d'ondes comprises entre 1 m et 1 cm.

L'extraction assistée par micro-ondes est un processus par lequel l'énergie micro-onde accélère la rupture des cellules en provoquant une augmentation rapide de la température et de la pression interne dans les parois des cellules végétales (Inoue et *al.*, 2010; Ahmad et Langrish, 2012). De ce fait, une quantité considérable de pression s'accumule à l'intérieur du biomatériau, qui modifie les propriétés physiques des tissus biologiques et améliore la porosité de la matrice biologique. Ceci permet une meilleure pénétration du solvant d'extraction à travers la matrice (Kratchanova et *al.*, 2004 ; Yeoh et *al.*, 2008) et facilite l'extraction des composés entre autre les huiles grasses (Mandal et *al.*, 2007).



Figure 06: Schéma du dispositif de la micro-onde (Fellah et *al.*, 2006).

2.3.2. Extraction par fluide supercritique (EFS)

L'extraction par fluide supercritique est une méthode d'extraction où un fluide supercritique, le plus souvent du CO₂, est utilisé pour la récupération des lipides ou d'autres composés d'intérêt. De plus, le CO₂ peut être couplé à des cosolvants tels que l'éthanol ou le méthanol qui modifient les conditions du procédé et le rendement d'extraction (Ahangari et Sargolzaei, 2013).

Le principe consiste en deux étapes principales : l'extraction suivie d'une séparation. Le CO₂ supercritique percole dans l'extracteur contenant la matière à extraire, avec un flux ascendant ou descendant suivant les installations. La séparation du mélange extrait-CO₂ supercritique a lieu par dépressurisation du CO₂ supercritique dans un séparateur. Cette étape permet de récupérer d'une part l'extrait et d'autre part, le CO₂ gazeux. A la suite de cette étape, le CO₂ est recyclé dans l'installation (Sovová et Stateva, 2011).

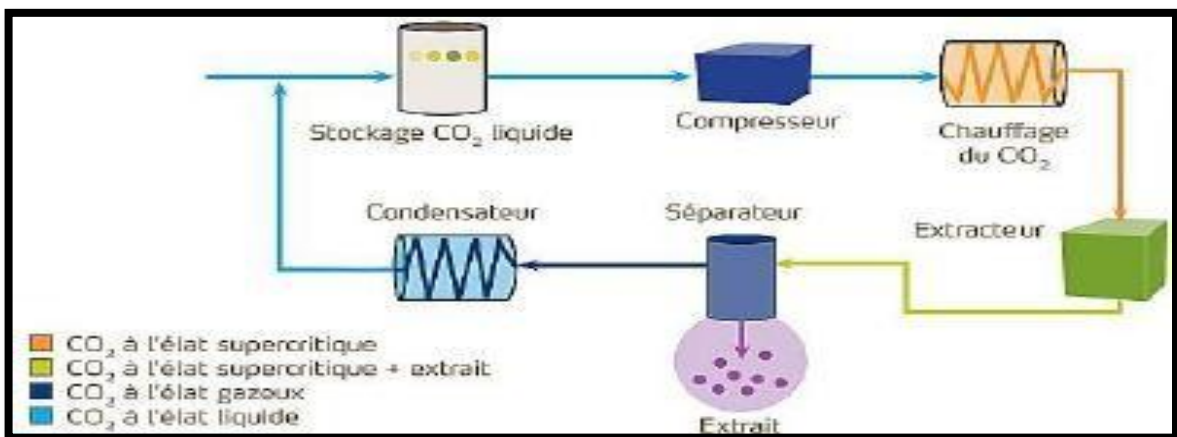


Figure 07: Schéma simplifié d'une installation d'extraction par CO₂ supercritique

(Sovová et Stateva, 2011).

Après l'extraction des huiles végétales (**matière grasse**), elles sont analysées pour connaître plusieurs de ses caractéristiques physico-chimiques. Les propriétés physico-chimiques sont plusieurs et différents. Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux paramètres suivants : l'indice d'acide, l'indice de saponification, l'indice d'iode, l'indice de peroxyde, densité relative et l'indice de réfraction

1. Méthodes d'analyses physiques

1.1. La densité relative

C'est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20°C, et la masse d'un volume égal d'eau distillée à la même température (Lion, 1955). A l'aide d'une balance analytique, effectué de pesées successives de volume égal d'huile et d'eau à la température de 20.

La densité relative est donnée par la formule ci-dessous (Wolff, 1968).

$$d_{20}^{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

Où: m_0 : Masse (g) du pycnomètre vide.

m_1 : Masse (g) du pycnomètre rempli d'eau.

m_2 : Masse (g) du pycnomètre rempli d'huile.

1.2. L'indice de réfraction

L'indice de réfraction d'une huile est le rapport entre le sinus de l'angle d'incidence et le sinus de l'angle de réfraction d'un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée passant de l'air dans l'huile maintenue à température constante (Lion, 1961). Suivant le réfractomètre utilisé, soit mesurer directement l'angle de réfraction, soit observer la limite de réflexion totale, l'huile étant maintenue dans les conditions d'isotropisme et de transparence.

L'indice de réfraction est calculé selon la formule suivant (Wolff, 1968).

$$n_d^{20} = n_d^t + 0.00035 (t-20)$$

Où: n_d^t : Valeur de lecture à la température t à laquelle a été effectuée la détermination.

n_d^{20} : Indice de réfraction à la température 20.

t : Température à laquelle a été effectuée la détermination.

2. Méthodes d'analyses chimiques

2.1. L'indice d'acide (IA)

Lion, (1961), définit l'indice d'acide comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium nécessaires pour la neutralisation des acides libres contenus dans un gramme de corps gras. Son principe consiste à neutraliser les acides libres par une solution alcoolique d'hydroxyde de potassium titré.

L'indice d'acide est calculé selon la formule suivante (Wolff, 1968).

$$IA = \frac{PM \cdot N \cdot V}{P}$$

Où: P: Masse (g) de la prise d'essai ;

PM: Masse molaire, exprimée en g/mole, d'hydroxyde de potassium ;

V: Volume en ml de KOH (0,1 N) nécessaire au titrage ;

N: Normalité de la solution de potasse (0,1 N).

2.2. L'indice de saponification (Is)

Selon Lion, (1961), l'indice de saponification est défini comme le nombre de milligrammes d'hydroxyde de potassium (KOH) nécessaire pour saponifier un gramme de matière grasse. Cette valeur est d'autant plus élevée que les acides gras sont de faible poids moléculaire. Si l'on traite un ester par de la potasse suffisamment concentrée et chaude, on régénère suivant une réaction totale d'alcool et le sel de potassium de l'acide puis on donne naissance à l'ester.

L'indice de saponification est donné par la formule suivante (Wolff, 1968).

$$I_s = (V_0 - V_e) * N * PM (KOH) / P$$

Où: V_0 : Volume en ml de HCl utilisé pour l'essai à blanc ;

Ve: volume en ml de HCl utilisé pour l'échantillon à analyser ;

N: Normalité de HCl ;

PM (KOH): poids moléculaire de la potasse (g) ;

P: prise d'essai en grammes.

2.3. L'indice d'iode (ID)

Cet indice mesure globalement le degré d'insaturation d'une matière grasse en déterminant le nombre de grammes d'iode se fixant sur les doubles liaisons présentes dans 100g de lipides. Les matières grasses animales très saturées, ont des indices d'iode de l'ordre de 45. Cependant, dans les huiles végétales, cette valeur atteint 150 (Lion, 1961).

Addition, à une prise d'essai d'une solution de monochlorure d'iode dans un mélange formé d'acide acétique et de tétrachlorure de carbone. Après un temps donné de réaction, réduction de l'excès de monochlorure d'iode par addition d'une solution d'iodure de potassium et d'eau et titrage de l'iode libéré par une solution titrée de thiosulfate de sodium. L'indice d'iode est donné par la formule établie ci-dessous (Wolff, 1968).

$$\mathbf{II} = (V_0 - V) * 126.9 * N / P$$

Où: V₀: Volume (en ml) de Na₂S₂O₃ (0,1 N) nécessaire pour titrer l'essai à blanc ; **V:** Volume (en ml) de Na₂S₂O₃ (0,1 N) nécessaire pour titrer l'échantillon ; **P:** Prise d'essai (g) de l'échantillon ;

N: Normalité de la solution de Na₂S₂O₃ (0,1 N).

2.4. L'indice de peroxyde:

L'indice de peroxyde est une mesure permettant d'estimer la quantité de peroxydes présents dans une matière grasse. Les peroxydes sont des constituants caractéristiques de l'oxydation des acides gras insaturés, ils sont déterminés en se basant sur leur propriété de libérer l'iode de l'iodure de potassium dans les milieux acides. L'iode libéré est mesuré par la réaction avec le thiosulfate, sachant que 1ml de thiosulfate 0,01 N correspond à une quantité de 80 mg d'oxygène fixé sur les acides gras (Lion, 1961).

L'indice de peroxyde est calculé selon la formule suivant (Wolff, 1968).

$$\mathbf{IP} = (V - V_0) * 80 / P$$

Où: V₀: volume (ml) de Na₂S₂O₃ (0,01 N) nécessaire pour titrer l'essai à blanc.

V: volume (ml) de Na₂S₂O₃ (0,01 N) nécessaire pour titrer l'échantillon.

P: prise d'essai (g) de l'échantillon.

2.5. La chromatographie à phase gazeuse couplée avec la masse (CPG-MS)

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux échantillons gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans qu'il ne se décomposent (Arpino et *al.*, 1995). Cette méthode d'analyse consiste à injecter un composé ou un mélange de composés dans une colonne thermostatée placée dans un four. Le mélange peut être liquide (phase stationnaire) puis volatilisé dans l'injecteur. Il est ensuite injecté et entraîné dans la colonne par un gaz vecteur (hélium, azote, Argon ou hydrogène) qui constitue la phase mobile. Des échanges phase stationnaire-composés- phase mobile ont lieu. La progression des composés dans la colonne une rétention plus ou moins importante en fonction de leur propriétés et donc une séparation. Un système d'acquisition des données va permettre d'obtenir un chromatogramme avec chaque pic correspondant à une molécule (Genthon, 2015). L'identification des pics des différents acides gras (AG) sur un chromatogramme est faite par la comparaison de leurs temps de rétention à ceux d'un mélange de témoin d'AG injecté auparavant, les pourcentages des différents acides gras présents sont calculés à partir des surfaces des pics qui les représentent sur le chromatogramme : plus la surface du pic est grande, plus le pourcentage en acides est important.

Le pourcentage des acides gras est donné par la relation suivante :

$$\% \text{ en acides gras} = (S/\Sigma s) \times 100$$

Ou : **S** : surface du pic correspondant à l'AG considéré

Σs : Somme des surfaces de tous les pics d'un chromatogramme correspondant aux acides gras du mélange

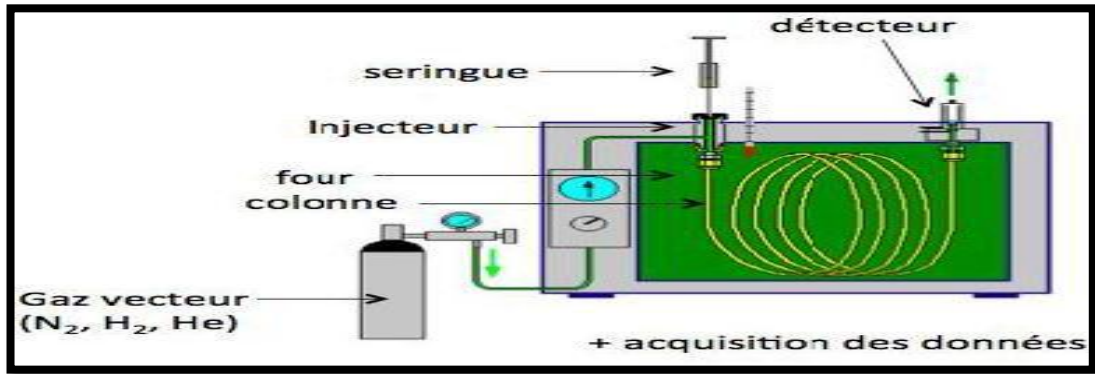


Figure 08: Schéma explicatif de la CPG (Robsomanitrاندراسانا, 2014).

Lorsque ce dernier est couplé à la spectrométrie de masse (CPG-MS), il est à la fois possible de séparer d'un mélange mais aussi de les analyser. Les composants peuvent être identifiés par comparaison avec des standards (temps de rétention obtenu, condition de CPG et phase utilisée), ou avec les spectres de références contenus dans une spectrothèque (si les spectres de masse correspondants ressemblent à des composés connus) (Robsomanitrاندراسانا, 2014).

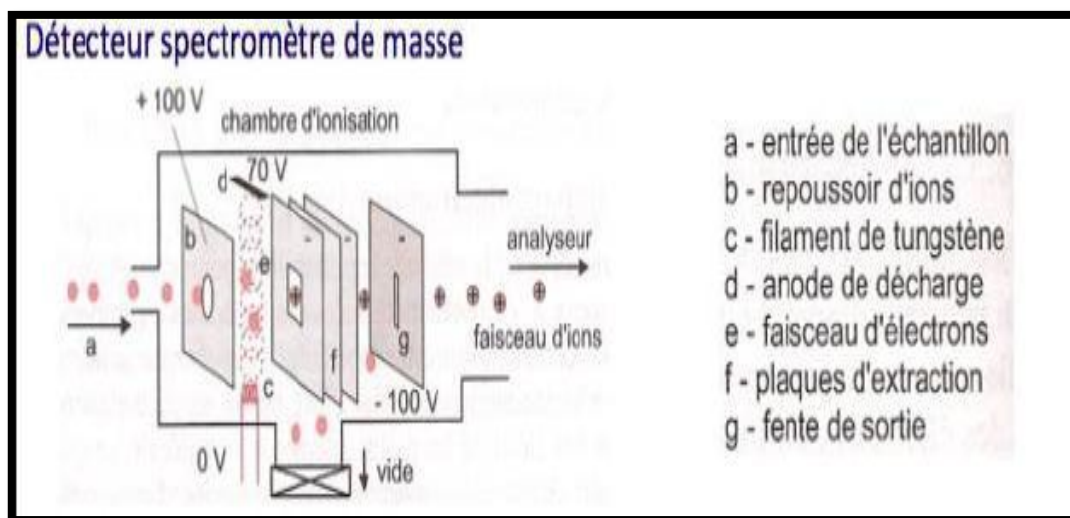


Figure 09: Schéma explicatif de la spectrométrie de masse

Le présent travail de recherche se caractérise par une originalité dont le thème et les objectifs avisés n'ont jamais été entrepris antérieurement, en plus d'une multidisciplinarité bien tracée et établie. A priori, le marc de café choisi dans notre étude est composé de deux types du marc de café les plus consommés en Algérie et travers le monde, Robusta et Arabica. Ils sont mélangés en raison de 80-20 (%-%) étant le pourcentage le plus recommandé dans la littérature ainsi que par les experts et professionnels du domaine. Le choix de la méthode d'extraction est basé sur le fait qu'elle est la plus communément utilisée pour l'extraction des huiles végétales en raison de sa rentabilité et la facilité de sa mise place. Le choix de l'huile commerciale est fait, d'ailleurs pour une intention de comparaison et, par conséquence la mise au point de différents points de différence et ressemblance. La fiche technique ainsi obtenue permettra d'apercevoir si l'huile grasse obtenue à partir de l'un des déchets le plus abandonné dans l'environnement pourrait être utilisée au profit de l'alimentation animale d'une manière générale !

Il est essentiel à noter que le plan d'action tracé au premier abord n'a pas été finalisé pour des raisons échappant à la volonté, consistant à la pandémie du coronavirus. A cet effet, la caractérisation physico-chimique des huiles est malencontreusement prorogée au moment adéquat. Les travaux menés et décrits dans ce mémoire sont accomplis au niveau des laboratoires du centre de recherche en biotechnologie de Ensigna, à l'instar de la préparation du marc de café et la détermination de sa composition chimique, l'extraction de l'huile grasse et l'étude de son potentiel antioxydant, enzymatique et biologique comparativement à l'huile commerciale.

1. Préparation des échantillons

500g du café sont obtenus auprès d'un représentant du distributeur « MERAH » sis à NSIGHA composé d'un mélange du café Arabica (20%) et du Robusta. (80%).



Figure 10:Graine de café (A: Arabica; B: Robusta)

1.1.Préparation du marc de café

La quantité du café ainsi obtenue est directement placée dans un broyeur de laboratoire, puis transférée directement à un café public pour la récupération du marc de café à l'aide d'une machine expresso (GAGGIA, made in Italie, à pression 1.5 bar).

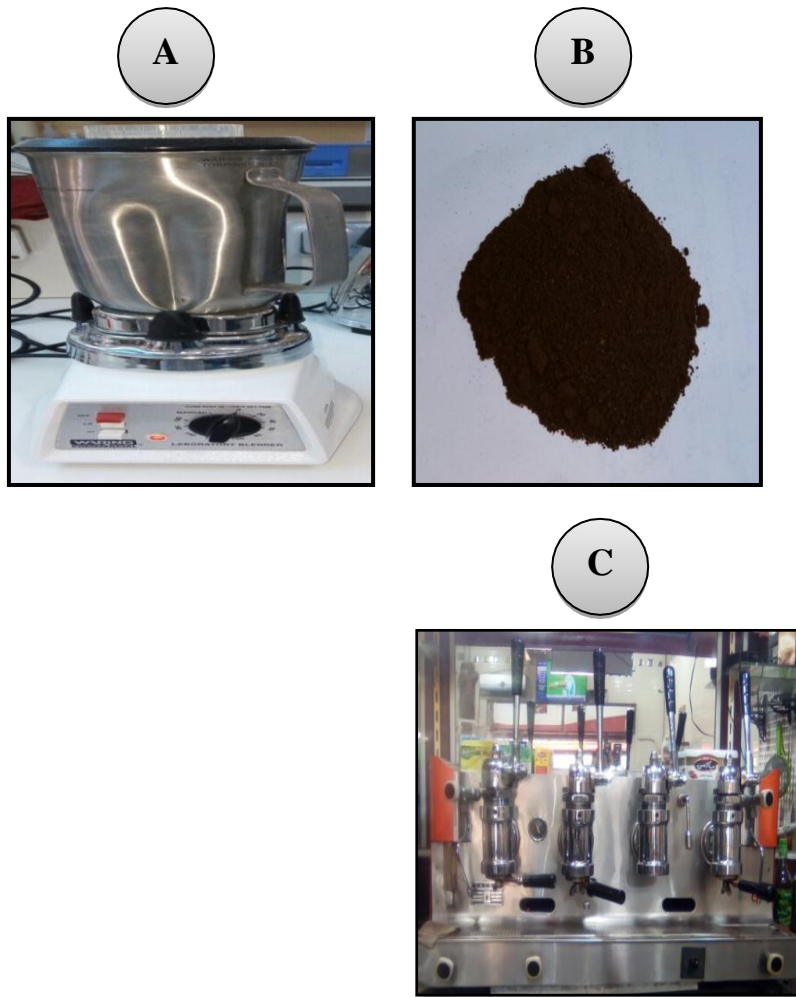


Figure 11:étapes de préparation du marc de café (A : broyeur de laboratoire. B :
Café moulu.

C : Machine Expresso (GAGGLA)).

Le marc de café récupéré et directement transporté au LABORATOIRE puis placé dans une étuve à 45.5C° pendant 24h jusqu'à stabilisation du poids pour éviter toute sorte de dégradation microbienne au cours du stockage (Haddoudi et *al.*, 2014). Une fois séché, le marc est stocké dans un récipient opaque dans l'obscurité à température ambiante.

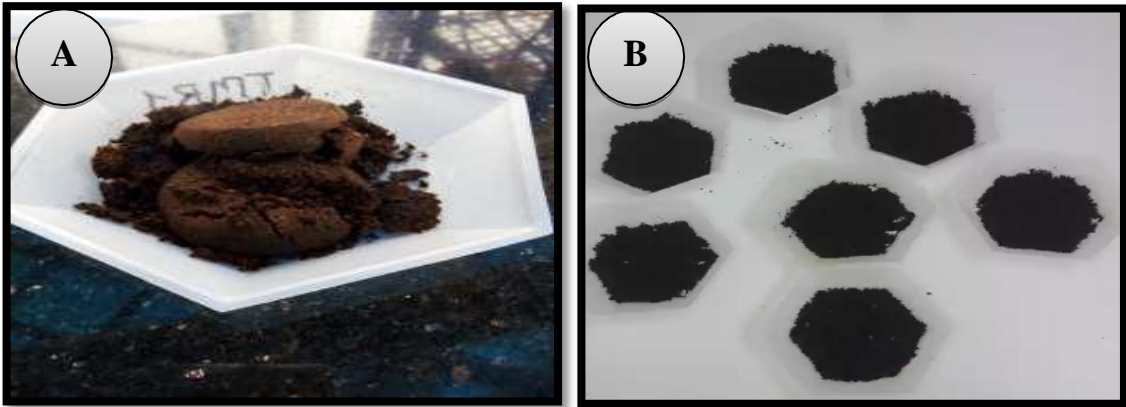


Figure 12: Préparation du marc de café (A: MC récupéré; B: MC séchée).

1.2.Préparation de l'huile grasse du marc de café par soxhlet

➤ Principe

Comme déjà mentionné dans la littérature, le principe consiste à effectuer une extraction par un solvant organique à l'aide d'un dispositif « Soxhlet ». L'échantillon est épuisé en matière grasse par le passage du solvant (hexane) pendant 8 heures. Une fois l'extraction est terminée, le solvant est éliminé à l'aide d'un Rotavapor. L'avantage de ce procédé est que le solvant condensé s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (Haidara, 1996).

➤ Protocole

40g d'échantillon sont disposés dans une cartouche cellulosique poreuse, puis introduite dans l'extracteur de Soxhlet. 800 ml d'hexane sont mises en ébullition dans un ballon monocolé relié au pied de l'extracteur (Haddoudi *et al.*, 2014). Les vapeurs dégagées passent par une tubulure menant au réfrigérant pour y être condensées. Le condensat tombe par gravité dans le réservoir contenant la cartouche et solubilise les molécules actives. Une fois plein, le mélange solvant- extrait est siphonné vers le ballon ce qui permet de régénéré le solvant et de recommencer un autre cycle.

Le rendement en huile est calculé de la formule suivante:

$$R (\%) = \frac{\text{La quantité de l'extrait brut (g)} * 100}{\text{La quantité initiale de l'échantillon (g)} * MS}$$

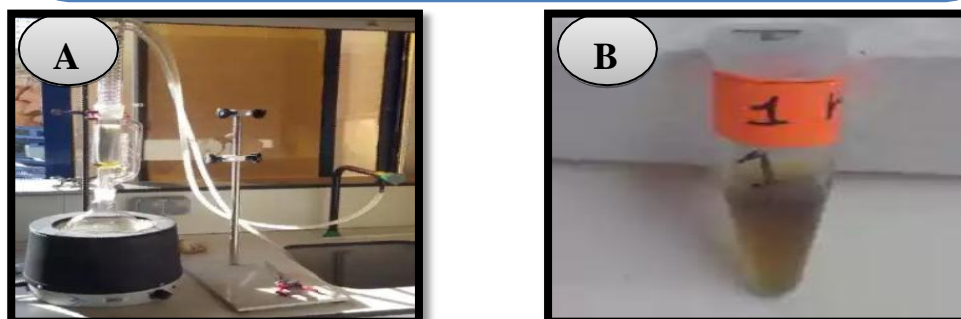


Figure 13: Extraction de l'huile du marc de café par Soxhlet (A: Montage du Soxhlet ; B :Huiles grasses récupérée)

2. Evaluation du potentiel chimique du marc de café

La teneur en eau a été déterminée selon la méthode décrite par l'Union Internationale de Chimie Pure Appliquée (UICPA, 1979). Cependant, la matière minérale (méthode ID 942.05), et la matière grasse (EE; méthode ID 920.39) ont été effectuées selon les normes décrites par l'AOAC (1990), Les dosages ont été faits en triplet et les résultats sont exprimé en g/Kg.

2.1. Détermination de la teneur en eau (humidité)

➤ Principe

La détermination de la teneur en eau est basée sur la dessiccation d'une quantité bien définie d'un échantillon quelconque dans une Etuve à 45°C pendant 24 heures jusqu'à poids stable.

➤ Protocole:

3g du marc de café humide sont pesés séparément dans des creusets en porcelaine préalablement tarés, ils sont par la suite placés dans une étuve maintenue à 45°C pendant 24 heures jusqu'au poids constant. Les creusets sont mis dans un dessiccateur pendant 2 heures pour absorber l'humidité résiduelle restante. La teneur en eau est calculée

$$MS (\%) = \frac{P_2 - T_c}{P_1 - T_c} * 100$$

comme suit:

Où: P1: poids de l'échantillon avant séchage (g).

P2: poids de l'échantillon après dessiccation (g).

Tc: poids de creuset vide taré (g).

Le taux d'humidité est calculé à partir de la formule suivante:

$$\% \text{ d'humidité} = 100 - \% \text{MS}$$

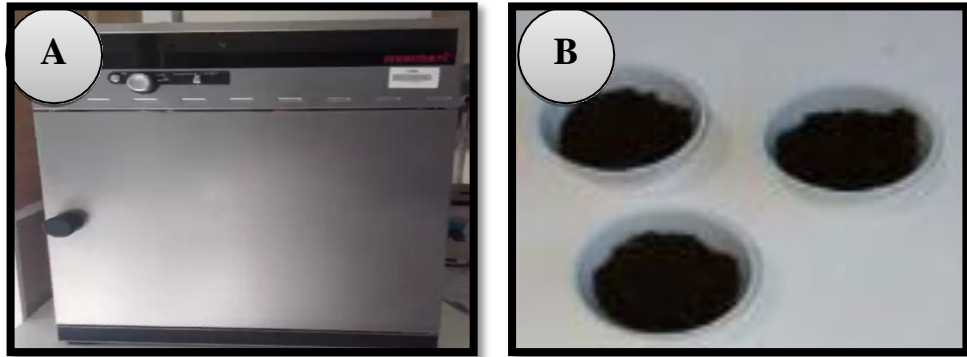


Figure 14: Détermination de la matière sèche (A: Etuve ventilée; B: Echantillons secs).

2.2. Détermination de la teneur en cendres

➤ Principe:

Il consiste en une incinération des échantillons dans un four à moufle à une température avoisinant les 550°C, jusqu'à l'obtention de résidus blancs. Ce résidu contient des oligo-éléments essentiels.

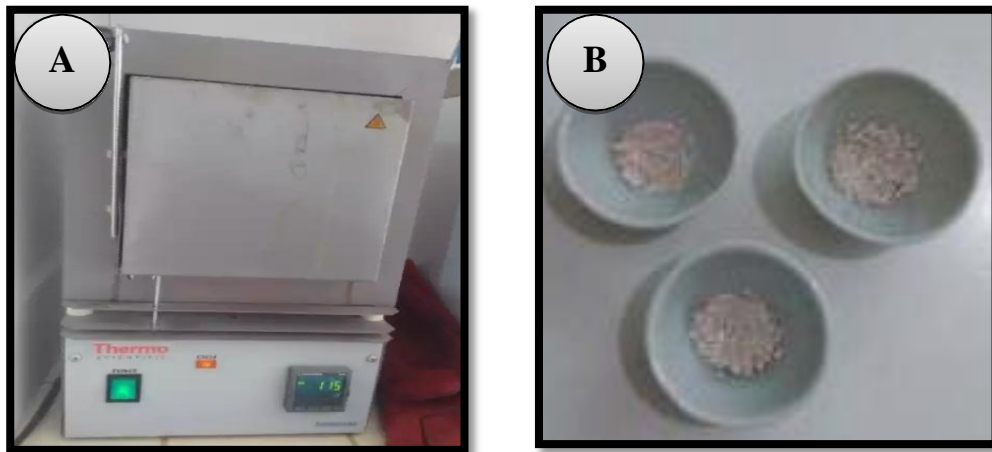


Figure 15: Détermination de la matière organique (A: Four à moufle ; B: Marc du café incinéré)

➤ Protocole:

3g de la matière sèche déjà obtenue est pesée dans un creuset taré, ils sont placés dans un four à moufle porté à 550°C pendant 12 heures.

La substance prend une couleur blanche grisâtre qui blanchit en refroidissant dans un dessiccateur sous atmosphère sèche. Le pourcentage des cendres est calculé par l'expression suivante:

$$\text{MM}(\%) = \frac{P_3 - T_c}{P_1 - T_c} * 100$$

Où: **P3**: poids de creuset après incinération. **P2**: poids de creuset après dessiccation. **Tc**: poids de creuset vide.

La teneur en matière organique représente le complément à 100 des cendres

$$\% \text{MO} = 100 - \% \text{ cendres}$$

2.3. Détermination de la teneur en matière grasse (MG)

➤ **Principe:**

La graisse est extraite par des solvants, en général l'éther de pétrole et l'hexane. L'extraction est effectuée, soit d'une manière discontinue par décantations successives dans des ampoules, soit d'une manière continue dans des appareils spéciaux à épuisement comme le « Soxhlet ».

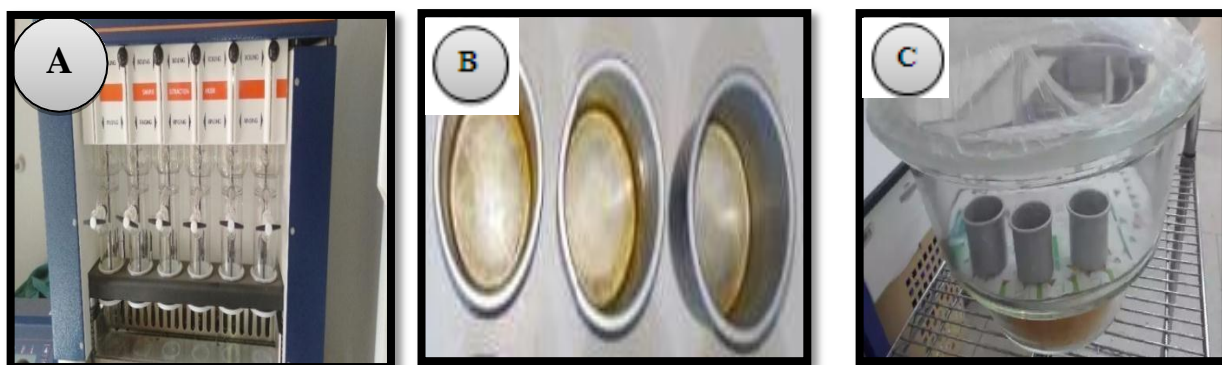


Figure 16: Détermination de la matière grasse (A: Appareil de Soxhlet; B:Creusets secs ; C : Dissicateur)

➤ **Protocole:**

Environ 1g de chaque échantillon sont pesés dans des cartouches poreuses, après introduction de 25 ml d'hexane dans chaque creusé en aluminium, la cartouche est déposée dans l'extracteur et les parties de l'appareil sont assemblées. L'hexane est alors porté à ébullition pendant 55 min sur des plaques chauffantes jusqu'à obtention d'un maximum d'hexane dans l'extracteur. Une fois l'hexane éliminé, les cartouches sont séchées à l'étuve à 105°C pendant 1 à 2 h et les creusés sont pesés. L'expression des résultats se fait comme suit :

$$\text{MG (\%)} = \frac{P_e - P_v}{\text{poids de l'échantillon}} * 100$$

Où: **PE** : poids du creuset avec l'extrait étheré ;

PV : Poids du creuset vide
Etude comparée de la caractérisation biologique de l'huile du marc de café et l'huile commerciale

La détermination du potentiel antioxydant, enzymatique et microbiologique de l'huile grasse extraite à partir du marc de café est poursuivie en comparaison avec une huile grasse commercialisée comme un complément alimentaire dans l'alimentation des volailles. Cette Huile végétale non raffiné est collectée d'une unité de fabrication d'aliments des volailles de Route El Beida (wilaya de Khenchela). Elle est destinée comme additif dans la fabrication d'aliment des volailles.



Figure 17: L'huile commerciale.

2.1. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons

Compte tenu de la complexité des processus d'oxydation, il manifeste clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser le potentiel oxydant d'un échantillon, il faut donc combiner plusieurs testes complémentaire pour pouvoir offrir des résultats cohérents et exhaustifs.

En conséquence, dans notre étude, la mise en évidence de l'activité antioxydant *in vitro* de nos extraits des huiles a été réalisée à travers quatre activités, à savoir: le piégeage du radical libre DPPH+, le piégeage du radical libre ABTS+, Le pouvoir réducteur des ions cupriques (CUPRAC) et la méthode de la Réduction du fer FRAP (Ferric reducing-antioxydant power).

2.1.1. Activité du piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

➤ Principe:

Le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH) est un radical libre stable, en acceptant un électron ou un radical hydrogène devient stable. L'effet des antioxydants sur ce radical se traduit par leurs capacités à lui donner un atome d'hydrogène. La réduction de DPPH est déterminée par le changement de couleur du violet vers le jaune (Atoui et *al.*, 2005 ; Haddoudi et *al.*, 2014).

L'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité antioxydant (Molyneux, 2004).

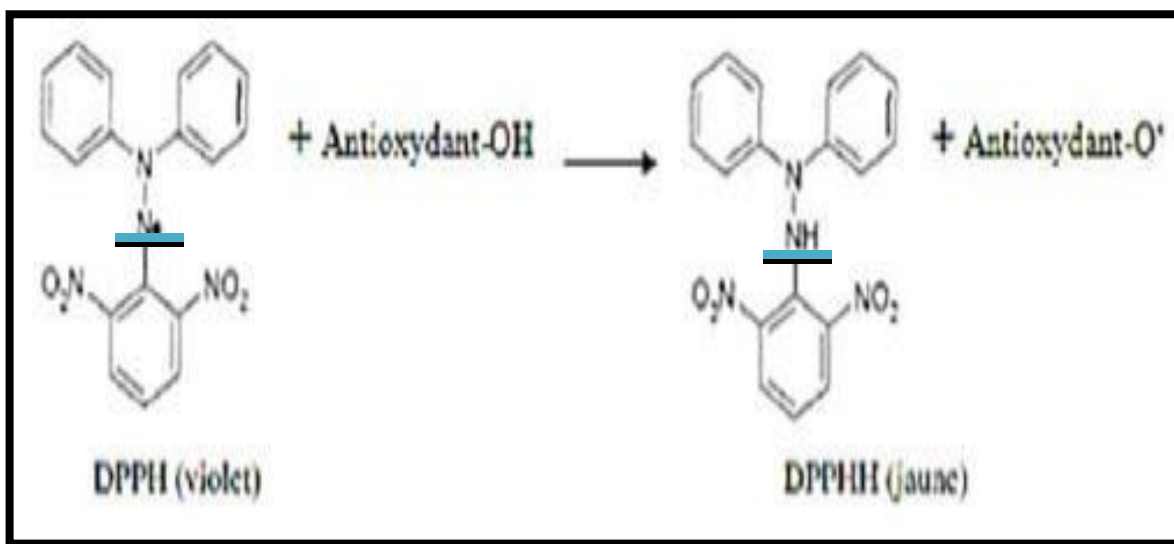


Figure 18: Réaction de test DPPH (2.2 Diphenyl 1 picrylhydrazyl)(Molyneux, 2004).

➤ Protocole:

Dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de différentes concentrations (annexe 03) de chaque huile sont introduites et supplémentées par 160 µl de la solution de DPPH préalablement préparée. Un contrôle positif représenté par une solution d'un antioxydant standard (le α-tocophérol, BHA, BHT) et un blanc préparé en mélangeant 40 µl de méthanol avec 160µl de la solution de DPPH sont introduits dans la plaque et traités dans les mêmes conditions. La microplaque est par la suite incubée à l'obscurité et à température ambiante

pendant 30 min. L'absorbance est mesurée à 517 nm via un lecteur microplaque (Multimode Reader, ENSPRO ®, Singapore).

L'activité antioxydant, qui exprime la capacité à piéger le radical libre est généralement estimée par le pourcentage d'inhibition (I%) donné par la relation suivante :

$$I \% = [(A0-A1) / A0] * 100$$

Où: **A0**: Absorbance à 517nm du standard

A1: Absorbance à 517 nm après 30 minutes d'incubation de l'échantillon.

2.1.2. Activité du piégeage du radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS +)

➤ Principe:

L'activité antioxydant totale d'une molécule est déduite de sa capacité à inhiber le radical ABTS⁺, obtenu à partir de l'ABTS. L'obtention du radical cation résulte du contact de l'ABTS avec une enzyme persulfate de potassium (Re et *al.*, 1999). Le radical ABTS⁺, en contact avec un donneur de H• conduit à l'ABTS⁺ et à la décoloration à 734 nm de la solution (Lien et *al.*, 1999).

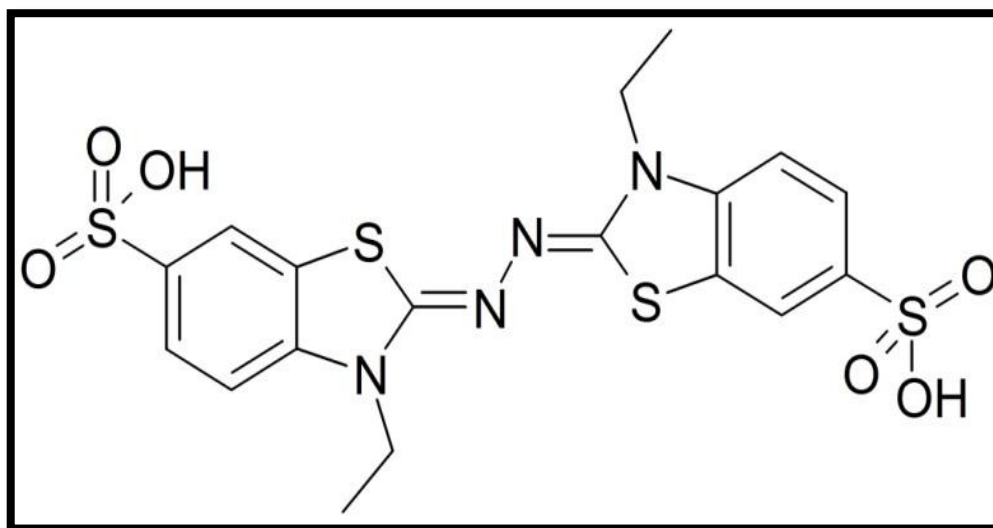


Figure 19: Structure chimique d'ABTS (Lien et *al.*, 1999).

➤ **Protocole:**

L'activité ABTS est déterminée par la méthode de Re et *al.*, (1999), tel que dans une microplaque à 96 puits, 40 µl de chaque échantillon à différentes concentrations sont incubés avec 160 µl de la solution ABTS⁺ pendant 10 minutes à température ambiante et dans l'obscurité avec un blanc sans échantillon préparé dans les mêmes conditions.

L'absorbance est mesurée à 734 nm via un lecteur microplaque (Multimode Reader, ENSPRO ®, Singapore). Le pouvoir anti radicalaire de l'extrait est exprimé en pourcentage d'inhibition du radical ABTS⁺:

$$I \% = [(A0-A1) / A0] * 100$$

Où : **A0** : l'Absorbance de la réaction contenant que les réactifs ;

A1: Absorbance à 734 nm après 10 minutes d'incubation de l'échantillon.

2.1.3. Le pouvoir réducteur des ions cupriques (CUPRAC)

➤ **Principe**

Le Cupric reducing antioxidant capacity est déterminé par la méthode CUPRAC. Ce test est basé sur les modifications des caractéristiques d'absorption du complexe néocuproïne (Nc) cuivre (II) lorsqu'il est réduit par un antioxydant. Le potentiel de réduction de l'échantillon ou de l'étalon convertit efficacement Cu²⁺ en Cu⁺, changeant ainsi l'absorbance maximum, comme le montre la figure 20. Ce complexe de cuivre réduit donne une absorption maximum à 450 nm (Apak et *al.*, (2004).

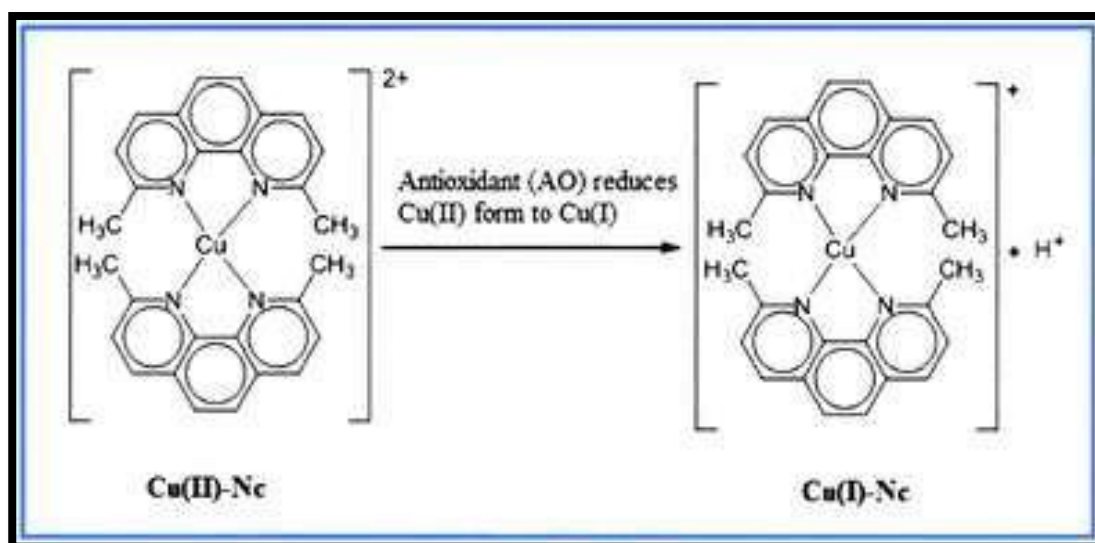


Figure 20: Réduction de neocuproïne/copper (II) complexe (Apak *et al.*, 2004).

➤ **Protocole:**

Dans une microplaque 96 puits, un volume de 40 µl de chaque huile ainsi que les différentes concentrations (annexe 03) est mélangé avec 60 µl de la solution d'acétate d'ammonium, 50 µl de la solution (CuCl₂·2H₂O) et 50 µl de solution Neocupronin (Apak *et al.*, 2004). Un contrôle positif représenté par deux antioxydants de synthèse (BHA, BHT) et un blanc préparé en remplaçant les extraits par le méthanol sont introduits dans la plaque et traités dans les mêmes conditions. Après 1 heure d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, l'absorbance est mesurée à 450 nm par un lecteur microplaque (Multimode Reader, ENSPRO ®, Singapore). Le pouvoir réducteur des ions cupriques des huiles est exprimé en pourcentage d'inhibition :

$$I \% = [(A0 - A1) / A0] * 100$$

Où : **A1**: Absorbance à 450 nm après 1 heure d'incubation de l'échantillon.

A0: Absorbance à 450 nm après 1 heure d'incubation de standard.

2.1.4. Réduction du fer FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

➤ **Principe**

La méthode de FRAP est basée sur la réaction chimique de réduction des ions Ferriques Fe(III) présent dans le complexe de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ en ion Ferreux Fe(II) coloré par le bleu selon la méthode de Oyaizu, (1986). L'absorbance du milieu réactionnel est déterminée à 700 nm. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des huiles testée (Hubert, 2006).

➤ **Protocole**

L'activité réduction du fer est déterminée par la méthode d'Oyaizu, (1986) avec une légère modification.

Dans une microplaque 96 puits, un volume de 10 µl de chaque huile ainsi que les différentes concentrations est mélangé avec 40 µl du tampon phosphate (pH=6.6) et 50 µl du potassium ferricyanide (1%) K₃Fe(CN)₆. Ils sont par la suite incubés dans l'étuve à 50°C

pendant 20 min. Après cette pré-incubation, 50 µl de tri-chloro acetic 10%, 40 µl H₂O et 10 µl de ferric chloride 0.1% sont additionnés. Un blanc préparé en remplaçant les huiles par le méthanol est préparé et traité dans les mêmes conditions.

L'absorbance est mesurée à 700 nm par un lecteur microplaque (Multimode Reader, ENSPRO[®], Singapore). Le pourcentage d'inhibition de cette activité est calculé par la relation suivante:

$$I \% = [(A0 - A1) / A0] * 100$$

Où : A1: Absorbance à 700 nm de l'échantillon avec les réactifs.

A0: Absorbance à 700 nm de standard.

2.2. Evaluation du potentiel enzymatique des échantillons

2.2.1. L'activité anti-Alzheimer

La mise en évidence de l'activité anti-Alzheimer *in vitro* de nos huiles est réalisée par deux enzymes impliquées directement dans la maladie, à savoir: l'acétylcholinestérase et le butylcholinestérase selon la méthode d'Ellman et *al.*, (1961). L'activité anticholinestérase

Dans un microplaque à 96 puits, un volume de 150 µl de tampon phosphate de sodium (100 mM, pH = 8) avec 10 µl d'une solution d'échantillon dissoute dans l'éthanol à différentes concentrations et un volume de 20 µl l'ACHé ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés et incubés dans l'étuve pendant 15 min à 37°C.

Après, 10 µl de DTNB (0,5 mM) ont été ajoutés. Ensuite, la réaction a été initiée par l'addition de 20 µl d'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM).

Les hydrolyses de ces substrats ont été suivies par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 412 nm, en utilisant un lecteur de microplaques (Multimode Reader, ENSPRO[®], Singapore). La galanthamine a été utilisé comme composé de référence.

Le pourcentage d'inhibition de l'ACHé a été déterminé par comparaison des vitesses de réaction d'échantillons par rapport à l'échantillon témoin (éthanol dans du tampon phosphate, pH = 8) en utilisant la formule suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = ((E - S) / E) * 100$$

Où: E: L'activité de l'enzyme sans échantillon d'essai

S: L'activité de l'enzyme avec l'échantillon de test.

2.2.1.1. L'activité butyrylcholinestérase

Elle est basée sur le même principe que l'activité précédente en remplaçant l'AChE ($5,32 \times 10^{-3}$ U) par BChE ($6,85 \times 10^{-3}$ U) et l'iodure d'acétylthiocholine (0,71 mM) par le chlorure de butyrylthiocholine (0,2 mM).

2.2.2. L'activité anti diabétique

La mise en évidence de l'activité antidiabétique *in vitro* de nos huiles est réalisée par l'enzyme impliquée directement dans la maladie, à savoir: l' α -amylase selon la méthode iode/iodure de potassium (IKI) (Zengin *et al.*, 2014a) avec quelques modifications.

La microplaque à 96 puits est remplie (figure 21), par un volume de 25 μ l d'extrait de différentes concentrations puis on ajoute 50 μ l de solution de l' α -amylase, on incube pendant 10 min à 37°C. Ensuite 50 μ l d'amidon sont additionnés. Après une deuxième incubation de 10 min à 37°C, 25 μ l d'acide hypochlorique (HCl) (1M) et 100 μ l d'iodure de potassium iode (IKI) sont ajoutés. L'absorbance est mesurés à 620 nm.

L'**acarbose** est utilisé comme un standard, et les résultats sont exprimés en %
d'inhibition

et d'**IC₅₀**. Le pourcentage d'inhibition l' α -amylase est calculé selon cette
 équation :

$$\text{INH (\%)} = [1 - \{(Ac - Ae) - (As - Ab) / (Ac - Ae)\}] \times 100$$

Où : **Ac**=Absorbance [Amidon + IKI + Hcl + huile+ Tampon + Enzyme].

Ae =Absorbance [Enzyme + Amidon + IKI +Hcl + huile].**As**=Absorbance
 [Enzyme + huile + Amidon + IKI +Hcl]. **Ab**=Absorbance [Extrait+IKI+ Tampon].

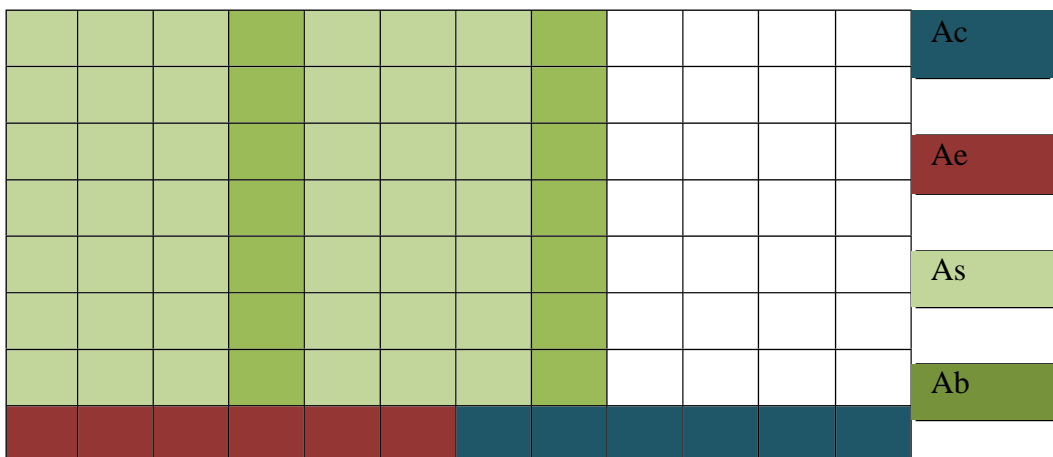


Figure 21: La microplaque 96 puits pour l'activité α - amylase.

2.3. Evaluation du potentiel microbiologique des échantillons vue

Les méthodes du laboratoire qui permettent d'estimer les propriétés d'un produit *in vitro* sont nombreuses, mais reposent toutes sur le même principe, celui de confronter la substance probablement avoir une activité antimicrobienne (extrait, huile,...etc.) et l'agent pathogène (champignons, bactéries, insectes,...) sur un support artificiel. Seule l'activité antifongique est testée dans notre étude.

La détermination du pouvoir antifongique est évaluée par la technique décrite par Chang et *al.*, (2000) en utilisant l'agent phytopathogène « *Fusarium oxysporum* f.sp » déjà isolée sur un milieu PDA (annexe 02).



Figure 22: Culture pure de *Fusarium oxysporum* f.sp.

2.3.1. Préparation des milieux de culture

Cette étape consiste à liquéfier le milieu gélosé PDA déjà préparé (annexe 02) dans un autoclave pendant 20min. Par la suite, on coule aseptiquement le milieu en surfusion dans des boîtes de Pétri à raison de 100ml à 60°C par 4 boîtes de Pétri. Avant que le milieu soit coulé, en lui rajoute à chaque fois une dose de l'huile. Le tableau suivant montre les doses utilisées.

Tableau 05: les doses utilisées des huiles et le DMSO		
	Les doses utilisées pour les huiles (µl)	Les doses utilisées pour DMSO (µl)
Huile grasse	50	950
Huile grasse	100	900
Huile grasse	200	800
Huile commerciale	50	950
Huile commerciale	100	900
Huile commerciale	200	800
Témoin (+)	00	1000
Témoin (-)	00	00

2.3.2. Inoculation et incubation

A l'aide d'une pipette Pasteur, des disques mycéliens d'environ 5 mm de diamètre sont obtenus à partir de la culture pure de *Fusarium oxysporum* f.sp (Figure 23).

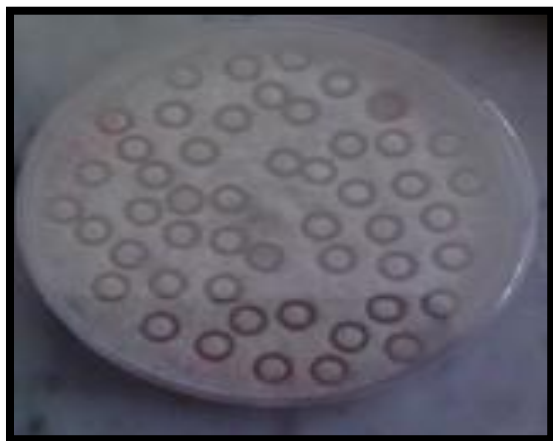


Figure 23: Disques mycéliens préparé pour l'activité antifongique

Une fois le milieu de culture qui contient les huiles grasses est solidifié, on prélève aseptiquement à l'aide d'un pipete stérile un disque. Puis, on le dispose sur le centre de la gélose préalablement préparée. Enfin les boîte de Pétri sont ensuite fermés et incubées dans l'étuve à 25 ± 2 °C pondant 7 jours.

2.3.3. La lecture

L'effet antifongique ou l'indice antifongique des huiles testées est déterminé par la mesure du taux de la croissance après incubation à 25 C° pendant 7 jours en utilisant la formule suivante:

$$\text{Indice antifongique} = \frac{Db - Da}{Db} * 100$$

Où: Da: Diamètre de la colonie fongique en présence de l'extrait en (cm).

Db: Diamètre de la colonie fongique du témoin en (cm).

L'huile est qualifiée de très actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 75% et 100 %, la souche fongique est dite sensible. Il est actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 50 % et 75%, la souche fongique est dite sensible. Il est considéré moyennement actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 25% et 50%, la souche fongique est dite limitée. En fin, il est peu ou pas actif lorsqu'il possède une inhibition comprise entre 0% et 25%, la souche fongique est dite peu sensible ou résistante. (Motiéjunaité et Peiculyté, 2004). Analyse statistique:

Tous les tests ont été effectués en triplet. Les moyennes et les écarts types sont calculés avec Excel de Microsoft Office 2010. Pour l'analyse statistique, eu regard les circonstances imposées, nous n'avons pas pu réaliser l'analyse statistique adéquate de nos résultats. A cet effet, nous essayons, en quelque sorte, de faire une approximation relative pour comparer les résultats obtenus pour les deux échantillons pour tous les paramètres étudiés

1. Analyse chimique du marc de café

La teneur en eau, la teneur en cendres et la teneur en matière grasse du MC sont illustrés dans le tableau 06. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de trois répétitions \pm écart type.

Tableau 06: Le taux d'humidité, teneur en minéraux et en matières grasses du marc de café			
(% MS)			
	Humidité (MS)	Matières minérales (MM)	Matières grasses (MG)
Marc du café	41.5\pm 0.05	1.76 \pm 0.14	21.77 \pm 2.11

1.1. La teneur en eau (humidité%)

Le marc de café étudié renferme un taux d'humidité estimé à 41,5%. Notre résultat est cohérent avec celui de Cruz et *al.*, (2015) ayant trouvé un taux d'humidité du MC variant entre 18 à 45%. L'origine, le type, la variété du café, les conditions de torréfaction et les différentes techniques de préparation de la boisson de café ont été rapportés avoir un effet significatif sur le taux finale d'humidité du marc.

1.2. La teneur en cendres

Les minéraux présentent 1.76 % de la matière sèche du marc de café. Le résultat obtenu dans cette étude est en accord avec celui de Cruz et *al.* (2015) rapportant une quantité des minéraux dans le marc du café variant entre 0.8-3.5% MS. Dans ce dernier, plusieurs éléments ont été identifiés et quantifiés, à savoir le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium, le manganèse, le cuivre, le sodium, le fer et le zinc. Le potassium est considéré comme le minéral le plus abondant dans le marc (Mussatto et *al.*, 2011 ; Capos-véga et *al.*, 2015; Cruz et *al.*, 2015). Ces minéraux sont considérés comme des micronutriments essentiels pour la santé humaine. Ils régulent de multiples fonctions métaboliques et physiologiques du corps humain, de plus, ils pourraient être utilisés pour la production d'aliments nutritifs ajoutés (Kuan et *al.*, 2011).

1.3. La teneur en matière grasse

Le marc du café étudié renferme 21.77 % MS des matières grasses. Ce résultat est, à un certain degré élevé par rapport aux résultats rapportés par Simões *et al.*, (2009) et Cruz *et al.*, (2012) ayant stipulé un taux de lipide dans le marc situant entre 9,3 et 16,2%. Cela pourrait

être traduit par le fait que le type des lipides contenus dans notre marc est mal extrait par l'eau chaude.

D'une manière générale, le marc du café est composé de 84,4 % de triglycérides. Ceux-ci sont représentés par l'acide linoléique (C18:2), l'acide palmitique (C18:2) et (C16:0), l'acide oléique (C18:1) et l'acide stéarique. Ainsi, 12,3% d'esters d'alcool diterpéniques, 1,9% de stérols, 1,3% de matière polaire et 0,1% des esters de stérol sont également quantifiés (Capos-Vega *et al.*, 2015).

2. Evaluation du potentiel antioxydant des échantillons

2.1. Rendement d'extraction de l'huile grasse

En utilisant le Soxhlet pour le procédé d'extraction de l'huile grasse, le rendement désigne le rapport entre la quantité de l'extrait récupérée après évaporation du solvant et la quantité initiale du marc. Dans notre étude, le rendement d'extraction de l'huile du marc de café par Soxhlet est estimé à 15 %.

Notre résultat est similaire à celui obtenu par Haddoudi *et al.*, (2014) ayant enregistré un rendement égale à 14.98%. En fait, il est difficile de comparer les rendements obtenus dans notre étude avec ceux de la bibliographie, car le rendement n'est que relatif et dépend de la **méthode** et les **conditions dans les quelles** l'extraction a été effectuée (solvant, rapport solvant/poudre, temps d'extraction...etc.), à l'origine et aux différentes variétés du café (culture, climat...etc.) et aux différents procédés de torréfaction (Al-Hamamre *et al.*, 2012).

2.2. Piégeage du radical libre DPPH

➤ **Le pourcentage d'inhibition:**

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH des échantillons à différentes concentrations comparativement aux standards (BHA et BHT) sont représentés dans la figure 25. Il paraît clairement que les huiles testées présentent des taux d'inhibitions comparables entre eux mais différents comparativement aux standards durant toute la gamme des concentrations utilisées dans notre étude. Haddoudi et *al.*, (2014) ont rapporté un pourcentage d'inhibition du radical libre de l'huile du marc de café égale à 367.27 ce qui en contradiction avec notre résultats.

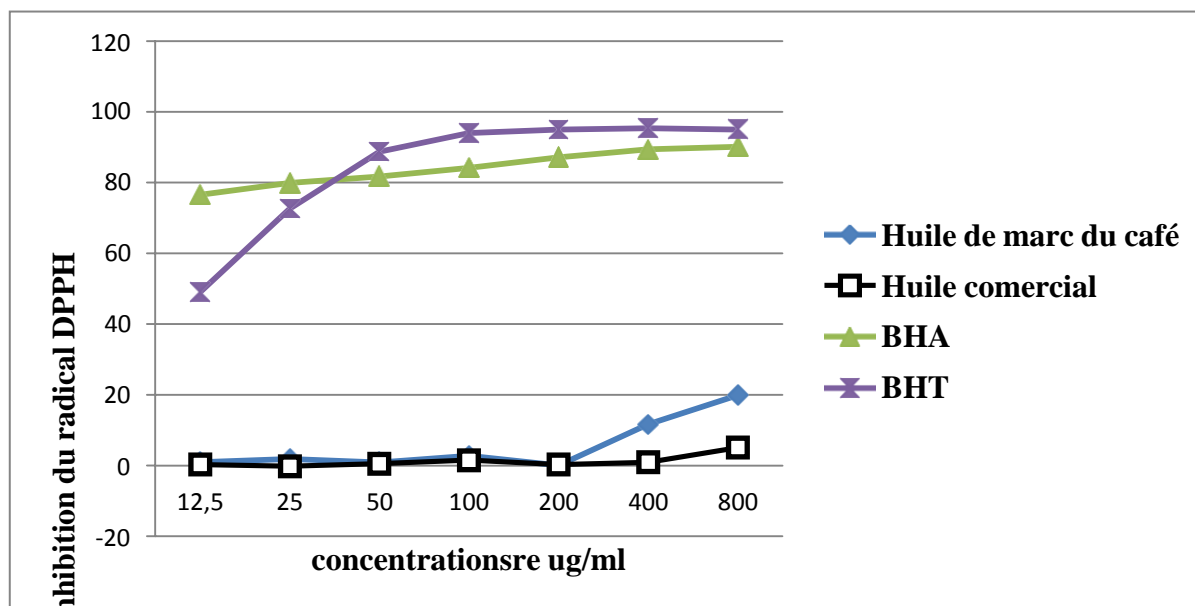
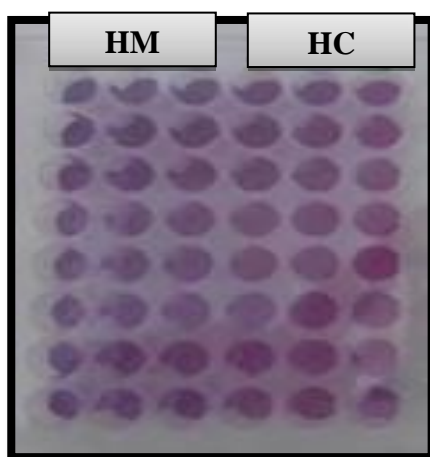


Figure 24: Plaque des résultats de l'activité DPPH pour les huiles testées et les standards (HM: huile de marc du café ; HC: huile commerciale).

Figure 25: Profil de l'activité scavenging du radical DPPH des huiles et des standards à différentes concentrations.

➤ Les valeurs d'IC50

Les valeurs d'IC50 (la concentration d'extrait nécessaire pour inhiber 50% du radical libre DPPH•) des échantillons ainsi que des standards sont présentées dans la figure 26. Il en ressort que les résultats enregistrés pour l'HM sont également similaires à ceux de l'HC et incomparables avec les standards. Toutefois, nous concluons que nos échantillons n'exercent aucun effet piègeur vis-à-vis le DPPH• dans toute la gamme des concentrations utilisées.

L'activité antioxydante est alors absente pour les deux échantillons comparativement aux standards (BHA: 6.14 µg/ml et BHT: 12.99 µg/ml).

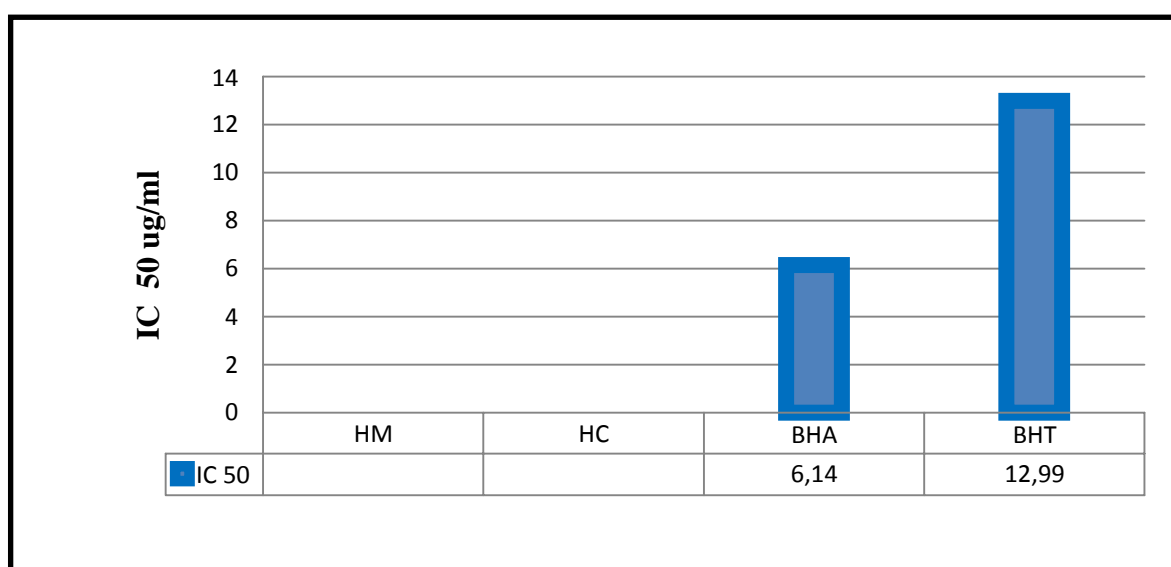


Figure 26: IC50 pour l'activité antiradicalaire DPPH des échantillons et des standards exprimée en µg/ml.

L'absence de l'activité antiradicalaire du DPPH• pour les deux échantillons analysés est probablement due à l'absence des composés polaire à savoir les polyphénols et les flavonoïdes...etc. Plusieurs études ont montré une relation étroite entre la structure des composés phénoliques et leur pouvoir antioxydant (Prior et *al.*, 2005).

2.3. L'activité du piégeage du radical-cation ABTS⁺

➤ Le pourcentage d'inhibition

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical ABTS de deux échantillons

à différentes concentrations comparativement à deux références à savoir le BHT et le BHA sont illustrée dans la figure 28. Il semble que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration pour le BHA, BHT et HM. Cependant l'huile commerciale présente un profil différent.

➤ **Les valeurs d'IC50**

Similairement au cas du test précédent, les valeurs d'IC50 enregistrées pour les deux échantillons sont différentes comparativement aux standards sont représentée dans la figure

29. L'IC50 de l'huile grasse du marc de café est largement supérieur (1336.79 ± 13.24) comparativement au standard (BHA: 1.81 ± 0.10 ; BHT: 1.29 ± 0.30).

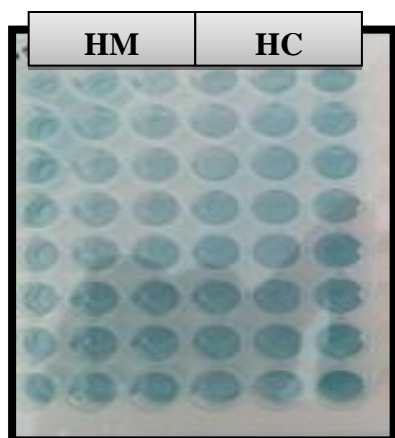


Figure 27: Plaque des résultats de l'activité du piégeage du radical-cation ABTS pour les huiles testées et les standards.

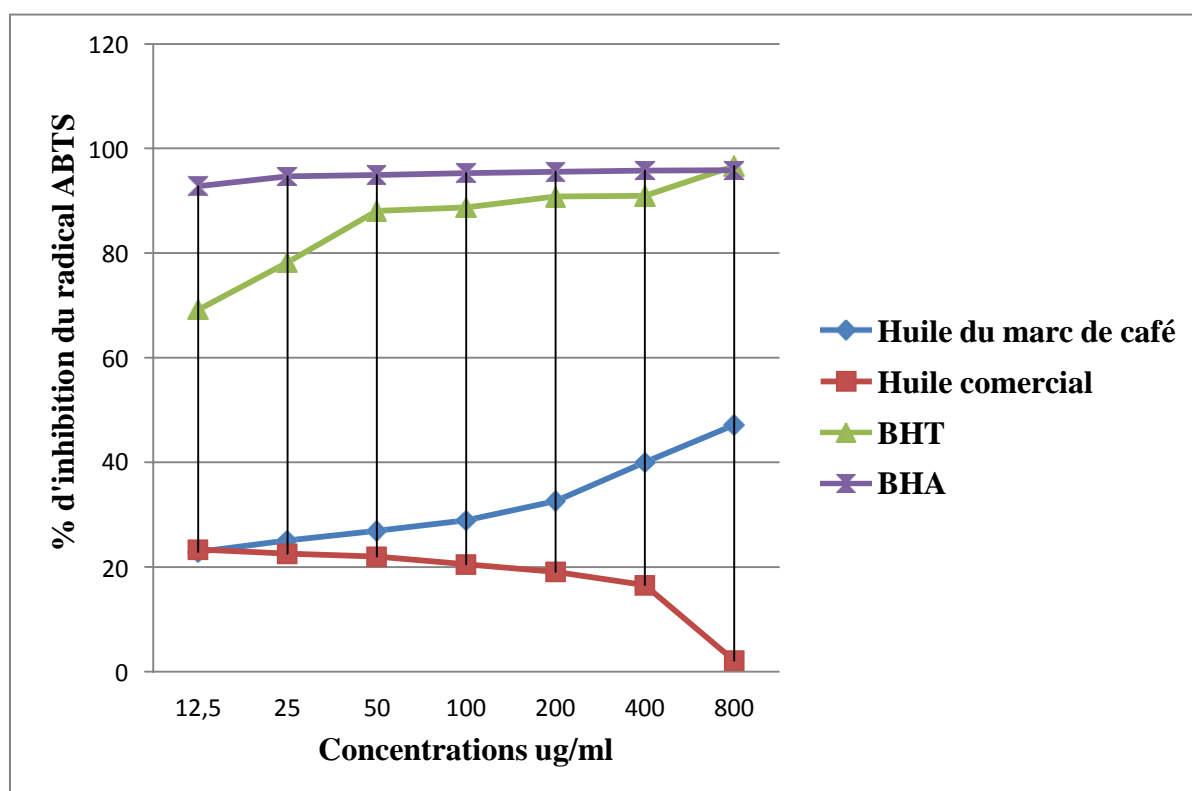


Figure 28: Profil de l'activité antiradicalaire ABTS + des huiles et des standards à différentes concentrations.

Il semble donc que les deux huiles sont très loin d'être des inhibiteurs de l'activité duradicaux ABTS+et ne présentent aucune capacité à neutraliser le radical ABTS+.

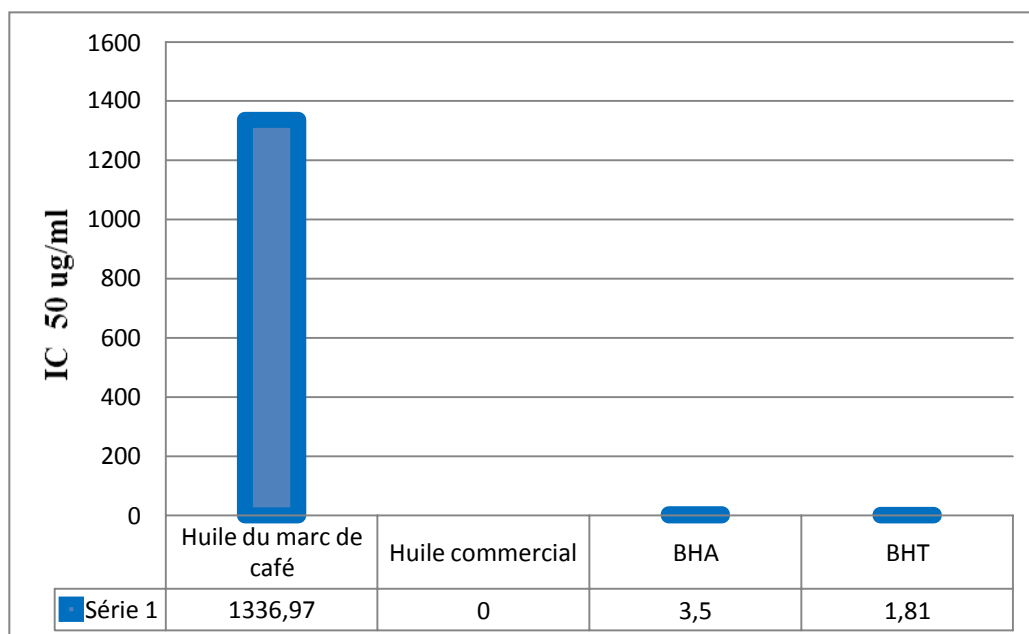


Figure 29: IC50 pour l'activité antiradicalaire ABTS+ des échantillons et des standardsexprimée en µg/ml

2.4. Le pouvoir réducteur des ions cupriques (CUPRAC)

➤ Le pourcentage d'inhibition:

Le taux d'inhibition de l'activité de réduction de Cu^{+2} en Cu^{+} pour les deux huiles sont semblable, mais différentes comparables aux standards durant toute la gamme des concentrations utilisées dans notre étude (Figure 31).

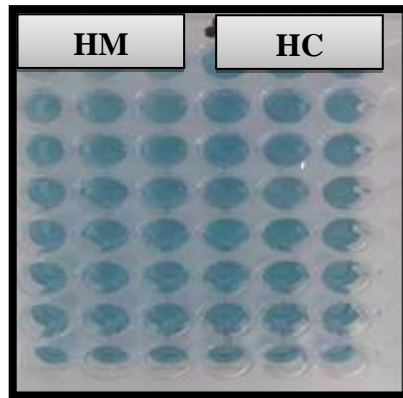


Figure 30:Plaque des résultats de l'activité CUPRAC pour les huiles testées et les standards.

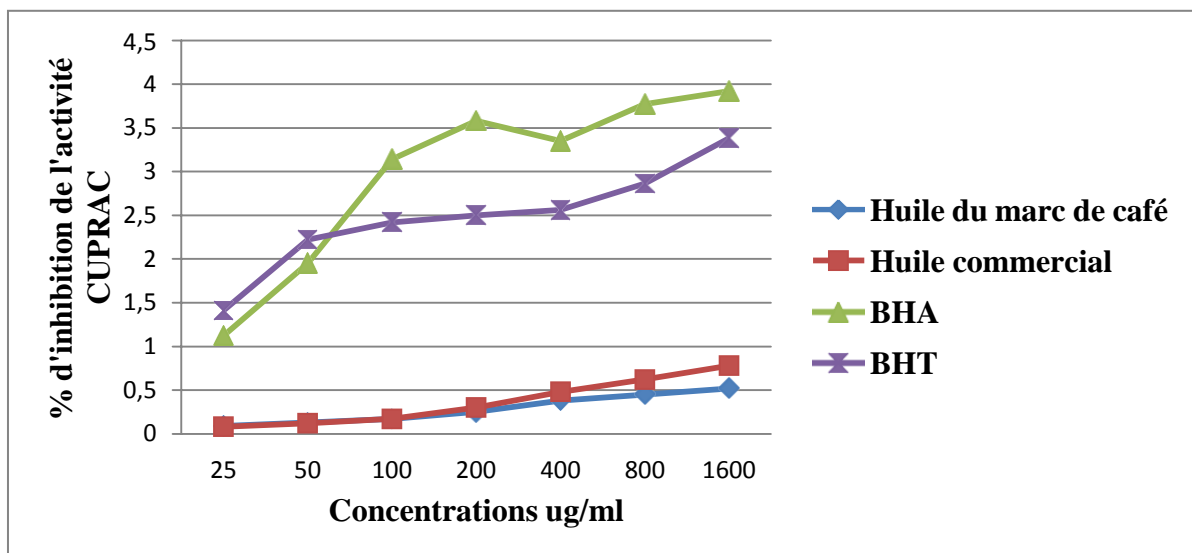


Figure 31: Profil de l'activité CUPRAC des huiles et des standards à différentes concentrations.

➤ **La valeur A0.50:**

L'activité de réduction des ions cuivre des deux échantillons est exprimée par la valeur A0.50 (Figure 32). Les valeurs d'A0.50 enregistrées pour l'HM et l'HC (A0.50=1540 et 365µg/ml, respectivement) sont grandement différentes comparativement aux standards utilisés (9.62 et 3.64 µg/ml pour le BHA et le BHT, respectivement). Ce résultat confirme l'hypothèse que les deux huiles ne

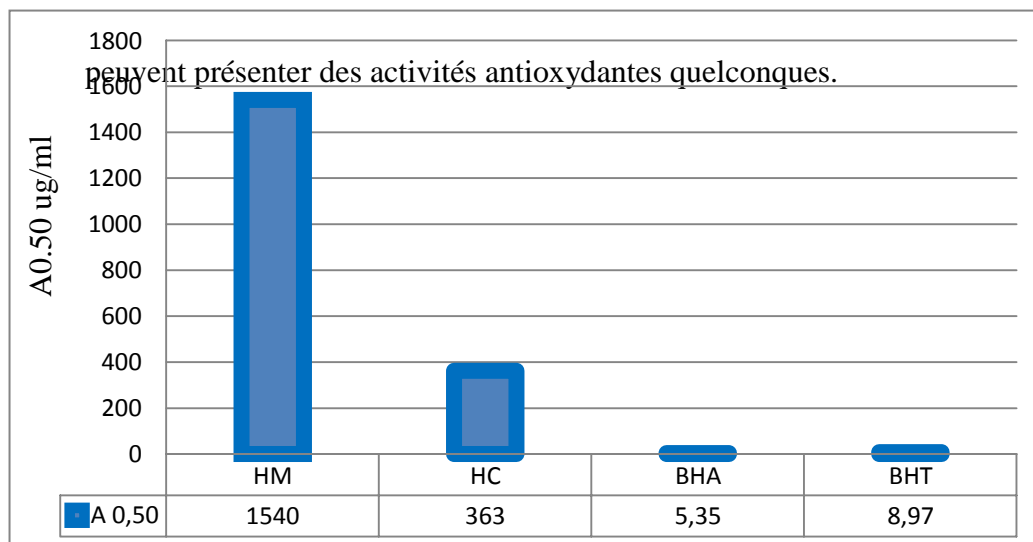


Figure 32: A 0.50 pour l'activité antioxydante CUPRAC des échantillons et des standards exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

2.5. L'activité de réduction du fer ferrique (FRAP)

➤ Le pourcentage d'inhibition:

La capacité antioxydante des huiles peut être évaluée aussi par la détermination du pouvoir réducteur du fer. La figure 33 présente le taux d'inhibition de l'activité de réduction du fer (Fe^{+3}) en (Fe^{2+}) pour les deux huiles en fonction de leur concentrations comparativement à deux standards à savoir le α -tocophérol et l'acide ascorbique.

Les deux huiles testées présentent des taux d'inhibitions similaires au standard (Acide ascorbique) pour les concentrations suivantes; 12.5 et 25 μg . Un taux d'inhibition similaire avec le standard (α -tocophérol) est également enregistré pour les concentrations croissantes suivantes; 50 et 100 μg , Cependant, nous n'avons enregistré aucun effet décelable sur les autres concentrations comparativement aux standards.

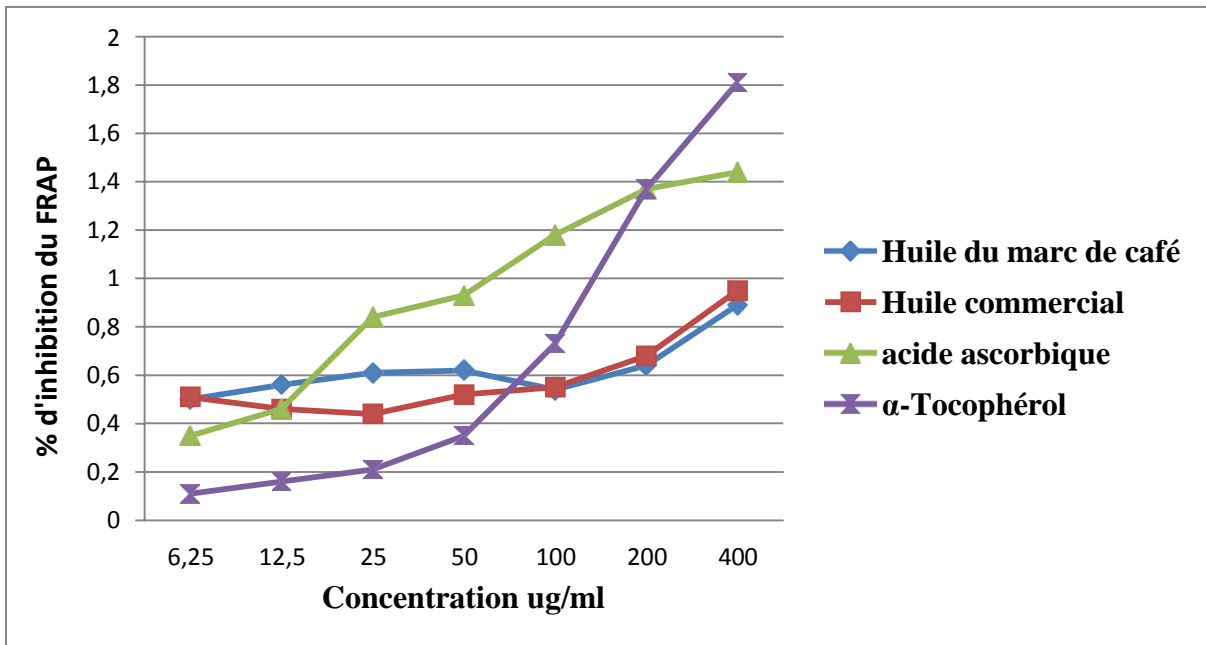


Figure 33: Activité FRAP de l’huile de marc du café et le huile commercial et des standards à différentes concentrations.

➤ **La valeur A0.50**

Les valeurs d’A0.50 enregistrées pour l’HM et l’HC (A0.50 : 4.9 et 6.91 µg/ml, respectivement) sont proches à celle de l’acide ascorbique (6.77 µg/ml) et très différentes comparativement à celle enregistrée pour l’α-tocophérol (34.96 µg/ml).

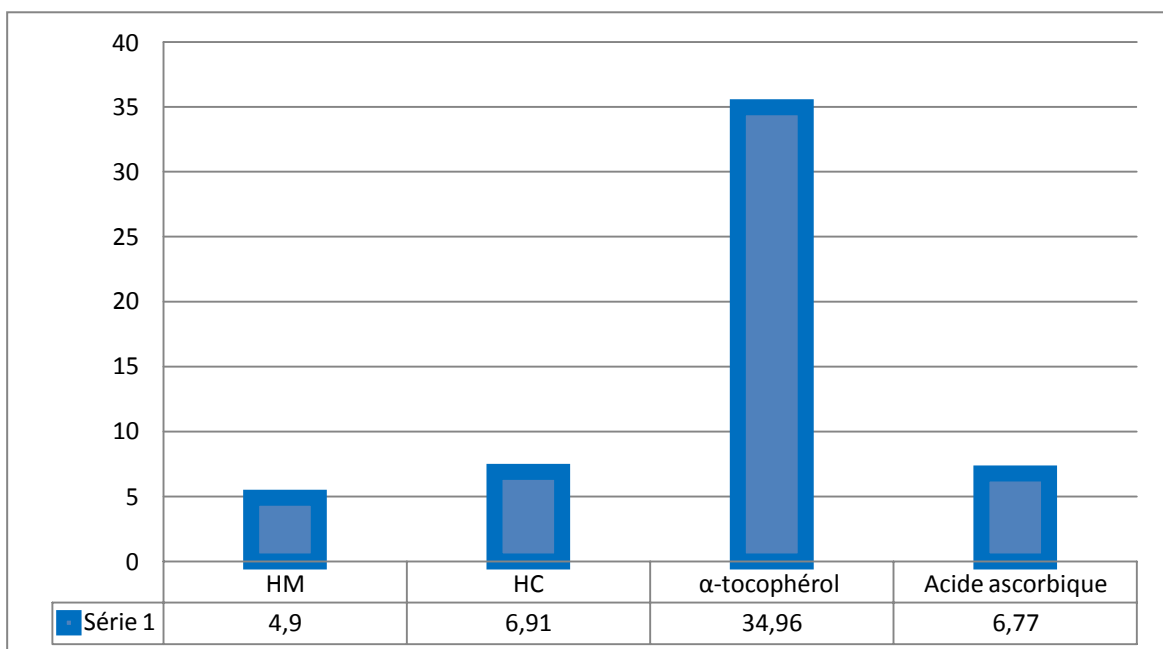


Figure 34: A 0.50 pour l'activité antioxydante FRAP des échantillons et des standards exprimée en $\mu\text{g/ml}$.

D'une manière générale, le pouvoir antioxydant des huiles est très faible, voire inexistant. D'ailleurs, il a été rapporté que le pouvoir antioxydant d'une huile grasse dépend essentiellement de sa pureté, de la nature, la structure chimique et la bioactivité de ses constituants (Prior *et al.*, 2005).

3. Evaluation de l'activité enzymatique des échantillons

3.1. L'activité anti-Alzheimer

La maladie d'Alzheimer, la forme la plus courante de démence chez les personnes âgées, est un trouble neurodégénératif chronique et progressif du cerveau. La général approche pour le traitement de la maladie d'Alzheimer est d'augmenter les niveaux synaptiques d'acétylcholine dans le cerveau en inhibant l'acétylcholinestérase (AChE), qui joue un rôle essentiel dans la transmission cholinergique en catalysant l'hydrolyse du neurotransmetteur acétylcholine (Anand *et al.*, 2012). Les métabolites secondaires emprisonnés dans les extraits végétaux ainsi que dans les huiles ont des propriétés biologiques diverses et très intéressantes prouvées depuis l'antiquité, proposant de ce fait, leur potentielle utilisation dans divers domaines, notamment dans le domaine de la médecine. Dans le but de déterminer le potentiel antidiabétique et anti Alzheimer de nos huiles, des enzymes thérapeutiques potentielles de ces deux pathologies ont été ciblés, à savoir l'alpha amylase et l'alpha glucosidase pour le diabète, et le cholinestérase et le butyryléstérase pour Alzheimer

3.1.1. L'Activité anticholinestérase

➤ Le pourcentage d'inhibition :

Les résultats du pourcentage d'inhibition de l'activité anticholinestérase (AChE) sont représentés dans la figure 35. Le pourcentage d'inhibition varie en fonction de différentes concentrations pour les deux huiles ainsi que le standard. Cette variation est croissante et concentration – dépende. Autrement dit, l'augmentation des concentrations est concomitante avec l'augmentation du pourcentage d'inhibition pour les deux échantillons, jusqu'à ou elle est devenu proche de du standard. Le pourcentage le plus élevé est enregistré à la concentration 400 µg/ml.

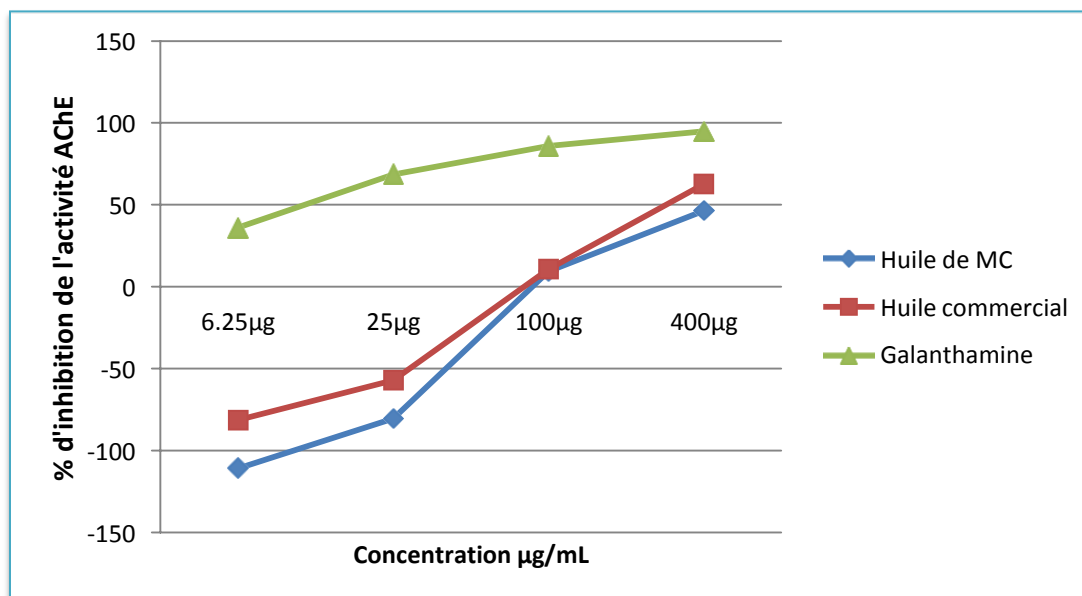


Figure 35 : Activité AChE des deux échantillons et du standard à différentes concentrations

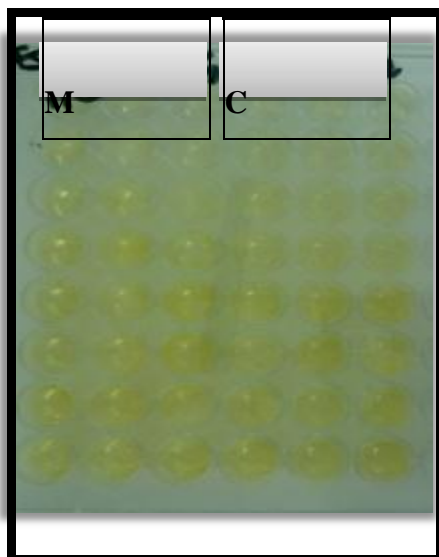


Figure 36: Plaque des résultats de l'activité anti cholinestérase pour les deux huiles testées. Les valeurs d'IC50

Selon la figure 34, les valeurs d'IC50 enregistrées pour les deux huiles sont largement différentes comparativement au standard. L'IC50 de l'huile du marc de café et de l'huile commerciale ont montré des faibles efficacités anticholinestérase ($423,12 \pm 16,48$ et $293,44$

$\pm 8,25$, respectivement) par rapport au standard galanthamine ($6,27 \pm 1,15$) ce qui reflète la présence d'une activité anticholinestérase faible pour les huiles étudiées.

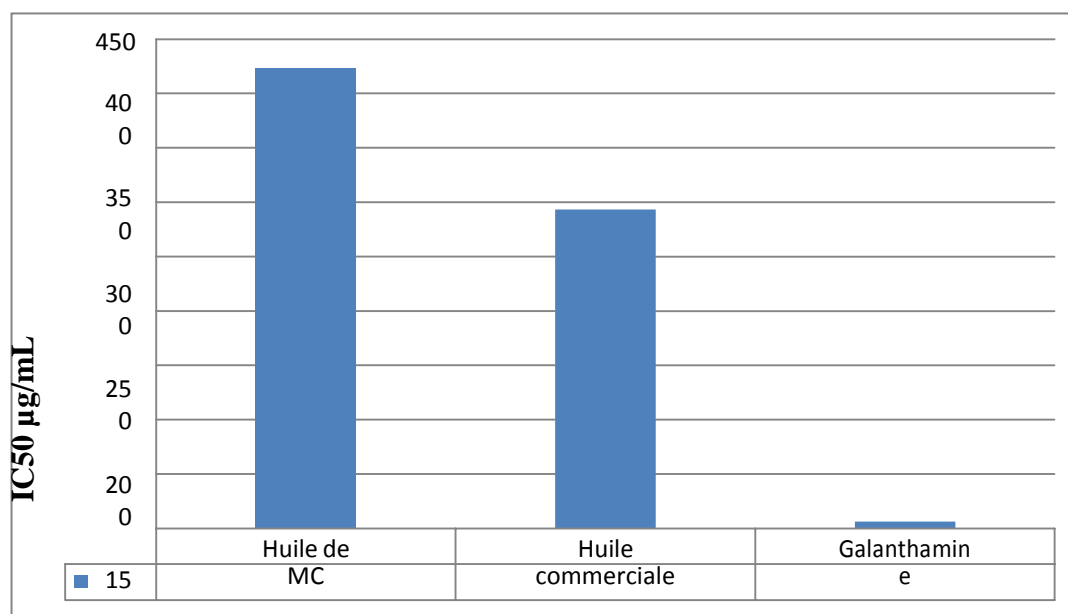


Figure 37: IC50 pour l'activité AChE des échantillons et du standard exprimé en µg/ml.

3.1.2. L'Activité anti-butyryl estérase

➤ Le pourcentage d'inhibition:

Les résultats du pourcentage d'inhibition de l'activité antibutyryl estérase (BChE) sont illustrés dans la figure 38. L'augmentation du pourcentage d'inhibition est proportionnelle avec la concentration. La plus grande inhibition est notée à la concentration 400 µg/ml. Il s'est avéré que le pourcentage d'inhibition de l'huile commerciale est plus proche au standard que celui de l'huile du marc de café parue moins active.

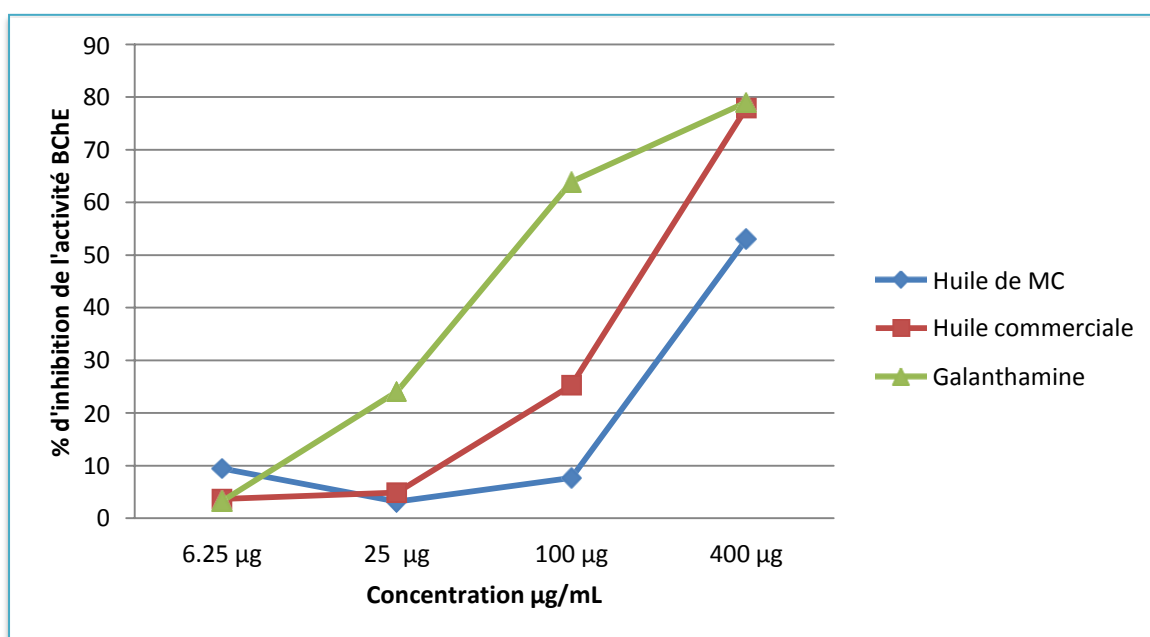


Figure 38: Activité BChE des deux échantillons et du standard à différentes concentrations.

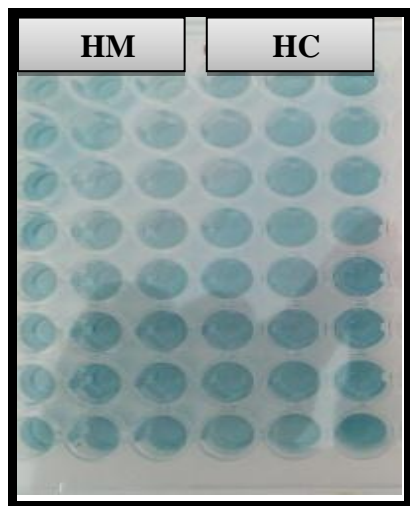


Figure 39: Plaque des résultats de l'activité anti butyryléstérase pour les deux huiles testées.

➤ **Les valeurs d'IC50**

Selon les valeurs d'IC50 enregistrées dans la figure 37, l'huile du marc de café et l'huile commerciale sont présentes une activité anti- butyryléstérase (BChE) mais pas très forte comparativement aux standards.

L'IC50 de l'huile commerciale (189.75 ± 4.25) pas très loin de la valeur du standard (69.45 ± 1.99) contrairement à IC50 d'huile de marc de café (385.62 ± 4.05).

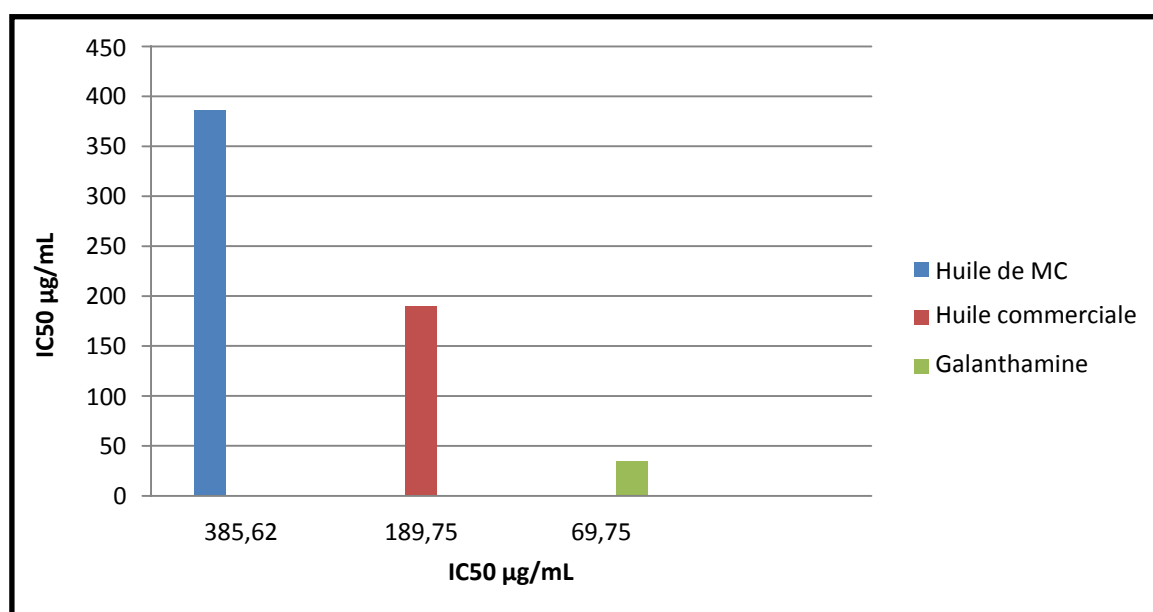


Figure 40: IC50 pour l'activité BChE des échantillons et du standard exprimé en µg/ml.

De ce fait, l'huile du marc de café et l'huile commerciale présentent une activité anticholinestérase et antibutyryléstérase relativement faible comparativement au standard. En absence des études comparatives au notre, nous pouvons attribuer ce constat à la pauvreté des huiles en composants secondaires réputés avoir un effet inhibiteur puissant sur l'AChE et le BchE. Diverses études ont montré que les extraits de café contiennent plusieurs composés phytochimiques, tels que la caféine, les flavonoïdes, les acides phénoliques, les acides chlorogéniques et la catéchine rapportés avoir une activité inhibitrice vis- à- vis l'AChE et le BchE (Orhan et *al.*, 2012 ; Sekeroglu et *al.*, 2012) .

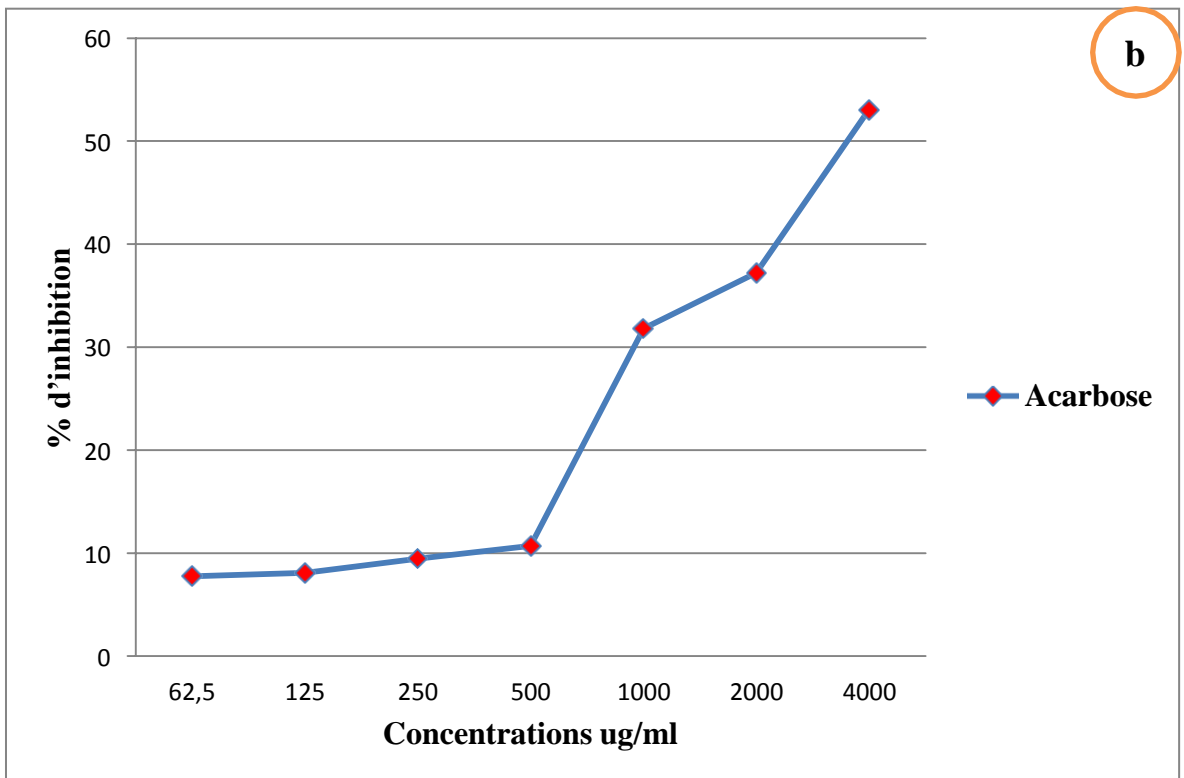
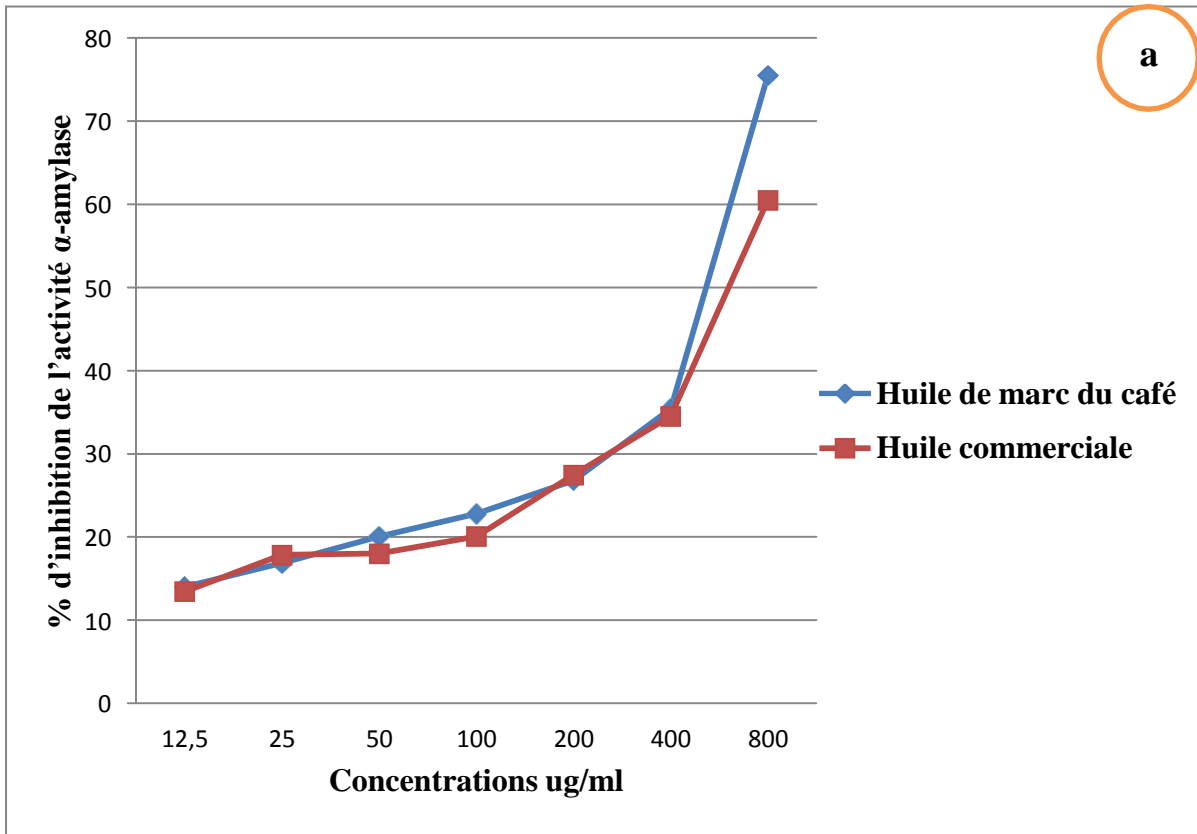
Des études ont montré que la caféine est un inhibiteur non compétitif de l'acétylcholinestérase mais pas du BchE (Oboh et *al.*, 2017). Des autres études ont également montré que la consommation chronique de caféine à un niveau modéré pourrait offrir un effet protecteur contre l'apparition de maladies neurodégénérative telles que La maladie d'Alzheimer (Mitchell et *al.*, 2014).

3.2.

L

'activité anti diabétique (L'activité inhibitrice de l' α -amylase)

La figure 41 montre que les deux huiles présentent une activité inhibitrice décelable vis –à–vis l'enzyme responsable de la maladie du diabète, à savoir **l' α -amylase** comparativement au standard. L'huile du marc de café et celle commerciale possèdent une activité inhibitrice vis- à-vis l'alpha-amylase avec des IC50 égaux à 356.32 et 360.45 μ g/ml, respectivement comparativement au standard dont l'IC50 est très élevé, soit 3650.



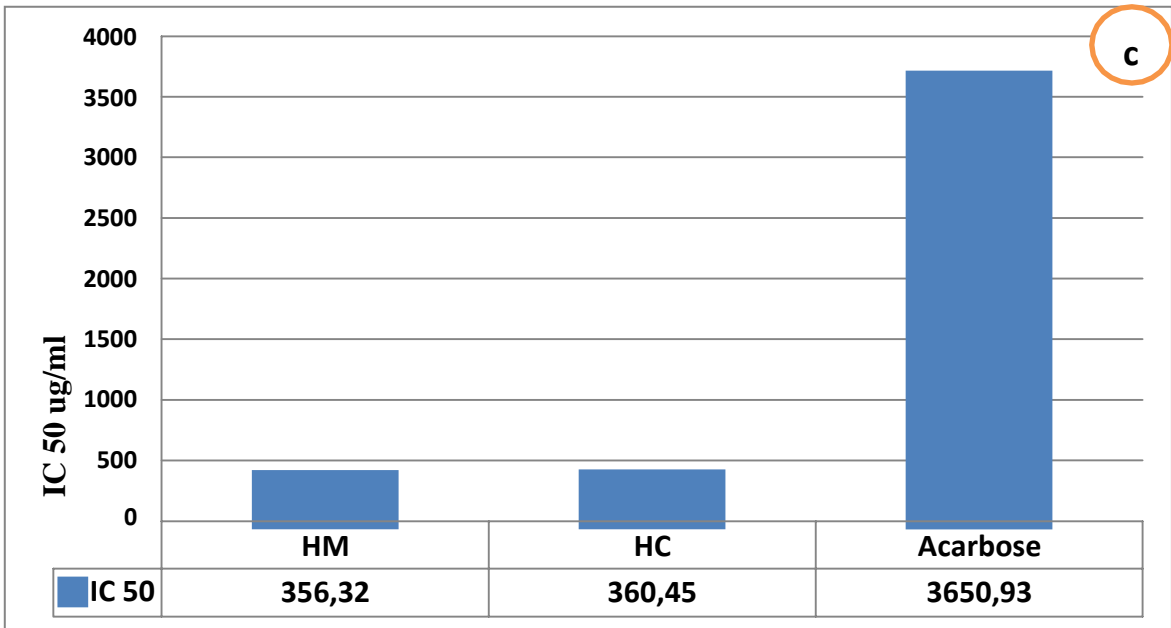


Figure 41: L'activité de l' α -amylase des échantillons et du standard (a : pourcentage d'inhibition des huiles ; b : pourcentage d'inhibition du standard, c ; Valeurs d'IC50 des huiles du standard)

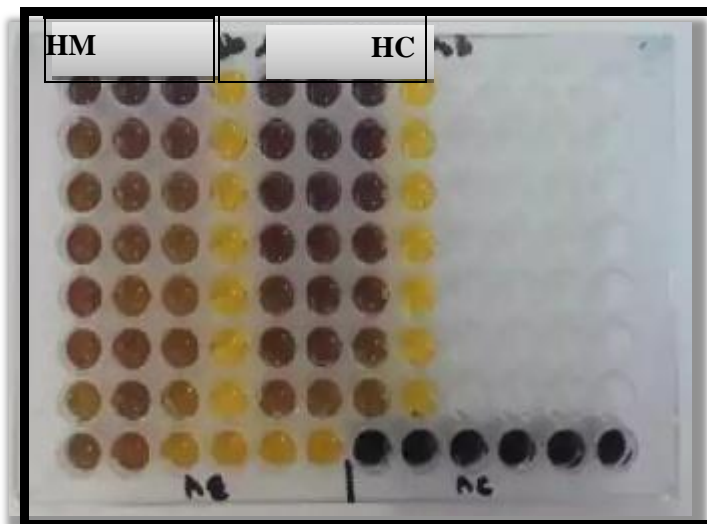


Figure 42: Plaquette des résultats de l'activité d' α -amylase pour les huiles testées.

L'activité prometteuse des huiles vis-à-vis l'enzyme l' α -amylase pourrait être attribuée à la présence de divers produits naturels inhibant les récepteurs de ce dernière. A titre d'exemple, les effets inhibiteurs des polyphénols sur l'activité de l'enzyme ' α -amylase ont montré une relation structure-activité, beaucoup de structures moléculaires influençant l'inhibition telles que : L'hydroxylation des flavonoïdes améliore l'effet inhibiteur sur l'a-amylase ; la présence

d'une liaison 2,3 insaturée en conjonction avec un groupe 4-carbonyl a été associée à une inhibition plus forte et enfin la glycosylation des flavonoïdes ayant diminué l'effet inhibiteur sur l'a-amylase en fonction du site de conjugaison et de la classe de la fraction sucre (Jianbo *et al.*, 2013).

4. Evaluation du potentiel microbien des échantillons (L'activité antifongique)

La technique utilisée dans notre étude consiste à tester la sensibilité de l'agent phytopathogène sur le milieu solide qui contient les huiles étudiées dans une boîte à Pétri.

Les résultats de la mesure du diamètre (en centimètre) de la croissance mycélienne du champignon sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 07: Evaluation de l'activité antifongique de l'HG, l'HC et le témoin positif et négatif en fonction de la concentration des extraits		
<i>Concentrations</i>		<i>Diamètre en cm</i>
Huile grasse (HG)	50	6
HG	100	6
HG	200	6
Huile commerciale	50	6
HC	100	6
HC	200	6
Témoin +	00	6
Témoin -	00	6

Le Taux d'inhibition de la croissance du champignon dans toutes les boites pour les deux huiles est égal à 0%, pour cela, aucune activité antifongique n'est notée pour les deux huiles. En fait, un ralentissement de la croissance du mycélium a été enregistré comparativement au témoin positif (Figure 40).

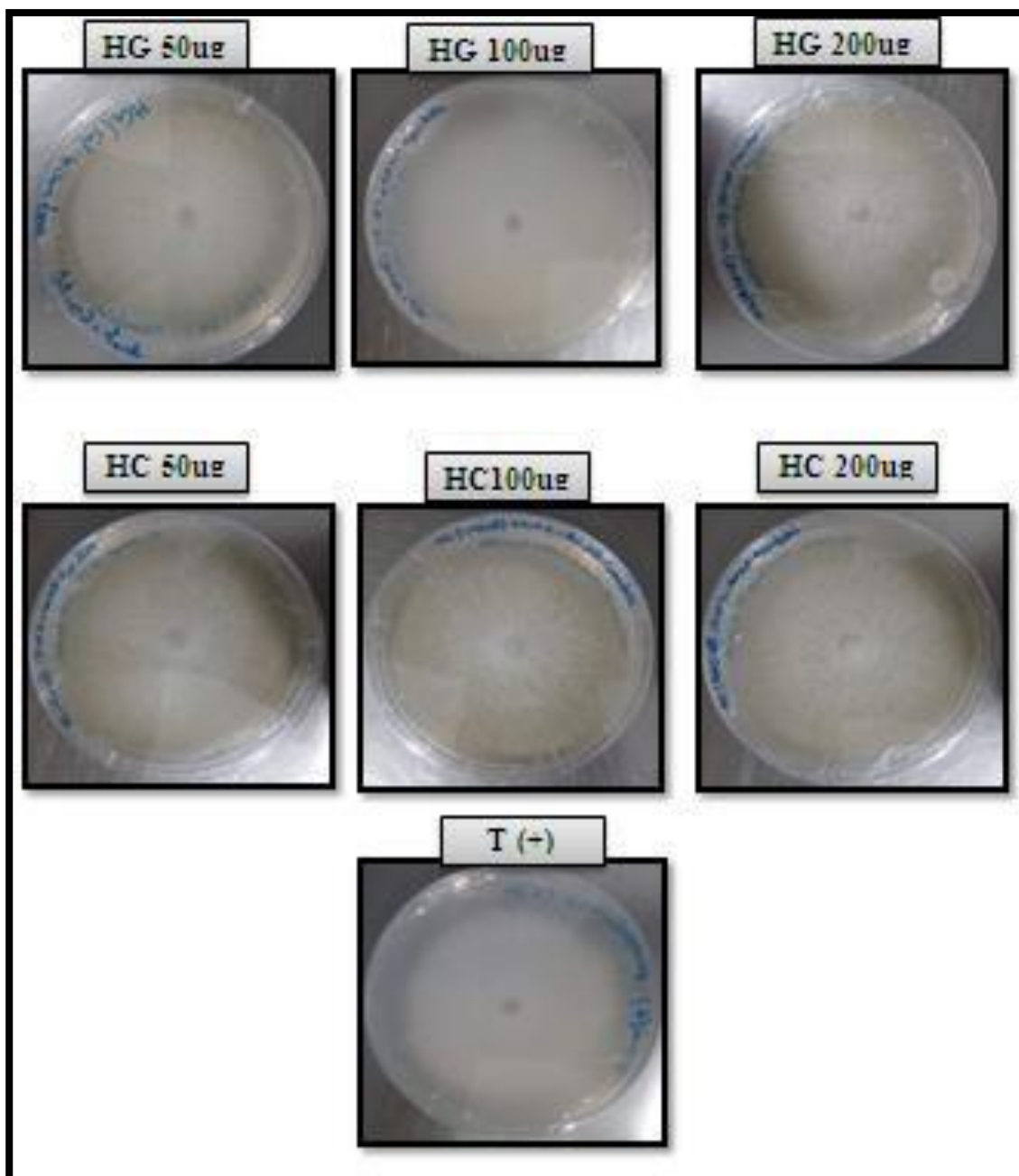


Figure 43: Résultats de l'activité antifongique des huiles testées.

Conclusion Générale

Conclusion Générale :

Dans le cadre de valorisation des résidus des ressources végétales naturelles générés par le secteur agro-alimentaire, nous avons sélectionné le marc du café, ce royal résidu qui s'appelle « **or noir** » ou « **or brun** » majoritairement rejeté à l'état dans l'environnement en dépit de ses faveurs et fameuses utilisations en industrie, en pharmacie, en agriculture et en cosmétique. Sous cette optique, nous avons étudié l'huile grasse extraite à partir de résidu en comparaison avec une huile végétale non raffinée utilisée comme un complément alimentaire dans l'alimentation des volailles pour des fins de comparaison et valorisation, le cas échéant.

En premier lieu, une caractérisation chimique du marc de café collecté est faite en déterminant son contenu en matière sèche, matière minérale et matière grasse. D'autres analyses chimiques sont prévues, tels que le taux des sucres, des protéines et des fibres, mais elles n'ont pas été accomplies à cause de la pandémie du coronavirus et les conditions de confinement imposées. En deuxième lieu, l'huile grasse extraite à partir du marc de café via le soxhlet est valorisée, en comparaison avec l'huile commerciale, en déterminant son potentiel antioxydant, enzymatique et microbiologique.

La caractérisation chimique du marc révèle sa pauvreté en minéraux et, en contrepartie, sa richesse en matière grasse ce qui le fait une bonne source de produits hydrophobes tel que les lipides.

Le procédé d'extraction choisis dans notre étude montre une rentabilité appréciable estimée à 15%. L'évaluation de l'activité antioxydante des huiles a été réalisée par différentes méthodes, à savoir, le piégeage du radical libre DPPH+, le piégeage du radical-cation ABTS+, le test de réduction du cuivre (CUPRAC) et le test de réduction de fer (FRAP) révèlent des activités tantôt absentes tantôt très faibles comparativement aux standards.

Dans le même ordre, le potentiel enzymatique des huiles est fait à travers l'étude de leur activité anti Alzheimer et antidiabétique en impliquant les enzymes responsables de lesdites maladies. Une très faible activité vis-à-vis le cholinestérase et le butyryléstérase est enregistrée, en contrepartie, une activité appréciable est notée contre l' α amylase. De plus, l'étude de l'activité antifongique révèle que nos huiles ne présentent aucune activité inhibitrice décelable vis à vis le microorganisme phytopathogène testé.

Il paraît clairement que les deux huiles se comportent de la même manière à travers la majorité des analyses étudiées. Cependant, l'inclusion de l'huile grasse extraite à partir du marc de café dans l'alimentation des volailles nécessite d'autres tests *in vitro* et *in vivo*.

L'activité anti-inflammatoire des huiles est également prévue mais, malencontreusement n'a pas été accomplie à cause des mêmes circonstances citées en ci-dessus. La caractérisation physico-chimique de l'huile en appuyant sur l'outil de la chromatographie en phase gazeuse couplée avec la masse est une étape incontournable que nous souhaiterions accomplir dans les plus brefs délais dès que les conditions le permettent.

D'autres voies de valorisation de cette huile sont fortement préconisées en absence de travaux traitant cette optique. D'autres essais d'extraction de l'huile grasse sont recommandés en utilisant d'autres méthodes afin de cibler celle la plus efficiente pour l'extraction de l'huile la plus actif chimiquement et biologiquement.

Références

Bibliographie

Références et Bibliographie :

- ❖ **Adi, A. J., & Noor, Z. M. (2009).** Waste recycling: Utilization of coffee grounds and kitchen waste in vermicomposting. *Bioresource Technology*, 100(2), 1027-1030.
- ❖ **Ahangari, B., & Sargolzaei, J. (2013).** Extraction of lipids from spent coffee grounds using organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(5), 1014-1021.
- ❖ **Ahmad, J., & Langrish, T. A. G. (2012).** Optimisation of total phenolic acids extraction from mandarin peels using microwave energy: The importance of the Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 162-174.
- ❖ **Al-Hamamre, Z., Foerster, S., Hartmann, F., Kröger, M., & Kaltschmitt, M. (2012).** Oil extracted from spent coffee grounds as a renewable source for fatty acid methyl ester manufacturing. *Fuel*, 96, 70-76.
- ❖ **Anand, P., Singh, B., & Singh, N. (2012).** A review on coumarins as acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(3), 1175-1180.
- ❖ **AOAC, 1990:** Official Methods of Analysis. 15th Edn. (Association of Official Analytical Chemists, INC, Va. USA).
- ❖ **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004).** Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.
- ❖ **Arpino, P., Prévôt, A., Serpinet, J., Tranchant, J., Vergnol, A., & Witier, P. (1995).**
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. *Ed. Masson, Paris*.
- ❖ **Arulrajah, A., Maghoolpilehrood, F., Disfani, M. M., & Horpibulsuk, S. (2014).** Spent coffee grounds as a non-structural embankment fill material: engineering and environmental considerations. *Journal of cleaner production*, 72, 181-186.
- ❖ **Atoui, A. K., Mansouri, A., Boskou, G., & Kefalas, P. (2005).** Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. *Food chemistry*, 89(1), 27-36.
- ❖ **Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2014).** Chemical, functional, and structural properties of spent coffee grounds and coffee silverskin. *Food and bioprocess technology*, 7(12), 3493-3503.

❖ **Benamar, M. (2016).** *Valorisation de residus agricoles par la culture de deux souches de champignons comestibles du genre pleurotus* (Doctoral dissertation).

❖ **Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

❖ **Bravo, J., Juaniz, I., Monente, C., Caemmerer, B., Kroh, L. W., De Peña, M. P., & Cid, C. (2012).** Evaluation of spent coffee obtained from the most common coffeemakers as a source of hydrophilic bioactive compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(51), 12565-12573.

❖ **Campa, C., Doubeau, S., Dussert, S., Hamon, S., & Noiro, M. (2005).** Qualitative relationship between caffeine and chlorogenic acid contents among wild Coffea species. *Food chemistry*, 93(1), 135-139.

❖ **Campos-Vega, R., Loarca-Pina, G., Vergara-Castaneda, H. A., & Oomah, B. D. (2015).** Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), 24-36.

❖ **Cañabate-Díaz, B., Carretero, A. S., Fernández-Gutiérrez, A., Vega, A. B., Frenich,**

A. G., Vidal, J. M., & Martos, J. D. (2007). Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food chemistry*, 102(3), 593-598.

❖ **Chang, S. T., Wang, D. S. Y., Wu, C. L., Shiah, S. G., Kuo, Y. H., & Chang, C. J. (2000).** Cytotoxicity of extractives from *Taiwaniacryptomerioides* heartwood. *Phytochemistry*, 55(3), 227-232.

❖ **Chen, K. I., Lo, Y. C., Liu, C. W., Yu, R. C., Chou, C. C., & Cheng, K. C. (2013).** Enrichment of two isoflavone aglycones in black soymilk by using spent coffee grounds as an immobiliser for β -glucosidase. *Food chemistry*, 139(1-4), 79-85.

❖ **Cruz, M. V., Paiva, A., Lisboa, P., Freitas, F., Alves, V. D., Simões, P., & Reis, M. A. (2014).** Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology. *Bioresource technology*, 157, 360-363.

❖ **Cruz, R., Cardoso, M. M., Fernandes, L., Oliveira, M., Mendes, E., Baptista, P.,**

...& Casal, S. (2012). Espresso coffee residues: a valuable source of unextracted compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(32), 7777-7784.

❖ **Cruz, R., Mendes, E., Torrinha, Á., Morais, S., Pereira, J. A., Baptista, P.,**

&Casal, S. (2015).Revalorization of spent coffee residues by a direct agronomic approach. *Food Research International*, 73, 190-196.

❖ **De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998).** Soxhlet extraction of solid materials:an outdated technique with a promising innovative future. *Analyticachimica acta*, 369(1- 2), 1-10.

❖ **De Castro, M. L., & Garcia-Ayuso, L. E. (1998).** Soxhlet extraction of solid materials:an outdated technique with a promising innovative future. *Analyticachimica acta*, 369(1- 2), 1-10.

❖ **Fellah, S., Romdhane, M., & Abderraba, M. (2006).** Extraction et étude des huiles essentielles de la *Salvia officinalis*. l cueillie dans deux régions différentes de la Tunisie. *Journal-SocieteAlgerienne De Chimie*, 16(2), 193.

❖ **Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961).** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

❖ **Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2016).** Coffee and its by-products as sources of bioactive compounds. *Coffee: Production, Consumption and Health Benefits*. New York, USA: Nova Science Publishers, 1-28.

❖ **Genthon, L. (2015).** Etude et identification des composés cytotoxiques issus d'un champignon de la forêt boréale québécoise (Doctoral dissertation).

❖ **Gómez-de la Cruz, F. J., Cruz-Peragón, F., Casanova-Pelaez, P. J., & Palomar-Carnicero, J. M. (2015).**A vital stage in the large-scale production of biofuels from spent coffee grounds: The drying kinetics. *Fuel processingtechnology*, 130, 188-196.

❖ **Haddoudi, M., Mellouk, H., Bejjany, B., Dani, A., & Digua, K. (2014).**Valorisation du marc du café: extraction de l'huile et évaluation de son activité antioxydante. *Les technologies de laboratoire*, 8(36).

❖ **Haidara, S. (1996).** Ibrahima Baba Kaké: l'Histoire à bras-le-corps. *PRÉSENCE AFRICAINE*, 248-251.

❖ **Hubert, J. (2006).** *Caractérisation biochimique et propriétés biologiques des micronutriments du germe de soja: étude des voies de sa valorisation en nutrition et santé humaines* (Doctoral dissertation).

❖ **Inoue, T., Tsubaki, S., Ogawa, B., Onishi, K et Azuma, J.I. (2010).**Isolation of hesperidin from peels of thinned Citrus unshiu fruits by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*. 123, 542-547.

- ❖ **Iriondo-DeHond, A., Garcia, N. A., Fernandez-Gomez, B., Guisantes-Batan, E., Escobar, F. V., Blanch, G. P., ... & del Castillo, M. D. (2019).** Validation of coffee by-products as novel food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *51*, 194-204.
- ❖ **Janissen, B., & Huynh, T. (2018).** Chemical composition and value-adding applications of coffee industry by-products: A review. *Resources, Conservation and Recycling*, *128*, 110-117.
- ❖ **Jianbo, N., Musselman, L. P., Pendse, J., Baranski, T. J., Bodmer, R., Ocorr, K., & Cagan, R. (2013).** A Drosophila model of high sugar diet-induced cardiomyopathy. *PLoS Genet*, *9*(1), e1003175.
- ❖ **Jiménez-Zamora, A., Pastoriza, S., & Rufián-Henares, J. A. (2015).** Revalorization of coffee by-products. Prebiotic, antimicrobial and antioxidant properties. *LWT-Food Science and Technology*, *61*(1), 12-18.
- ❖ **kamgang Nzekoue, F., Khamitova, G., Angeloni, S., Sempere, A. N., Tao, J., Maggi, F., ... & Caprioli, G. (2020).** Spent coffee grounds: A potential commercial source of phytosterols. *Food Chemistry*, 126836.
- ❖ **Kim, B., Park, J., & Lee, J. W. (2016).** In-situ transesterification of wet spent coffee grounds for sustainable biodiesel production. *Bioresource Technology*, *221*, 55-60.
- ❖ **Kondamudi, N., Mohapatra, S. K., & Misra, M. (2008).** Spent coffee grounds as a versatile source of green energy. *Journal of agricultural and food chemistry*, *56*(24), 11757-11760.
- ❖ **Kratchanova, M., Pavlova, E., & Panchev, I. (2004).** The effect of microwave heating of fresh orange peels on the fruit tissue and quality of extracted pectin. *Carbohydrate polymers*, *56*(2), 181-185.
- ❖ **Kreicbergs, V., Dimins, F., Mikelson, V., & Cinkmanis, I. (2011).** Biologically active compounds in roasted coffee. *Food Balt Proceedings of the 6th*, 110-115.
- ❖ **Kuan, C. Y., Yuen, K. H., Bhat, R., & Liong, M. T. (2011).** Physicochemical characterization of alkali treated fractions from corncob and wheat straw and the production of nanofibres. *Food research international*, *44*(9), 2822-2829.
- ❖ **Leifa, F., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2001).** Production of Flammulina velutipes on coffee husk and coffee spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *44*(2), 205-212.
- ❖ **Lien, E. J., Ren, S., Bui, H. H., & Wang, R. (1999).** Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, *26*(3- 4), 285-294.

- ❖ **Limousy, L., Jeguirim, M., Dutournié, P., Kraiem, N., Lajili, M., & Said, R. (2013).** Gaseous products and particulate matter emissions of biomass residential boiler fired with spent coffee grounds pellets. *Fuel*, *107*, 323-329.
- ❖ **Lion, P. H. (1961).** Travaux pratiques de chimie organique.
- ❖ **Low, J. H., Rahman, W. A. W. A., & Jamaluddin, J. (2015).** Structural elucidation of tannins of spent coffee grounds by CP-MAS ¹³C NMR and MALDI-TOFMS. *Industrial Crops and Products*, *69*, 456-461.
- ❖ **Malara, A., Paone, E., Frontera, P., Bonaccorsi, L., Panzera, G., & Mauriello, F. (2018).** Sustainable exploitation of coffee silverskin in water remediation. *Sustainability*, *10*(10), 3547.
- ❖ **Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007).** Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy reviews*, *1*(1), 7-18.
- ❖ **Mitchell, D. C., Knight, C. A., Hockenberry, J., Teplansky, R., & Hartman, T. J. (2014).** Beverage caffeine intakes in the US. *Food and Chemical Toxicology*, *63*, 136-142.
- ❖ **Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. sci. technol*, *26*(2), 211-219.
- ❖ **Motiéjunaité, M.E., & Peiculyté, F. (2004).** Flavour and Fragrance Journal An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices. 2004, *19*, 134-138.
- ❖ **Mussatto, S. I., Carneiro, L. M., Silva, J. P., Roberto, I. C., & Teixeira, J. A. (2011).** A study on chemical constituents and sugars extraction from spent coffee grounds. *Carbohydrate polymers*, *83*(2), 368-374.
- ❖ **Mussatto, S. I., Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A. (2011a).** Production, composition, and application of coffee and its industrial residues. *Food and Bioprocess Technology*, *4*(5), 661.
- ❖ **Oboh, G., Ogunsuyi, O. B., & Olonisola, O. E. (2017).** Does caffeine influence the anticholinesterase and antioxidant properties of donepezil? Evidence from in vitro and in vivo studies. *Metabolic brain disease*, *32*(2), 629-639.
- ❖ **O'brien, R. D. (2008).** *Fats and oils: formulating and processing for applications*. CRCpress.
- ❖ **Orhan, I. E., Senol, F. S., Gulpinar, A. R., Sekeroglu, N., Kartal, M., & Sener, B. (2012).** Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of Pistacia terebinthus L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chemistry*,

130(4), 882-888.

- ❖ **Oyaizu, M. (1986).** Studies on products of browning reaction. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.
- ❖ **Petrik, S., Obruča, S., Benešová, P., & Márová, I. (2014).** Bioconversion of spent coffee grounds into carotenoids and other valuable metabolites by selected red yeast strains. *Biochemical engineering journal*, 90, 307-315.
- ❖ **Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005).** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- ❖ **Ramalakshmi, K., Rao, L. J. M., Takano-Ishikawa, Y., & Goto, M. (2009).** Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different in vitro model systems. *Food Chemistry*, 115(1), 79-85.
- ❖ **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999).** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- ❖ **Robsomani drasana, A. (2014).** Etude de la composition en acide gras de plusieurs savons dit d'alep (Doctoral dissertation).
- ❖ **Sampaio, A., Dragone, G., Vilanova, M., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013).** Production, chemical characterization, and sensory profile of a novel spirit elaborated from spent coffee ground. *LWT-Food Science and Technology*, 54(2), 557-563.
- ❖ **Sekeroglu, N., Senol, F. S., Orhan, I. E., Gulpinar, A. R., Kartal, M., & Sener, B. (2012).** In vitro prospective effects of various traditional herbal coffees consumed in Anatolia linked to neurodegeneration. *Food research international*, 45(1), 197-203.
- ❖ **Severini, C., Caporizzi, R., Fiore, A. G., Ricci, I., Onur, O. M., & Derossi, A. (2020).** Reuse of spent espresso coffee as sustainable source of fibre and antioxidants. A map on functional, microstructure and sensory effects of novel enriched muffins. *LWT*, 119, 108877.
- ❖ **Shen, K., & Gondal, M. A. (2017).** Removal of hazardous Rhodamine dye from water by adsorption onto exhausted coffee ground. *Journal of Saudi Chemical Society*, 21, S120- S127.
- ❖ **Silva, M. A., Nebra, S. A., Silva, M. M., & Sanchez, C. G. (1998).** The use of biomass residues in the Brazilian soluble coffee industry. *Biomass and Bioenergy*, 14(5-6), 457- 467.
- ❖ **Simões, J., Madureira, P., Nunes, F. M., do Rosário Domingues, M., Vilanova, M., & Coimbra, M. A. (2009).** Immunostimulatory properties of coffee mannans. *Molecular*

nutrition & food research, 53(8), 1036-1043.

❖ **Sovová, H., & Stateva, R. P. (2011).** Supercritical fluid extraction from vegetable materials. *Reviews in Chemical Engineering*, 27(3-4), 79-156.

❖ UICPA : 1979. Méthodes d'analyses des matières grasses et dérivés (6è éd., 190p).Lavoisier, Paris (France) : Tec et Doc.

❖ **Vardon, D. R., Moser, B. R., Zheng, W., Witkin, K., Evangelista, R. L., Strathmann,**

T. J., ... & Sharma, B. K. (2013). Complete utilization of spent coffee grounds to produce biodiesel, bio-oil, and biochar. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 1(10), 1286- 1294.

❖ **Wang, L., & Weller, C. L. (2006).** Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.

❖ **Wolff, J. P. (1968).** Manuel d'analyses des corps gras; Azoulay éd. *Paris (France) p, 519.*

❖ **Yeoh, S., Shi, J. T. A. G., & Langrish, T. A. G. (2008).** Comparisons between different techniques for water-based extraction of pectin from orange peels. *Desalination*, 218(1-3), 229-237.

❖ **Zengin, G., Sarikurkcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014a).** A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtilifolium* Boiss. Endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.

❖ **Zengin, G., Sinan, K. I., Mahomoodally, M. F., Angeloni, S., Mustafa, A. M., Vittori, S., & Caprioli, G. (2020).** Chemical Composition, Antioxidant and Enzyme Inhibitory Properties of Different Extracts Obtained from Spent Coffee Ground and Coffee Silverskin. *Foods*, 9(6), 713.

❖ www.le_grande_restaurant.com.

Annexes

ANNEXE 01 : ACIDES AMINÉS PRÉSENTS DANS LE MARC DE CAFÉ

(Véga et al,2015)

Acides aminés	Min (%)	Max(%)	Pulpe de café(%)	Tourteau de soya(%)
Alanine	4,8	5,4	3,5	2,3
Arginine	0,1	0,2	2,8	4,0
Acide aspartique	0,2	1,9	7,1	6,3
Cystine	s.d.	5,1	0,3	0,8
Acide glutamique	11,5	13,8	7,7	9,8
Glycine	2,4	7,9	4,2	2,3
Histidine	0,1	5,3	2,5	1,4
Isoleucine	5,1	5,3	3,3	2,3
Leucine	10,6	10,9	4,7	4,2
Lysine	1,9	2,3	3,4	3,3
Méthionine	1,0	1,9	0,3	0,8
Phénylalanine	0,5	6,7	3,0	2,6
Proline	3,1	4,7	3,7	3,0
Serine	0,9	1,2	3,3	3,1
Thréonine	0,3	2,2	3,1	1,7
Tyrosine	2,9	4,0	1,9	1,8
Valine	6,0	6,8	3,7	2,4
BCAA	21,7	23,0	11,7	8,9

ANNEXE 02 : PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE PDA (POTATO, DEXTROSE, AGAR).

La préparation du milieu de culture PDA (POTATO, DEXTROSE, AGAR) se fait en suivant plusieurs étapes :

✓ Préparez le trempage des pommes de terre en faisant bouillir 160 g de tranches de pommes de terre dans l'eau (les pommes de terre sont pelées et lavées, puis coupées en tranches) pendant 30 minutes à 1h.

✓ Puis en laissant décant le bouillon obtenu ou en le filtrant à travers un coton. On dilue ensuite en ajoutant de l'eau distillée pour un volume final d'un 800ml.

✓ On ajoute 16 g de dextrose et autant d'agar-agar (16) en poudre avant une stérilisation par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

ANNEXE 03: Les dilutions des concentrations pour les deux huiles pour l'activitéantioxydante, anti Alzheimer et l'activité antidiabétique.

	1	2	3	4	5	6	7
Les étapes de la dilution.	500ul 8mg d'extrait + 1ml Methanol (Meth)	500ul 1mlMeth	500ul 1ml Meth	500ul 1mlMet h	500ul 1mlMet h	500ul 1mlMet h	1ml Meth
Concentrations	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64

ANNEXE 04 :

Extracts	% d'inhibition et l'IC ₅₀ des échantillons et du standard vis-à-vis le test							
	DPPH							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
Huile du MC	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
Huile commerciale	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A
BHA^b	76,55±0,48	79,89±0,26	81,73±0,10	84,18±0,10	87,13±0,17	89,36±0,19	90,14±0,00	6.14±0.41
BHT^b	49,09±0,76	72,63±2,06	88.73±0,89	94.00±0,31	94.97±0,08	95.38±0,41	95.02±0,23	12.99±0.41

Extracts	% d'inhibition et l'IC ₅₀ des échantillons et du standard vis-à-vis le test de l'ABTS							
	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ µg/mL
Huile du MC	22,86±0,18	25,11±0,21	26,93±0,28	28,93±0,11	32,63±0,11	40,02±0,11	47,18±0,11	1336.79±13.24
Huile commerciale	23,35±0,11	22,56±0,11	22,01±0,11	20,56±0,28	19,10±0,46	16,56±0,11	2,18±0,11	-4248.72±41.30
BHT	69.21±0,40	78.23±1,34	88.12±1,28	88,76±3,07	90.85±1,74	90.95±0,51	96.68±0.39	1.29±0.30
BHA	92.83±1,42	94.68±0,42	94.95±0,90	95.32±0,25	95.59±0,47	95.83±0,15	95,86±0,10	1.81±0.10

Cfc<Extracts	% d'inhibition et l'A _{0,5} des échantillons et du standard vis-à-vis le test CUPRAC							
	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	1600 µg	A _{0.50} (µg/mL)
Chloroform extract	0,09±0,00	0,13±0,00	0,17±0,00	0,25±0,01	0,38±0,01	0,45±0,02	0,52±0,01	1540.00±13.23
Ethyl acetate extract	0,08±0,01	0,12±0,01	0,17±0,00	0,30±0,01	0,48±0,00	0,62±0,01	0,78±0,03	363.33±54.91
BHA^b	1,12±0,05	1,95±0,31	3,14±0,46	3,58±0,42	3,35±0,20	3,77±0,19	3,92±0,13	5,35±0,71
BHT^b	1.41±0.03	2.22±0.05	2.42±0.02	2.50±0.01	2.56±0.05	2.86±0.07	3.38±0.13	8.97±3.94

Extracts	% d'inhibition et l'A _{0,5} des échantillons et du standard vis-à-vis le test							
	FRAP							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	A _{0,5} µg/mL
Huile du MC	0,50±0,01	0,56±0,01	0,61±0,01	0,62±0,02	0,54±0,02	0,64±0,03	0,89±0,01	4.90
Huile commerciale	0,51±0,01	0,46±0,02	0,44±0,00	0,52±0,06	0,55±0,04	0,68±0,06	0,95±0,03	6.91
Ascorbic acid	0,35±0,05	0,46±0,03	0,84±0,12	0,93±0,30	1,18±0,34	1,37±0,20	1,44±0,21	6.77±1.15
α-Tocopherol	0,11±0,00	0,16±0,00	0,21±0,03	0,35±0,03	0,73±0,03	1,37±0,08	1,81±0,09	34.93±2.38

Extracts	Acetylcholinesterase inhibitory activity							
	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	IC ₅₀ µg/mL
Huile du MC	- 110,94±0,68	-78,24±0,79	-80,51±1,94	-34,87±0,99	9,33±1,59	27,57 ±0,23	46,41±1,59	423,12 ± 16,48
Huile commerciale	-81,49±1,02	-71,05±1,90	-57,20±13,83	-34,12±0,47	10,61±1,89	48,99 ±0,52	62,61±2,66	293,44 ±8,25
Galantamine^b	35,93 ±2,28	43,77 ±0,00	68,50 ±0,31	80,69 ±0,41	85,78 ±1,63	91,80 ±0,20	94,77 ±0,34	6.27±1.15

Extracts	Butyrylcholinestérase inhibitory activity							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	IC ₅₀ µg/mL
Huile du MC	9,45 ± 3,47	3,75 ± 1,51	3,15 ± 1,39	7,05 ± 1,14	7,65 ± 2,33	19,66 ± 0,96	52,98 ± 1,14	385.62± 4.05
Huile commerciale	3,65 ± 2,89	-4,95 ± 1,93	4,85 ± 1,31	16,0 6± 1,81	25,26 ± 3,16	67,78 ± 2,33	77,89 ± 2,44	189.75±4.25
Galantamine^b	3,26± 0,62	6,93± 0,62	24,03± 2,94	45,13± 2,60	63,87± 2,85	73,57± 0,77	78,95± 0,58	34.75±1.99

% d'inhibition et l'IC ₅₀ des échantillons et du standard vis-à-vis l'enzyme α- amylase								
Extraits	12.5ug	25ug	50 µg	100 µg	200 µg	400 µg	800 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
Huile du MC	14,02±0,33	16,86±0,49	20,06±0,8	22,77±0,32	26,79±0,75	35,40±0,99	75,47±1,12	257,89±5,16
Huile commerciale	13.45±0,38	17.86±0,3	18±0,51	20.06±0,64	27.47±0,36	34.32±0,1	60,47±0,95	257,89±6.54
	62.5ug	125ug	250 µg	500 µg	1000 µg	2000 µg	4000 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
Acarbose	7,76±0,17	8,08±0,30	9,46±0,11	10,70±0,96	31,81±2,89	37,21±3,54	53,05±1,59	3650,93±10,70

