

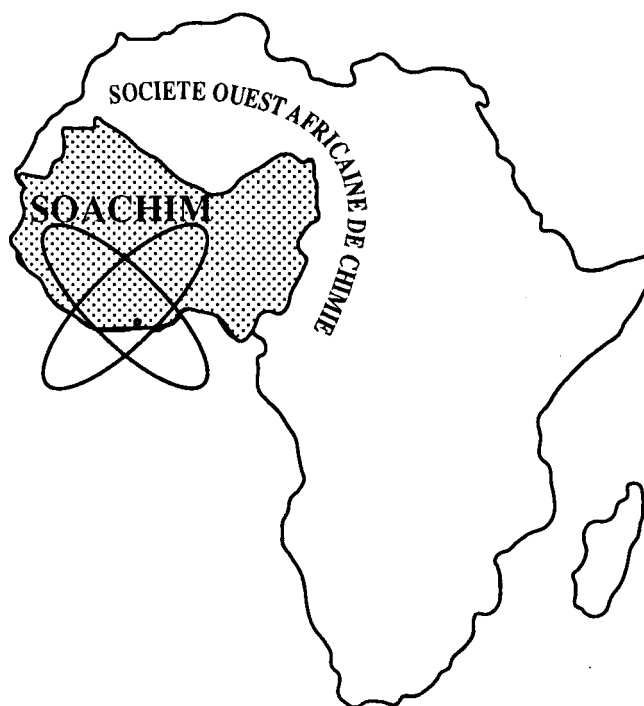
*Etude de la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L. par incorporation de différents extraits végétaux*

**Mady Cisse, Papa Guedel Faye, Nicolas Ayessou,
Codou Mar, Mama Sakho**

Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie

J. Soc. Ouest-Afr. Chim.(2017), 044 : 1 - 6

22^{ème} Année, Décembre 2017



ISSN 0796-6687

Code Chemical Abstracts : JSOCF2

Cote INIST (CNRS France) : <27680>

Site Web: <http://www.soachim.org>

Etude de la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L. par incorporation de différents extraits végétaux

Mady Cisse^{1*}, Papa Guedel Faye¹, Nicolas Ayessou¹, Codou Mar¹, Mama Sakho¹

¹Laboratoire d'Electrochimie et des Procédés Membranaires (LEPM), ESP-UCAD, Dakar
Centre d'Etudes sur la Sécurité alimentaire et les Molécules fonctionnelles (CESAM-RESCIF), ESP-UCAD, Dakar

(Reçu le 29/08/2017 – Accepté après corrections le 06/10/ 2017)

Résumé : Les essais de stabilité des anthocyanes sont réalisés entre 4 et 45 °C dans des lots de boissons d'*Hibiscus sabdariffa* L. contenant différents ratios de matrices végétales dont les tanins du moringa, la gomme arabique, l'acide tannique, et les bétalaïnes de la figue de barbarie (*Opuntia tuna*). L'analyse de la variance montre des différences significatives ($p < 0,05$) sur certains paramètres. Le stockage des lots de boisson à des températures inférieures à 20 °C augmente considérablement la durée de conservation. Entre 37 et 45 °C la dégradation des anthocyanes est accélérée par l'effet thermique. Par rapport au témoin, en 45 jours de stockage à 37 °C, le lot d'échantillons à 20 g.L⁻¹ de gomme arabique affiche une meilleure stabilité, suivi du lot à 100 g.L⁻¹ de jus de fruits de la figue de barbarie, et du lot à 0.2 g.L⁻¹ d'acide tannique. Les paramètres indirects de suivi des produits de dégradation que sont la conductivité et la turbidité sont inversement proportionnels à la température de stockage pour certains lots. Une analyse en composantes principale suivi d'une classification a permis de classer les différentes boissons en fonction de leur concentration résiduelle en anthocyanes.

Mots clés : *Hibiscus sabdariffa* L., anthocyane, gomme arabique, moringa, tanin, bétalaïne, stabilité

Study of the stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins by incorporation of different plant extracts

Abstract: Anthocyanin stability tests were carried out between 4 and 45 °C in batches of *Hibiscus sabdariffa* L. beverages containing different ratios of vegetable matrices, namely tannins of moringa, gum arabic, tanic acid and betalains of the prickly pear (*Opuntia tuna*). Analysis of variance showed significant differences ($p < 0.05$) on some of the parameters studied. The results of the monitoring showed that the storage of batches of beverage at temperatures below 20 °C greatly increased the duration of the conversation. Between 37 and 45 °C the degradation of anthocyanins is accelerated by the thermal effect. Compared to the control, in 45 days of storage at 37 °C, the batch of 20 g.L⁻¹ samples of gum arabic showed a better stability, followed by the batch at 100 g.L⁻¹ of fruit juice of the prickly pear and finally from the 0.2 g.L⁻¹ batch of tanic acid. The indirect parameters for monitoring degradation products, conductivity and turbidity, are inversely proportional to the storage temperature for certain batches. A principal component analysis followed by a classification allowed us to classify the different drinks according to their residual concentration in anthocyanins.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L., anthocyanin, gum arabic, moringa, tannin, betalain, stability

* Correspondance, courriel : mady.cisse@ucad.edu.sn

1. Introduction

Encore appelé Bissap au Sénégal, Karkadé en Afrique du Nord, l'*Hibiscus sabdariffa* L. appartient à la famille des malvacées au même titre que le coton ou le kombo. Une des caractéristiques des calices d'*Hibiscus sabdariffa* est leur richesse en anthocyanes et d'agents antioxydants ^[1]. Ces derniers dont les teneurs peuvent atteindre 1,5 g/100 g de matière sèche ^[2] leur confèrent une couleur rouge. Cependant les anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont connus pour leur instabilité ^[3-9]. Ainsi la couleur rouge obtenue à partir des calices devient très instable. Des tentatives de stabilisation des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* ont été réalisées par Esselen ^[10] dans différentes formulations de produits alimentaires (gelées, boissons, boissons carbonatées, poudres lyophilisées). Clydesdale et Francis ^[3] ont également étudié cette stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L dans les produits alimentaires secs conditionnés (une préparation de boisson et un dessert de gélatine), alors que Pouget, Lejeune et Pourrat ^[11] examinaient les effets de différents composés chimiques (acide ascorbique, gallate propylique, sulfite de sodium) sur la stabilité des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L. Par ailleurs, le phénomène de co-pigmentation est l'un des mécanismes les plus importants de stabilisation des couleurs naturelles exprimées par les anthocyanes ^[11, 10]. La co-pigmentation intensifie et stabilise la couleur dans les conditions de pH où l'anthocyane est quasiment incolore. Elle a été déjà rapportée comme pouvant affecter la coloration rouge dans le jus du raisin ^[12]. Dans le cas de la stabilisation de la couleur des vins rouges, d'autres alternatives sont exploitées telles que l'utilisation de la gomme arabique et des tanins.

C'est dans ce contexte, que nous avons utilisé plusieurs extraits végétaux tels que la gomme arabique, le moringa, les tanins et la bétalaïne, afin d'améliorer la stabilité des anthocyanes des extraits aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* L.

2. Partie expérimentale

2.1. Matériel

Les essais de stabilité des anthocyanes de boissons d'*Hibiscus sabdariffa* L. ont été réalisés en utilisant la variété horticoles dite «Vimto». Cette variété a été récoltée durant la campagne 2015-2016 en provenance de la région de Diourbel dans le village de Bambey. Il s'agit de calices, séchés et conditionnés dans des sacs de 50 kg en polyester. Les fruits de la figue de barbarie ont été cueillis à

Dakar au niveau de la corniche. Lavés et épluchés manuellement, les pulpes ont été tamisées deux fois afin de récupérer le jus riche en bétalaïne. Les feuilles de moringa conditionnées en sac de 25 kg après séchage, viennent de la région de Kaolack Sénégal. La gomme arabique récoltée en 2015, vient de la région de Kailash Mauritanie. L'acide tannique est fourni par PROLABO (réf : 132-0001) comme réactif de laboratoire en 2015.

2.2. Méthodes

2.2.1. Production des boissons

L'extrait aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* L. est obtenu suivant la procédure décrite par Cisse et al. (2012). Un extrait aqueux de calices d'*Hibiscus sabdariffa* est obtenu après quatre heures de macération dans un ratio calices/eau de 1/30 (kg.kg⁻¹). L'extrait final récupéré est doublement filtré puis divisé en cinq lots : un lot avec du tanin de moringa à raison de 4 mg.L⁻¹; un lot contenant du jus de figue de barbarie à raison de 100 g.L⁻¹, un lot incorporé avec de la poudre de gomme arabique à raison de 20 g.L⁻¹, un lot avec de l'acide tannique à raison de 0.2 g.L⁻¹ et un lot témoin. Les boissons à 15 °Brix sont préparées avec rajout de saccharose à froid sur chaque extrait, puis mélangés à froid jusqu'à dissolution complète au bout de 15 min.

2.2.2. Pasteurisation et stockage

Les boissons sont remplies dans des bouteilles ambrées propres, désinfectées à l'eau de javel diluée à 100 ppm pendant trente minutes égouttées et séchées à l'étuve. Après remplissage et capsulage à froid, la pasteurisation est effectuée en bain-marie à une valeur pasteurisatrice de 50 min (VP 50) suivant un barème de 75 °C pendant 30 min, le refroidissement est effectué sous jet d'eau de robinet à une température de 25 °C. Une bouteille témoin a été utilisée avec une sonde de température placée au centre géométrique pour suivre l'évolution de la température à cœur au cours de la pasteurisation. Les échantillons de boissons sont ensuite séparés et stockés à différentes températures (4, 15, 20, 37, et 45 °C). Les analyses sont effectuées toutes les deux semaines sur une période de trois mois afin de suivre les paramètres physico-chimiques. Les réactifs, les solvants organiques utilisés dans l'ensemble des travaux sont de pureté analytique. La pureté de l'eau distillée a été vérifiée en mesurant la conductivité. Afin d'éviter les contaminations des échantillons par des microorganismes, la verrerie utilisée (entonnoirs, béchers, pipettes, flacons, bouchons) a été stérilisée pendant 20 min à 120 °C.

2.2.3. Extraction des tanins du moringa

Les tanins sont obtenus selon le procédé de Seigler [13]. Une masse de 100 g de feuilles de moringa est plongée dans 100 ml d'éthanol et 100 ml d'eau distillée. L'ensemble est chauffé à ébullition durant une heure sous réfrigérant. Après refroidissement et filtration, le filtrat est centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 minutes. Le culot est récupéré et séché à l'étuve à 70 °C pendant 5 heures.

2.2.4. Dosage des anthocyanes

Le principe de dosage est basé sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH (méthode pH-différentiel) selon les prescriptions de Wrolstad [14]. Après dilution de l'extrait de calices dans deux solutions tampon à pH 1,0 et pH 4,5. L'absorbance est mesurée au spectrophotomètre UV (Specord 200) à 510 et à 700 nm.

2.2.5. Détermination de la couleur, la turbidité et la conductivité

L'indice de dégradation de la couleur est déterminé en utilisant le rapport des absorbances à 420 nm et à λ_{max} 520 nm suivant la méthodologie proposée par Cevallos et Cisneros-Zevallos [15]. C'est un indicateur de la stabilité de l'extrait pendant sa conservation dans des conditions déterminées. Les caractéristiques chromatiques sont déterminées par spectrophotométrie. La turbidité est déterminée à 20 °C par un turbidimètre (*HE9 série 61076, Germany*). La conductivité est mesurée par un conductimètre (*Hanna instruments, Roumanie*) à 20 °C.

2.2.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant l'ANOVA à un facteur avec le logiciel R version 3.2.4 Révisée (2016-03-16 r70336). Une analyse en composantes principales suivie d'une classification numérique sur les coordonnées des composantes de l'ACP a été réalisée. La valeur X de chaque échantillon est assignée d'une lettre en exposant ($X^{(i)}$ où $i = a, b, c, \dots$). Les échantillons portant la même lettre ne sont pas statistiquement

différents au seuil de 5 %. Le logiciel Minitab 17-2016 a été utilisé.

3. Résultats et discussion

3.1. Caractérisation des boissons

Les résultats d'analyse des différentes boissons à base de calices rouge d'*Hibiscus sabdariffa* sont consignés dans le **tableau I** ci-dessous. A l'exception de la conductivité, aucune différence significative n'est observée pour les autres caractéristiques pour toutes les boissons au premier jour avant le stockage à différentes températures.

3.2. Suivi de la stabilité des anthocyanes dans les lots de produits stockés à différentes températures

L'analyse des résultats montre une tendance homogène des pertes aux différentes températures de stockage. Il est noté une dégradation des anthocyanes qui est faible à basse température (4 °C, 15 °C et 20 °C), et très accentuée à des températures de 37 °C et 45 °C (*figure 1 et 2*).

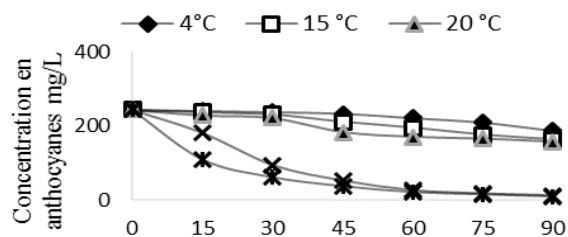


Figure 1. Evolution de la concentration en anthocyanes du lot témoin au cours du stockage pendant 90 jours

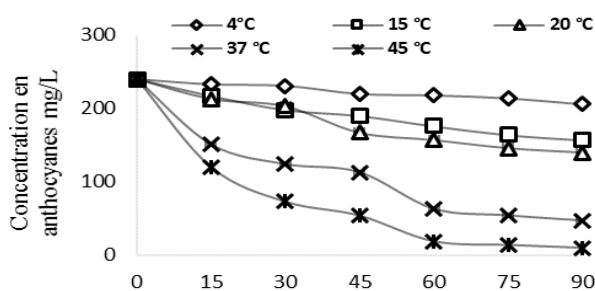


Figure 2. Evolution de la concentration en anthocyanes au cours du stockage de la boisson à 20 g.L⁻¹ gomme arabique pendant 90 jours

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des boissons utilisées

	Témoin	Gomme arabique 20g.L ⁻¹	Acide tannique 0.2 g.L ⁻¹	Moringa 4 m g.L ⁻¹	Cactus 100 g.L ⁻¹
pH à 25 °C	2,3 ^a	2,3 ^a	2,2 ^a	2,2 ^a	2,5 ^a
Brix à g/100 g	15,06 ^a	14,86 ^a	14,96 ^a	14,90 ^a	14,90 ^a
Saccharose (g/L)	156,5 (± 0.1)	156,0 (± 0.1)	155,3 (± 0.1)	156,5 (± 0.1)	156,0 (± 0.1)
Anthocyanes (mg/L)	243 ^a	240 ^a	237 ^a	240 ^a	239 ^a
Turbidité en NTU	0	0	0	0	0
Conductivité μ s/cm	3050 ^a	3120 ^d	3010 ^a	2910 ^b	3870 ^c
Densité à 20 °C	1,0606 ^a	1,0568 ^b	1,0575 ^b	1,0573 ^b	1,0573 ^b

Ces pertes confirment que les anthocyanes sont très instables et thermolabiles [16]. Les résultats montrent donc que les meilleures températures de stockage des boissons se situent entre 4 °C et 20 °C pour une durée courte de conservation. La **figure 3** montre la concentration en anthocyanes restante au 60^{ème} jour de conservation à différentes températures.

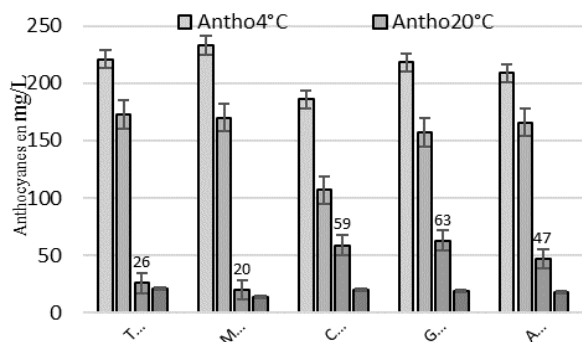


Figure 3. Evolution de la concentration en anthocyanes en fonction des températures au 60^{ème} jour de stockage

Les tentatives d'amélioration de la stabilisation dans les conditions d'essais à 37 °C ont donné de faibles améliorations avec l'utilisation de la gomme arabique, l'acide tannique, et les beta-laines par rapport au témoin (**figure 3**).

D'autres facteurs permettent d'optimiser la stabilité des anthocyanes dans les boissons. En effet, le sucre permet la réduction l'activité de l'eau, l'augmentation de l'effet hypertonique, l'inhibition des enzymes, ou la création des interférences stériques [14]. La co-pigmentation intermoléculaire entre les anthocyanes et les autres molécules flavonoïdes (catéchine, acides phénoliques) peut améliorer la stabilité des anthocyanes [6,8]. Le phénomène s'explique par une réduction de la production de pseudo base carbinol et une stabilisation de la base quinonoidale [17,18]. Cet effet de co-pigmentation a été recherché avec l'ajout de l'acide tannique dans les boissons. Un taux de pertes de 80 % est obtenu à 37 °C/60 j contre 89 % de perte pour la boisson témoin, soit une différence de 9 % qui confirme l'effet des tanins [19].

3.3. Suivi de la conductivité et la turbidité des différents lots de produits entre 4 °C et 45 °C.

La **figure 4** montre l'évolution des conductivités des boissons avec différents extraits végétaux à différentes températures de stockage. Une hausse générale de la conductivité est constatée sur l'ensemble des boissons (**figure 4**). La conductivité mesure la capacité de la boisson utilisée à transmettre le courant électrique.

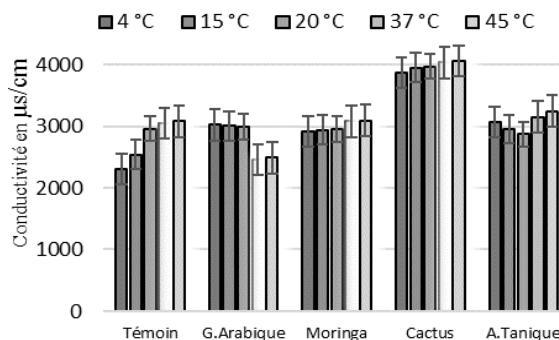


Figure 4. Conductivités des boissons au 60^{ème} jour de stockage à différentes températures

Elle traduit l'instabilité des anthocyanes par le biais du cation flavylum. L'analyse de la **figure 5** montre des turbidités élevées par rapport au premier jour (**Tableau I**), et certaines diminuent inversement à la température de stockage.

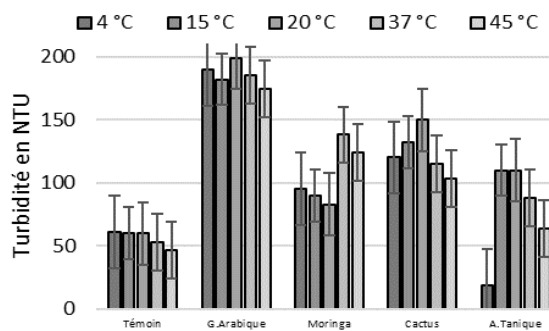


Figure 5. Turbidité des différentes bissons en fonction des températures de stockage au 60^{ème} jour.

La mesure de la turbidité permet d'évaluer la réactivité de la matière colorante et polyphénolique vis-à-vis des protéines et autres molécules dissoutes. C'est l'expression du trouble constaté dans les boissons. L'utilisation du jus de fruit de la figue de barbarie et de la gomme arabique dans les boissons lors des essais entraîne une augmentation de la turbidité au cours du stockage (**figure 5**). L'augmentation de ce trouble est variable et dépend de la matrice utilisée. Par ailleurs, l'intensité du trouble est inversement proportionnelle à la température de conservation des boissons témoins, et le lot rajouté de 4 mg.L⁻¹ de tanin de Moringa pour les températures 4, 15 et 20 °C (**figure 5**), confirmant les travaux de Moine [20] réalisés sur le vin rouge.

3.4. Evolution de l'intensité colorante au cours du stockage

Les résultats du suivi de l'intensité de la couleur rouge montrent des valeurs qui chutent dans le temps (**figure 6**).

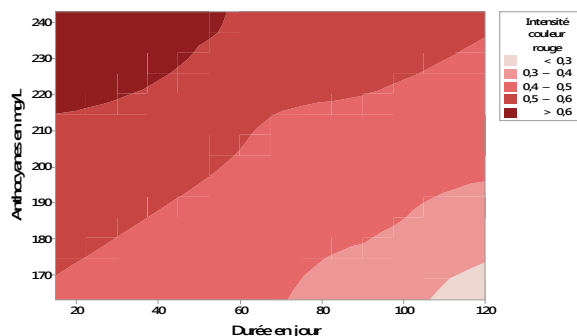


Figure 6. Dégradation de la couleur rouge de la boisson témoin au cours du stockage à 4 °C /120 jours (*logiciel Minitab*)

Les anthocyanes peuvent réagir avec des composés phénoliques qui donnent la formation complexe qui jouerait un rôle principal dans la chute de l'absorbance impliquant des changements de couleur. Par contre la co-pigmentation et la polymérisation ont aussi été rapportées comme pouvant affecter la coloration rouge du jus de raisin [12]. Cependant, d'autres réactions de condensation peuvent être à l'origine de la décoloration des anthocyanes. Certains acides aminés, catéchines, ou autres nucléophiles en se condensant en présence de sels de flavylium, génèrent des produits moins colorés lesquels sont réactifs et subissent des changements supplémentaires [7].

3.4. Analyse en composantes principales et classification numérique

Le graphique des valeurs propres (*figure 7*) suggère que les deux premiers axes expliquent au total 100 % de l'inertie. Le premier plan factoriel (Dim 1) renferme 56,69 % d'inertie et le deuxième (Dim 2) 23,93 % d'inertie.

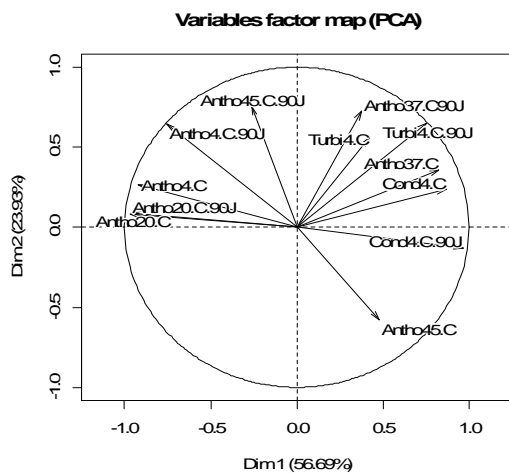


Figure 7. Corrélation entre les différentes concentrations en anthocyanes des boissons aux deux premières dimensions de l'ACP.

Les variables concentration anthocyanes 4 °C, 15 °C et 20 °C sont fortement et négativement corrélées à la première dimension, tandis que les variables concentration anthocyanes 37 °C, conductivité et turbidité (4 °C/ 60 jours) lui sont positivement corrélées. La dimension 2 est caractérisée par la variable anthocyanes 45 °C qui lui est corrélée positivement (*figure 7*). Les lots de boisson sont regroupés en cinq classes (*figure 8*).

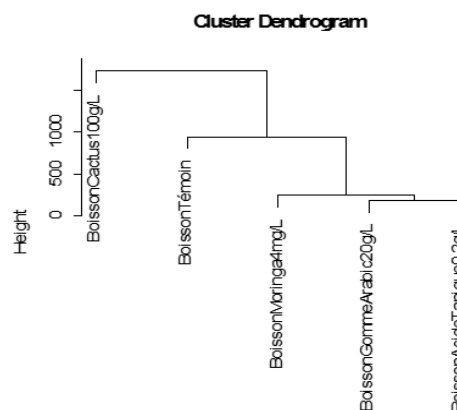


Figure 8. Classification des groupes de boisson en fonction de la concentration en anthocyanes, de la conductivité et de la turbidité au bout de 60 jours de conservation à 37 °C.

La classe 1 est caractérisée par la boisson témoin qui contribue à 48,95 % sur la dimension 2. La classe 2 est représentée par la boisson à 4 mg.L⁻¹ de tanin de moringa qui contribue à 22,19 % sur la dimension 1, et la boisson à 0,2 g.L⁻¹ d'acide tannique qui contribue à 1,3 % sur cette même dimension. La classe 3 est représentée par la boisson à 20 g.L⁻¹ de gomme arabique qui contribue à 36,93 % sur la dimension 2. La quatrième classe est représentée par la boisson à 100 g.L⁻¹ de jus de fruit de la figue de barbarie qui contribue à 62,39 % sur la dimension 1.

4. Conclusion

L'utilisation de la gomme arabique, de l'acide tannique et des bétalaïnes de la figue de barbarie concourent à diminuer le niveau d'instabilité des anthocyanes dans les boissons d'*Hibiscus sabdariffa* L. lors du stockage à 37 °C sur une durée de 45 jours. La projection des classes de boisson selon la concentration en anthocyanes sur le plan factoriel de l'ACP, et la classification numérique nous a permis de regrouper les différents lots de boissons en fonction de la concentration résiduelle en anthocyanes. Au regard de ces travaux, chacune de ces techniques de stabilisation peut faire l'objet d'une optimisation à 37 °C avec des ratios variables de matrices. La quantification des anthocyanes combinés par HPLC permettra de mieux apprécier

l'impact positif des tanins sur la stabilisation durable des anthocyanes dans les boissons à base d'extrait aqueux d'*hibiscus sabdariffa*.

Références

- [1] Ali B.H, Mousa H.M, and Mougy S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L on paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 17 (2003) 1, 56–59.
- [2] Cisse M, Dornier M, Sakho M, Ndiaye A, Reynes M, et Sock O. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations. *Fruits.* 64, (2009b) 3, 179–193.
- [3] Clydesdal F.M, Main J.H and Francis F.J. A dry powdered pigment extract was prepared from a Roselle liquid concentrate obtained from Trinidad. *Journal of Food Protection.* (1979b) 42, 204–207.
- [4] Wong P.K, Yusof S, Ghazali H.M, and Man Y.B.C. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.* (2002) 32, 68–73.
- [5] Markakis P, Brouillard R. *Anthocyanins as food colors.* Academic Press, Edition 1982 New York
- [6] Maccarone E, Maccarone A, and Rapisarda P. Acylated anthocyanins from oranges. *Annali Di Chemical.* (1985) 2, 79–86.
- [7] Hrazdina G. Reactions of the anthocyanidin-3, 5-diglucosides: formation of 3,5-di-(O-β-D-glucosyl)-hydroxyl-7-hydroxy coumarin. *Phytochemistry* (1971) 10, 25–30.
- [8] Francis J. Food colorants: Anthocyanins. *Critical reviews in Food Science and Nutrition.* (1989) 28, 273-274.
- [9] Chen H.H, Tsai P.J, Chen S.H, Chung CC, and Huang TC *Journal of Food Processing and Preservation.* (2005) 29, 228-245.
- [10] Esselen W.B, Sammy G.M. Roselle a natural red colorant for foods. *Food Prod. Dev.* (1973) 1, 80-86.
- [11] Pouget M.P, Vennat B, Lejeune B, and Pourrat A, Extraction analysis and study of the stability of *Hibiscus* anthocyanins. *Lebensm. u. Technol.* (1990) 23, 103–105.
- [12] Harbertson J.F, Kennedy J.A, and Adams D.O, *J. Enol. Vitic.* (2002) 1, 54-59.
- [13] Seigler D.S, Seilheimer S, Keesy J, and Huang H.F. Tannins from Four Common Acacia species of Texas and Northeastern Mexico *Economic Botany.* (1986) 2, 220-232.
- [14] Wrolstad R.E, Culbertson J.D, Cornwell C.J and, Mattick L.R, Detection of Adulteration in Blackberry Juice Concentrates and Wines. *J. Assoc off Anal. Chem.* (1982) 65, 1417-1423.
- [15] Cevallos B.A, Cisneros-Zevallos L, Stability of anthocyanin based aqueous extracts of Andean purple corn and red fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem.* (2004) 86, 69–77.
- [16] Skrede G, Wrolstad R.E and Durst R.W. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*L.). *J. Food Science.* (2000) 65, 357-364
- [17] Brouillard R. *Flavonoids and flower colour. The flavonoids.* Springer, Boston, MA. (1988) 525-538.
- [18] Brouillard R, Mazza G, Saad Z, Albrecht-Gary A.M. He, Fei, et al. Anthocyanins and their variation in red wines. *Chem. Sot.* (1989) 111-117
- [19] Miniati E, Damiani P and Mazza G. Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. *Ital. J. Food Science.* (1992) 4, 109-116.
- [20] Moine V et Dubourdieu D. *Revue Française d'Œnologie.* N°118, (2006) 32-35.