

Effet de la gomme arabique et des tanins du tamarin sur la stabilité des anthocyanes de sirop d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Papa Guedel FAYE*, Mady CISSE, Nicolas AYEISSOU, Mama SAKHO et Codou MAR DIOP

Centre d'Etudes sur la Sécurité Alimentaire et le Développement des Molécules Fonctionnelles (CESAM), Ecole Supérieure Polytechnique, Université Cheikh Anta Diop, BP 5080 Dakar Fann, Sénégal

* Correspondance, courriel : fayepapaguedel@gmail.com

Résumé

Les calices d'*Hibiscus sabdariffa* sont connus pour leur richesse en anthocyanes, (calices rouges) responsables de leur coloration rouge. Cependant, ces anthocyanes étant très instables au cours du stockage, se dégradent en donnant une coloration brune, limitant ainsi leur utilisation comme colorant dans les différents produits alimentaires. Des essais de stabilité des anthocyanes ont été réalisés entre 4 et 45 °C avec des sirops d'*H. sabdariffa* contenant différents ratios de gomme arabique et de tanins de tamarin. Les résultats ont montré une stabilité mitigée des anthocyanes à 37° et 45°C dans des sirops contenant 5 mg L⁻¹ de tanins de tamarin et 2,5 g L⁻¹ de gomme arabique. Par rapport au sirop témoin, le ratio à 10g L⁻¹ de gomme arabique affiche une bonne stabilité pendant le stockage à 4 °C. En effet, les pertes en anthocyanes s'élèvent à 10 % en 120 jours, contre 16 % pour le témoin. Les paramètres indirects de suivi des produits de dégradation que sont la conductivité et la turbidité sont inversement proportionnels à la température de stockage.

Mots-clés : *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanes, instable, gomme arabique, tanin, stockage.

Abstract

Effects of gum arabic and tamarind's tannin on the stability of anthocyanin in syrup of *Hibiscus sabdariffa* L.

The thermal stability of anthocyanin extract isolated from the dry calyces of *Hibiscus sabdariffa* L was studied over the temperature range 4, 15, 20, 37 and 45 °C in aqueous solutions (syrup) in the presence of gum Arabic and tannin (Tamarind). The anthocyanins are easily degraded during heat treatments and during storage at room temperature. The red color gradually changes in brown. This instability is also evident in aqueous solutions (syrup) in storage and is the main factor limiting the use of extracts of *H. sabdariffa* as colorant in complex food formulations. Results showed that using 10 gL⁻¹ Arabic gum resulted in a much more stable product as compared with sample syrup at 4 and 20 °C, at 37 and 45 °C using tannin 5 mgL⁻¹ give more stable product as compared with sample syrup. The losses of anthocyanins in sample were 16 %, 96 % during storage after 120 days at 4 and 45 °C respectively. Compared to syrup and 10 gL⁻¹ Arabic gum 10 % and 95 % at the same temperatures and storage days. The turbidity and conductivity decreased with increasing time as a function of storage temperature.

Keywords : *Hibiscus sabdariffa*, anthocyanins, thermal stability, degraded, tannin, arabic gum.

1. Introduction

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* sont connus pour leur instabilité [3 - 9]. Ainsi la couleur rouge des boissons et sirops obtenus à partir des calices devient très instable. Des tentatives de stabilisation des anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* ont été réalisées par Esselen et Sammy [10] dans différentes formulations de produits alimentaires (gelées, boissons, boissons carbonatées, poudres lyophilisées). Clydesdale et Francis [3] ont également étudié cette stabilité des anthocyanines d'*H. sabdariffa* L dans les produits alimentaires sec conditionnés (une préparation de boisson et un dessert de gélatine), alors que Pouget, [11] examinaient les effets de différents composés chimiques (acide ascorbique, BHA, gallate propylique, EDTA dissodique, sulfite de sodium) sur la stabilité des anthocyanes d'*H. sabdariffa*. Par ailleurs, le phénomène de co-pigmentation est l'un des mécanismes les plus importants de stabilisation des couleurs naturelles exprimées par les anthocyanes [10, 11]. 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. Ainsi, l'introduction de la gomme arabique et des tanins, permettrait aussi d'augmenter la stabilité des anthocyanes des extraits aqueux de *H. sabdariffa*. Les résultats de ces essais font donc l'objet de ce présent article.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel végétal

Les essais de stabilité des anthocyanes de sirops d'*Hibiscus sabdariffa* ont été réalisés avec deux variétés horticoles dites « Vimto et Koor ». Ces variétés ont été récoltées durant la campagne 2014 - 2015 et proviennent de la région de Diourbel dans le village de Bambeye. Il s'agit de calices, séchés et conditionnés dans des sacs de 50 kg en polyester. La gomme arabique vient de la Mauritanie, dans la région de Kaille et récoltée en 2014 tandis que le tamarin vient du Sénégal dans la région de Kolda.

2-2. Méthodes

2-2-1. Production des sirops

Un extrait aqueux de calices d'*H. sabdariffa* est obtenu après quatre heures de macération dans un ratio calices / eau de 1 / 5 (kg.kg⁻¹). L'extrait final récupéré est doublement filtré puis divisé en quatre lots : deux lots auxquels sont rajoutés de la gomme arabique à raison de 2,5 g.L⁻¹ et 10 g.L⁻¹ ; un lot contenant des tanins de tamarin à raison de 5 mg.L⁻¹ et un lot témoin. Les sirops à 65 Brix sont préparés avec rajout de sucre saccharose à froid sur chaque extrait, puis mélangés à froid jusqu'à dissolution complète au bout de 30 min.

2-2-2. Extraction des tanins du tamarin

Les tanins sont obtenus selon le procédé de [13]. Une masse de 100 g de fibres de gousse de tamarin est plongée dans 100 ml d'éthanol et 100 ml d'eau distillée. Le tout 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.

2-3. Pasteurisation et stockage

Les sirops sont caractérisés (*Tableau 1*) et remplis dans des bouteilles ambrées propres, désinfectées à l'eau de javel diluée à 100 ppm pendant trente minutes égouttés et séchés à l'étuve. Après remplissage et capsulage à froid, la pasteurisation est effectuée en bain-marie à la pasteurisatrice (VP 50) de 75 °C / 30 min, le refroidissement est effectué sous jet d'eau froide. 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 sirops sont ensuite séparés et stockés à différentes températures (4, 15, 20, 37, et 45 °C). Cette expérience permet de voir l'influence de la température et la matrice ajoutée sur la stabilisation des anthocyanes. Des analyses sont effectuées toutes les deux semaines sur une période de quatre mois afin de suivre les paramètres physico-chimiques. Les réactifs, les solvants organiques utilisés dans l'ensemble des travaux de recherche 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 étuvée pendant 20 min à 120 °C.

2-3-1. Dosage des anthocyanes

Le principe 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.

2-3-2. Détermination couleur, turbidité, conductivité

L'indice de dégradation de la couleur se détermine par le rapport des absorbances à 420 nm et à λ_{max} 520 nm suivant la méthodologie utilisée par [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 et les conductivités ont été mesurées par un turbidimètre (*HE9 série 61076*) et un conductimètre (*Hanna instruments*) à 20 °C.

2-4. Analyses statistiques

Les résultats issus de notre étude ont été exprimés sous forme de moyennes \pm écart-types. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant l'ANOVA à un facteur.

3. Résultats et discussion

L'enjeu de cette partie est de montrer l'impact des matrices ajoutées après la caractérisation des différents sirops (*Tableau 1*) sur la stabilité des anthocyanes durant la conservation entre 4 et 45 °C.

3-1. Caractérisation des sirops

Les résultats d'analyse des différents sirops à base de calices rouge d'*Hibiscus sabdariffa* sont consignés dans le *Tableau 1* ci-dessous. Les analyses montrent des résultats assez homogènes pour l'ensemble des sirops au premier jour avant le stockage à différentes températures.

Tableau 1 : Caractéristiques physico-chimiques des sirops utilisés

Paramètres	Sirop + 5mg.L ⁻¹ Tanin	Sirop témoin	Sirop + 2,5g.L ⁻¹ g. arabique	sirop + 10 g.L ⁻¹ g. arabique
pH à 25 °C	2.40 ± 0,02	2.39 ± 0,02	2.40 ± 0,02	2.41 ± 0,02
Acidité titrable en meq/L	19.58 ± 0,12	21.26 ± 0,14	20.44 ± 0,13	21.81 ± 0,12
Brix à 20 °C g/100 g	66.5 ± 0.2	65.3 ± 0.2	67.3 ± 0.2	65.6 ± 0.2
Anthocyanes Après pasteurisation	496 ± 30	561 ± 29	522 ± 30	562 ± 19
Turbidité en NTU à 20 °C	0	0	0	0
Conductivité en µs/cm à 20 °C	1446	1520	1549	1533
Densité à 20 °C	1.24	1.22	1.27	1.22

3-2. Suivi de la concentration en anthocyane et l'intensité de coloration du lot témoin

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 haute température (37 °C et 45 °C).

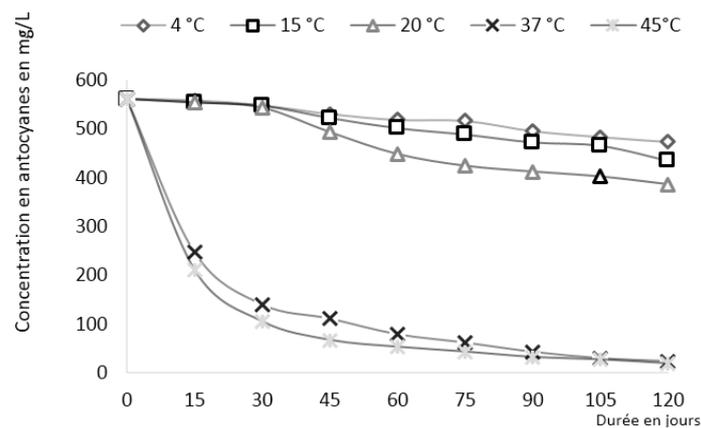


Figure 1 : Evolution de la concentration en anthocyanes au cours du stockage du sirop témoin entre 4 et 45 °C

L'intensité colorante est mesurée à la longueur d'onde optimale de 520 nm. Les résultats du suivi montrent également des déperditions dans le temps qui sont plus importantes à 45 °C qu'à 4 °C (**Figure 2**).

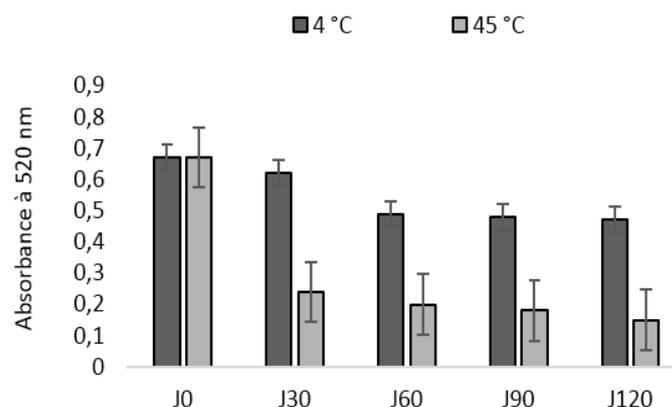


Figure 2 : Evolution de l'intensité colorante du sirop témoin durant le stockage à 4 et 45 °C 120 jours

3-3. Résultats des essais de stabilisation durant le stockage des sirops

Les taux de pertes en anthocyanes à différentes températures : 4 °C, 20 °C, 37 °C et 45 °C, sont montrés sur les différentes **Figures** ci-dessous.

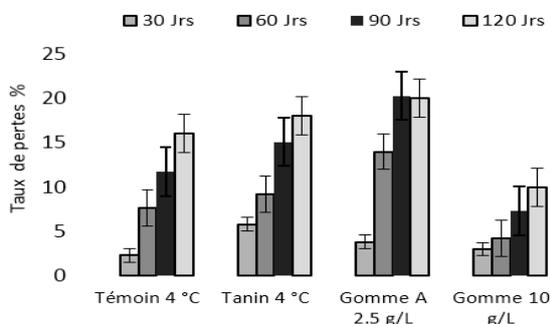


Figure 3 : Evolution de taux de perte en anthocyanes des différents sirops stockés à 4 °C

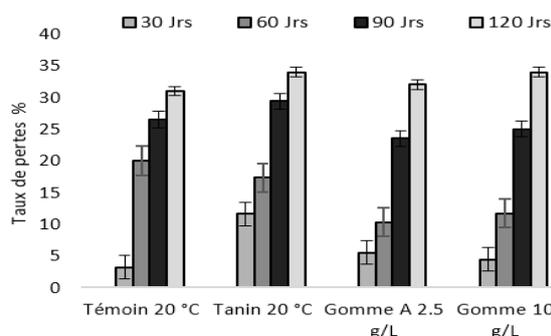


Figure 4 : Evolution du taux de perte en anthocyanes des différents sirops stockés à 20 °C

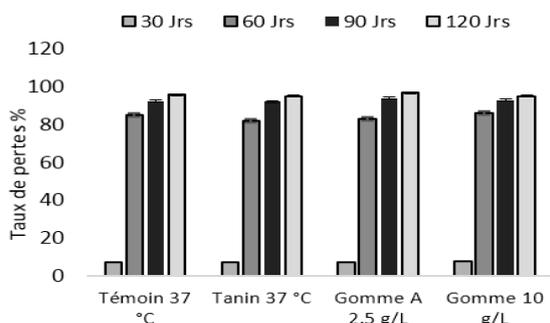


Figure 5 : Evolution du taux de pertes en anthocyanes des sirops stockés à 37 °C

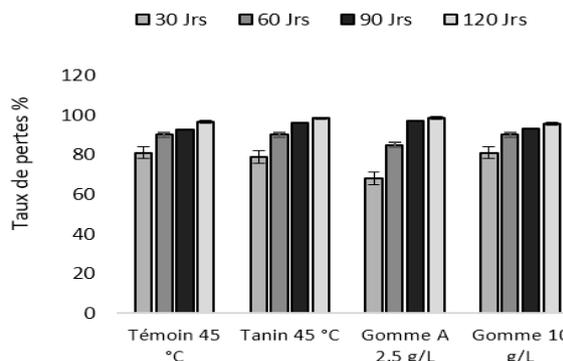


Figure 6 : Evolution du taux de perte en anthocyanes des sirops stockés à 45 °C

3-4. Suivi de la conductivité des différents lots à 4 °C et 45 °C

Une baisse générale de la conductivité est constatée (**Figure 7**) sur l'ensemble des sirops (stockés à 45 °C) avec un meilleur résultat pour le sirop à 10 g GA/L.

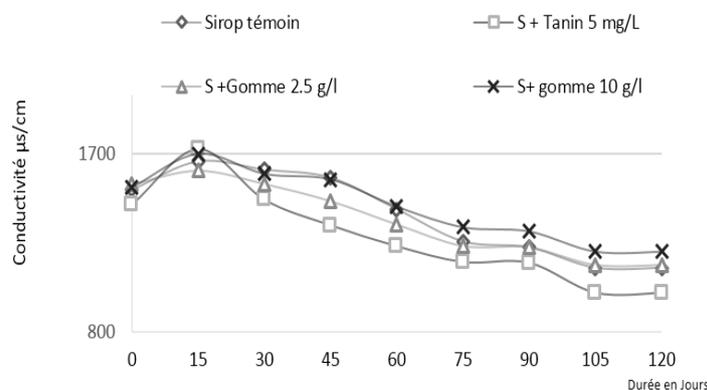


Figure 7 : Suivi de la conductivité des sirops au cours du stockage à 45 °C

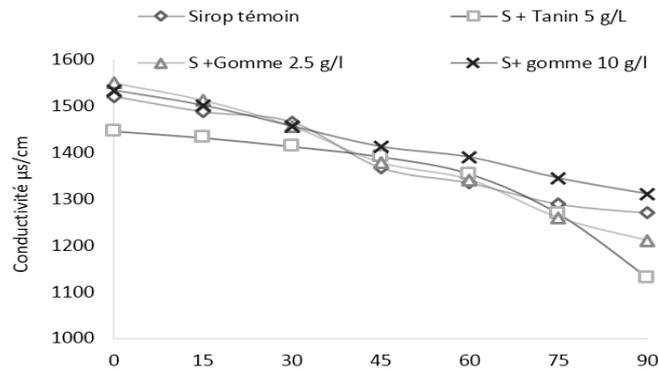


Figure 8 : Evolution de la conductivité au cours du stockage des sirops à 45 °C 3 mois

3-5. Résultats du suivi de l'évolution de la turbidité au cours du stockage

L'analyse de la **Figure 8** montre des turbidités qui décroissent inversement à la température de stockage des sirops.

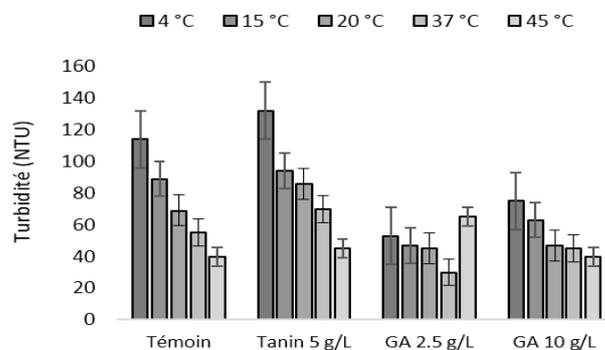


Figure 9 : Evolution de la turbidité des sirops à 120 jours de stockage

3-6. Stabilité des anthocyanes au cours du stockage

Au cours de ces essais de suivi, les pertes en anthocyane dans les échantillons 'témoins' sont proportionnelles aux températures de stockage et le sont plus significativement à 37 °C et 45 °C (**Figure 1**). Ces pertes en anthocyanes demeurent couplées à l'intensité colorante (**Figure 2**) et confirment que les anthocyanes sont très instables et thermolabiles [16]. Les résultats montrent donc que les meilleures températures de stockage des extraits de *H. sabdariffa* se situent entre 4 °C et 20 °C. Les tentatives d'amélioration de la stabilité des anthocyanes dans les conditions d'essais ont été vaines en présence de tanins et de gomme arabique à 5 gL⁻¹. Elles n'ont réussies qu'avec la gomme arabique 10 gL⁻¹ à 4 °C (**Figure 3**). A cette concentration en gomme arabique et pour des températures supérieures à 20 °C, l'effet de la chaleur semble prédominer (**Figures 5 et 6**). Par ailleurs, d'autres facteurs permettent d'optimiser la stabilité des anthocyanes dans les sirops. 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 5 mgL⁻¹ de tanin dans le sirop. Un taux de pertes de 82 % est obtenu à 37 °C en trois mois contre 85 % du sirop témoin, et 79 % contre 81 % du sirop témoin à 45 °C en trois mois. Bien que faible (2 % et 3 %), cette différence confirme l'effet des tanins [19]. Néanmoins la structure du co-pigment est aussi influencée par la température [20].

3-7. Evolution de l'intensité colorante au cours du stockage

Les résultats du suivi de l'absorbance à la longueur d'onde 520 nm, donne des valeurs qui chutent dans le temps (**Figure 2**). De 0,67 à 0,45 entre zéro et quatre mois à 4 °C, et 0,67 et 0,15 à 45 °C pour le sirop témoin. Les anthocyanes peuvent réagir avec d'autres composés phénoliques qui résultent de 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 dans le jus du 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].

3-8. Turbidité et conductivité

La conductivité mesure la capacité de l'extrait aqueux d'*H. sabdariffa* à transmettre le courant électrique. Elle traduit aussi la stabilité des anthocyanes par le billet du cation flavylium. Elle sera d'autant plus élevée que la quantité d'ions sera importante. Une baisse générale est constatée sur l'ensemble des sirops (**Figures 7 et 8**). Mais l'échantillon avec 10 g.L⁻¹ de gomme arabique affiche les meilleurs résultats. Ainsi, son effet stabilisant sur les anthocyanes masqué à 45 °C est révélé par le suivi de l'ion flavylium. Le paramètre conductivité présente donc l'avantage de suivre la stabilité des anthocyanes aux températures de stockage. 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 sirops. L'utilisation de la gomme arabique et les tanins de tamarin dans les sirops lors des essais entraîne une légère augmentation de la turbidité dès leur ajout. Après filtration et mise en bouteilles de 30 ml, le trouble se forme petit à petit au cours du stockage à différentes températures (**Figure 9**). 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 sirops, confirmant les travaux de [21] réalisés sur le vin rouge.

4. Conclusion

L'utilisation de la gomme arabique concourt à diminuer le niveau d'instabilité des sirops d'*H. sabdariffa* lors du stockage à 4 °C. Son effet masqué aux fortes températures de stockage peut être mis en évidence par le suivi de la conductivité. Dans les conditions d'essais le ratio tanins / sirop s'est révélé trop faible pour être efficace. Au regard de ces travaux, chacune de ces techniques de stabilisation peut faire l'objet d'une optimisation et une application en production.

Remerciements

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire d'Electrochimie et des Procédés Membranaires (L.E.P.M.) et au Centre d'Etudes sur la Sécurité Alimentaire et le Développement des Molécules Fonctionnelles (CESAM) de l'Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar Université Cheikh Anta Diop (Sénégal). Les auteurs remercient vivement le chef de laboratoire, ainsi que tout le personnel.

Références

- [1] - B. H. ALI, H. M. MOUSA and S. MOUGY, The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol induced hepatotoxicity in rats, *Phytother. Res.*, 17 (1) (2003) 56 - 59.
- [2] - M. CISSE, M. DORNIER, M. SAKHO, A. NDIAYE, M. REYNES, et O. SOCK, Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations *Fruits*, 64 (3) (2009) 179 - 193 p.
- [3] - F. M. CLYDESDAL, J. H. MAIN and, F. J. FRANCIS, Roselle (*Hibiscus subdunflu* L.) anthocyanins as colorants for beverages and gelatin desserts. *J. Food Protect*, 42 (1979) 204 - 207.
- [4] - P. K. WONG, S. YUSOF, H. M. GHAZALI and Y. B. C. Man, Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutr. Food Sci.*, 32 (2002) 68 - 73.
- [5] - P. MARKAKIS, Stability of anthocyanins in foods. In *Anthocyanins as Food Colors*, (P. Markakis, ed.), *Academic Press, New York*, (1982) 163 - 181 p.
- [6] - E. MACCARONE, A. MACCARONE and P. RAPISARDA, Acylated anthocyanins from oranges. *Annali Di Chemical*, (1985) 75 (1 - 2) 79 - 86.
- [7] - G. HRAZDINA, Reactions of the anthocyanidin-3, 5-diglucosides: formation of 3,5-di-(O- β -D-glucosyl)-hydroxyl-7-hydroxy coumarin. *Phytochemistry*, 10 (1971) 1125 - 30.
- [8] - J. FRANCIS, Food colorants: Anthocyanins. *Critical reviews in Food Science and Nutrition*, 28 (1989) 273 - 274.
- [9] - H. H. CHEN, P. J. TSAI., S. H. CHEN, Y. M. SU, C. C. CHUNG and T. C. HUANG, Grey Relational Analysis of Dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), *Journal of Food Processing and Preservation*, 29 (2005) 228 - 245.
- [10] - W. B. ESSELEN, G. M. SAMMY, Roselle a natural red colorant for foods. *Food Prod. Dev.*, (1) (19737) 80 - 86.
- [11] - M. P. POUGET, B. VENNAT, B. LEJEUNE and A. POURRAT, Extraction analysis and study of the stability of *Hibiscus* anthocyanins. *Lebensmiss.u.Technol*, N° 23, (1990) 103 - 105.
- [12] - J. F. HARBERTSON, J. A. KENNEDY and D. O. ADAMS, Tannin in Skins and Seeds of Cabernet Sauvignon, Syrah, and Pinot Noir Berries During Ripening, *Am. J. Enol. Vitic.*, (2002) 53 1 54-59.
- [13] - D. S. SEIGLER, S. SEILHEIMER, J. KEESY, and H. F. HUANG. Tannins from Four Common Acacia species of Texas and Northeastern Mexico *Economic Botany*, 40 (2) (1986) 220 - 232.
- [14] - R. E. WROLSTAD, J. D. CULBERTSON, C. J. CORNWELL and L. R. MATTICK, Detection of Adulteration in Blackberry Juice Concentrates and Wines. *J. Assoc off Anal. Chem.*, Vol. 65, N° 6, (1982) 1417 - 1423.
- [15] - B. A. CEVALLOS, L. CISNEROS-ZEVALLOS, Stability of anthocyanin based aqueous extracts of Andean purple corn and red fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chem.*, N°86, (2004) 69 - 77.
- [16] - G. SKREDE, R. E. WROLSTAD and R. W. DURST, Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). *J. Food Sci.*, N°65, (2000) 357 - 364.
- [17] - R. BROUILLARD, in "Anthocyanins as Food Colors", Ed. *Academic press, New York*, (1982) 1 - 40.
- [18] - R. BROUILLARD, G. MAZZA, Z. SAAD, A. M. ALBRECHT-GARY. *J. AM., Chem. Soc.*, (1989) 111 - 2604.
- [19] - E. MINIATI, P. DAMIANI and G. MAZZA, Copigmentation and self-association of anthocyanins in food model systems. *Ital. J. Food Sci.*, N°4, (1992) 109 - 116.
- [20] - N. KAHN, Mise en évidence de la stabilisation de la couleur par différents tannins de pépins de raisin. *Revue des OEnologues*, N°118, (2006) 33 p.
- [21] - V. MOINE et D. DUBOURDIEUX. Une mannoprotéine à ancre GPI responsable de la stabilisation tartrique des vins - Derniers développements industriels. *Revue Française d'Œnologie*, N°193, (2002) 32 - 35.