

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



ECOLE DOCTORALE : SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTE ET DE
L'ENVIRONNEMENT

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2016

N° d'ordre : 187

THESE DE DOCTORAT

SPECIALITE : CHIMIE DES PRODUITS NATURELS

Présentée par :

Alé KANE

**Valorisation de *Hibiscus sabdariffa* L. : amélioration des procédés
traditionnels de transformation, développement de nouveaux
produits fonctionnels (extraits anthocyaniques)**

Soutenue le 29 janvier 2016 devant le jury composé de :

M. Abdoulaye SAMB	Professeur, FST-UCAD	Président
M. Bara NDIAYE	Professeur, FMPOS-UCAD	Rapporteur
M. Mathieu GUEYE	Maître de Recherche, IFAN-UCAD	Rapporteur
M. Mady CISSE	Maître de Conférences, ESP-UCAD	Rapporteur
M. Nicolas AYEISSOU	Maître Assistant, ESP-UCAD	Examineur
M. Manuel DORNIER	Professeur SupAgro Montpellier	Co-directeur de thèse
Mme Mama SAKHO	Maître de Conférences ESP-UCAD	Directrice de thèse

VALORISATION DES TRAVAUX DE RECHERCHE

PUBLICATIONS

Alé KANE, Yasmine DRISS, Ndèye Adiara NDIAYE, Mady CISSE, Mama SAKHO et Manuel DORNIER. (2015). «Impact de la teneur en extrait sec soluble sur la dégradation thermique des anthocyanes d'extraits aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* L.». Afrique Science, Vol.11, N°6, <http://www.afriquescience.info/document.php?id=5650>. ISSN 1813-548X.

Ndeye Adiara NDIAYE, Modou DIENG, **Alé KANE**, Mady CISSE, Didier MONTET et Ndeye Coumba TOURE KANE. (2015). «Diagnostic et caractérisation microbiologique des procédés artisanaux de fabrication de boissons et de concentrés d'*Hibiscus sabdariffa* L au Sénégal». Afrique Science, Vol.11, N°3. <http://www.afriquescience.info/document.php?id=4771>. ISSN 1813-548X.

Cisse, Mady; Vaillant Fabrice; **KANE Alé**; Ndiaye Oumoule; Dornier Manuel. (2012) Impact of the Extraction Procedure on the Kinetics of Anthocyanins and Color Degradation of Roselle Extracts During Storage. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol.92;1214-1221.

COMMUNICATIONS

KANE Alé, NDIAYE Ndèye Adiara, CISSE Mady, DORNIER Manuel, SAKHO Mama (2014). « Essais de production de concentrés d'extraits aqueux de calices d'*Hibiscus sabdariffa* L. (Bissap) ». Congrès AFTER ; Université Cheikh Anta DIOP de Dakar (Sénégal).

KANE Alé, MERTZ Christian, CISSE Mady, PALLET Dominique, SAKHO Mama, DORNIER Manuel (2013). « Le Bissap, un aliment fonctionnel ». Conférence Internationale et Interdisciplinaire sur la Biodiversité Végétale et les Ressources Végétales dans le Sahel ; Université Cheikh Anta DIOP de Dakar (Sénégal).

KANE Alé, CISSE Mady, GALLY Timothée, BENNETT Ben (2012) «A value chain analysis of Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Senegal». Effost, annual conference; Montpellier-France.

RESUME

La caractérisation des principales variétés de calices d'*Hibiscus sabdariffa* L ou Bissap cultivées au Sénégal (Vimto, Koor, Thaï et CLT92) a été réalisée. L'analyse de la variance (ANOVA) a montré des différences significatives ($p < 0,05$) dans la composition des calices. D'une part, les calices de variété Thaï se distinguent par une teneur relativement élevée en lipides totaux et ceux de variété Koor par un faible pH et une forte chromaticité C^* . D'autre part, les calices de variétés Vimto et CLT92 se particularisent par une concentration élevée en anthocyanes, en polyphénols et en sucres. L'exploitation des résultats par les outils d'analyse multivariée (ACP et AFD) a conduit à une classification simple des variétés de calices étudiées avec un taux de réussite de 100 %.

La détermination du profil en composés phénoliques par couplage HPLC/MS a permis l'identification de 2 anthocyanes, de 3 acides phénoliques et de 7 flavonols présents dans ces calices.

Le diagnostic des procédés traditionnels de transformation a mis en évidence l'influence de la formulation et du traitement thermique sur la qualité nutritionnelle et la stabilité des boissons et sirops de Bissap.

Afin de produire des concentrés anthocyaniques stables, des essais d'évaporation sous vide ont été réalisés. Les résultats ont permis de montrer que cette technique constitue un moyen efficace de limiter la dégradation des pigments anthocyaniques très sensibles à la chaleur. Ainsi, lors de la production d'un concentré de Bissap à 60 °Brix, seul 1 % des anthocyanes a été dégradé pour une évaporation à 50 °C.

Les études de stabilité ont montré que la dégradation des anthocyanes dans les calices et produits à base de Bissap suit une cinétique de réaction d'ordre 1. Le stockage à des températures inférieures à 20 °C augmente considérablement la durée de conservation de ces produits.

Mots clés : *Hibiscus sabdariffa*, Bissap, anthocyane, composé phénolique, boisson, concentré, évaporation sous vide.

ABSTRACT

Characterization of principal varieties of chalice of *Hibiscus sabdariffa* L or Bissap cultivated in Senegal (Vimto, Koor, Thai and CLT92) was carried out. The analysis of variance (ANOVA) showed significant differences ($p < 0,05$) in the composition of the chalice. On the one hand, the chalice of Thai variety are characterized by content relatively high of total lipids and those from Koor variety by a low pH and a strong chromaticity C^* . On the other hand, the chalice of Vimto varieties and CLT92 are particularized by a concentration raised in anthocyanes, polyphenols and sugars. The analysis of the results by the tools for multivariate analysis (PCA and FDA) led to a simple classification of the varieties of chalice studied with a rate of success of 100 %.

Determination of the profile in phenolic compounds by coupling HPLC/MS allowed the identification of 2 anthocyanes, 3 phenolic acids and 7 flavonols present in these chalice.

The diagnosis of the traditional processes of transformation highlighted the influence of the formulation and the heat treatment on nutritional quality and the stability of drinks and syrups of Bissap.

In order to produce stable concentrates of anthocyanins, tests of vacuum evaporation were carried out. The results made it possible to show that this technique constitutes an effective means to limit the degradation of the anthocyanin pigments very sensitive to heat. Thus, during the production of a concentrate of Bissap with 60 °Brix, only 1 % of the anthocyanes was degraded for an evaporation at 50 °C.

The studies of stability showed that the degradation of the anthocyanes in the chalice and products containing Bissap follows kinetics of reaction of order 1. Storage at temperatures lower at 20 °C increases considerably the shelf life of these products.

Key words: *Hibiscus sabdariffa*, Bissap, anthocyanin, phenolic compound, drink, concentrate, vacuum evaporation.

REMERCIEMENTS

« ALHAMDOULILLAH RABIL ALAMIINE »

J'adresse mes sincères remerciements à la Direction de l'Ecole Supérieure Polytechnique (ESP) de m'avoir soutenu pendant toute ma formation (Ingéniorat, Master et Doctorat).

Je remercie les responsables de mon département Génie chimique et biologie appliquée (GC/BA) et l'ensemble du personnel (PER et PATS) de l'ESP de Dakar. Merci pour votre soutien, merci pour vos conseils, merci pour vos encouragements, merci pour votre aimable confiance. Tous mes remerciements à la Direction de l'école doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement. J'exprime ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à notre secrétaire Mme Fama DIOP. Merci Mme DIOP, pour votre soutien, votre disponibilité et votre professionnalisme.

Au terme de ce travail, j'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements aux Professeurs Mama SAKHO, Manuel DORNIER et Dominique PALLET. C'est grâce à votre rigueur scientifique, votre disponibilité et vos précieux conseils que ce travail a été réalisé. Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Nawel ACHIR et Christian MERTZ.

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements à mon Responsable Scientifique, mon conseiller, mon maître, le Professeur Mady CISSE. Merci pour ta confiance, tes conseils et ton soutien moral. Merci de m'avoir associé à tes projets de recherche. Merci de m'avoir permis d'accéder au financement de ma thèse et d'intégrer les équipes de recherche du CIRAD de Montpellier.

Je remercie également les Professeurs Abdoulaye SAMB, Bara NDIAYE, Mathieu GUEYE et Nicolas AYEISSOU d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude aux coordonateurs du projet AFTER et aux différents organismes qui ont accepté de financer ma thèse. Je veux citer l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), le programme USAID-ERA, Campus France et l'Action Incitative du CIRAD de Montpellier. Je remercie particulièrement Mme Fabar SANE, responsable du bureau de la mobilité à l'AUF de Dakar.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du CIRAD de Montpellier pour leurs conseils, leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma formation. Merci à Marie Pierre, Jocelyne, Nathalie, Julien, Adrien et Jules. Merci à tous mes collègues chercheurs du CIRAD.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit au Service de recherche de l'ESP de Dakar qui réalise un travail remarquable au niveau de cette institution. Merci au Professeure Mme Codou MAR DIOP et à notre secrétaire Mme Sokhna KA DIAKAHTE.

Merci à mes frères et amis, Moctar DIOP et Assane SENGHOR, pour avoir veillé constamment sur ma famille lors de mon absence du Sénégal. Merci à tous mes collègues et ami du COTECH/ESP. Merci à mes amis et collègues Malick MBENGUE, Ndèye Adiara NDIAYE, Mariama Dramé, Mariame KOÏTA, Thérèse BASSE, Louise FAYE, Aminata HANE, Awa Sall, kheïfate LY, Adama Diakhère NGOM, Mama Tata DIA, Joseph FERNANDEZ, Emilie NDIAYE, Thiadji DIENG et ma Maman Dior DIENG HANE.

J'adresse ma sincère reconnaissance aux familles TRAORE et DIARRA de Montpellier. Merci pour votre chaleureux accueil et votre grande hospitalité. Amadou TRAORE, Mamadou DIARRA, Khady, Lalia , Papy et Papou DIARRA, Aminata, Cheikhouna et Mariam Suzanne TRAORE, Ousmane SECK, Tonton DIADJI, Grand Gobs, Mouhantz NDIAYE, Imam DJIBRIL.

Je remercie l'équipe de recherche du Laboratoire de Formation Continue en Industries Agro-alimentaires (LFCIA). Merci à tous les étudiants qui ont participé aux travaux sur le Bissap. Je veux citer Oumar Ben CISSE, Samba KANDJ, Khadim NIANE, Babacar NDIAYE, Fatou THIAM, Djibril DIATTARA et Guédèl FAYE. Merci à tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée au Génie Industriel (MAGI) et du Laboratoire des Procédés Electrochimiques et Membranaires (LPEM) de l'ESP de Dakar.

Merci à tous mes amis, mes collègues et mes collaborateurs

MERCI A TOUS CES HOMMES ET FEMMES QUI M'ONT TOUJOURS SOUTENU

DIARAMAA

ALBARKA

DIADIEUF.

DEDICACES

JE DEDIE CE MODESTE TRAVAIL

A TOUTE MA FAMILLE :

A PAPA DOUDOU ET MAMAN NDACK

A MES FRERES ET SŒURS

A MES NEVEUX ET NIECES

A MA TRES CHERE EPOUSE, NAFISSATOU LY KANE

A MES FILLES FATIMA, RAHMA, AICHA ET ZAHRA

A PAPA MAMADOU ALASSANE LY

A YAYE BOY, RAHMATOULAYE WANE LY

A MA BELLE SŒUR Dr FATOUMATA LY LOUM

A TOUTE LA FAMILLE LY

A TOUS MES AMIS

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

AAL	Acides Aminés Libres
AAT	Acides Aminés Totaux
ACP	Analyse en composantes principales
AFD	Analyse factorielle discriminante
AFTER	A frican F ood T radition r Evisited by R esearch
AGE	Acid gallic equivalent
ANOVA	Analyse of variance
ASNAPP	Agribusiness in Sustainable Natural African Plan Products
AUF	Agence Universitaire de la Francophonie
Aw	Water activity
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage
CIRAD	Centre international de recherche agronomique pour le développement
DO	Densité optique
ESP	Ecole Supérieure Polytechnique de Dakar
ESS	Extrait Sec Soluble
FMPOS	Faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie de Dakar
FST	Faculté des Sciences et Techniques
GC/BA	Génie chimique et biologie appliquée
HPLC	Chromatographie Liquide Haute Performance
IB	Indice Brun
IFAN	Institut Fondamental d'Afrique Noire
mEq	milli Equivalent

MS	Spectromètre de masse
PPO	polyphénol oxydase
Tr	Temps de rétention
UCAD	Université Cheikh Anta DIOP de Dakar
UFC	Unité formant colonie
UV	Ultraviolet
VAPROVET	Valorisation des Produits Végétaux

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Plantes et calices rouge d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	3
Figure 2 : Claie de séchage des calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	7
Figure 3 : Principales classes de flavonoïdes	14
Figure 4 : Les six anthocyanidines les plus abondants dans la nature.....	18
Figure 5 : Structure générale des anthocyanidines	18
Figure 6 : Dégradation des anthocyanes en fonction du pH.....	22
Figure 7 : Complexation métallique des flavonoïdes	24
Figure 8 : Les zones d'échantillonnage des calices de Bissap.....	26
Figure 9 : Schéma du dispositif de concentration sous vide.....	28
Figure 10 : Montage du système de dégazage de l'hydrolysate.....	34
Figure 11 : pH des principales variétés de calices	41
Figure 12 : Acidité titrable des principales variétés de calices de Bissap.....	41
Figure 13 : Extrait sec total et activité de l'eau des principales variétés de calices de Bissap	42
Figure 14 : Teneur en cendres des principales variétés de calices de Bissap	43
Figure 15 : Teneur en lipides totaux des principales variétés de calices de Bissap.....	43
Figure 16 : Teneurs en sucres réducteurs et en sucres totaux des principales variétés de calices	44
Figure 17 : Teneur en acides aminés totaux des principales variétés de calices de Bissap	45
Figure 18 : Teneur en protéines totaux des principales variétés de calices de Bissap.....	45
Figure 19 : Teneur en vitamine C des principales variétés de calices de Bissap.....	46
Figure 20 : Teneur en polyphénols totaux des principales variétés de calices de Bissap.....	46
Figure 21 : Teneur en anthocyanes totaux des principales variétés de calices de Bissap.....	47
Figure 22 : Paramètre de couleur CIE L* (luminosité) des principales variétés de calices de Bissap .	48
Figure 23 : Paramètre de couleur CIE a* des principales variétés de calices de Bissap	48
Figure 24 : Paramètre de couleur CIE b* des principales variétés de calices de Bissap	49
Figure 25 : Paramètre de couleur CIE C* des principales variétés de calices de Bissap	49
Figure 26 : Paramètre de couleur CIE h* (tonalité) des principales variétés de calices de Bissap	50
Figure 27 : Biplots des composantes principales tracés avec les axes F1 et F2 (a) et les axes F1 et F3 (b) des variétés de calices de Bissap.....	55
Figure 28 : Plot de discrimination en AFD de 4 variétés de calices de Bissap construit en utilisant les anthocyanes totaux, les lipides, les protéines et l'indice de couleur C*	56
Figure 29 : Plot de discrimination en AFD de 4 variétés de calices de Bissap construit en utilisant les anthocyanes totaux, lipides totaux, protéines totaux et l'indice du pH.....	57
Figure 30 : Chromatogrammes à 360nm des calices des 4 principales variétés de Bissap	59

Figure 31 : Chromatogramme à 280 nm des extraits de calices de Bissap.....	61
Figure 32 : Acides phénoliques identifiés dans les calices de Bissap	62
Figure 34 : Anthocyanes majoritaires des calices de Bissap	63
Figure 33 : Chromatogramme à 510 nm des extraits de calices de Bissap.....	63
Figure 35 : Chromatogramme à 330 nm des extraits de calices de Bissap.....	64
Figure 36 : Flavonols identifiés dans les calices rouges de Bissap	65
Figure 37 : Evolution de la teneur en anthocyanes des calices au cours du stockage	67
Figure 38 : Evolution des pertes en anthocyanes au cours du stockage des calices de variétés Vimto (a) et Koor (b).....	70
Figure 39 : Comparaison des pertes en anthocyanes entre le modèle de prédiction d'Arrhenius et les résultats expérimentaux.....	71
Figure 40 : Diagramme de fabrication d'une boisson (nectars) à base de calices de Bissap.....	72
Figure 41 : Diagramme de fabrication d'un sirop à base de calices de Bissap.....	73
Figure 42 : Trempage des calices de Bissap en vue de la préparation des boissons.....	74
Figure 43 : Procédés de filtration des extraits de calices de Bissap	77
Figure 44 : Equipement de pasteurisation traditionnelle et moderne	78
Figure 45 : Opération de conditionnement des boissons à base de calices de Bissap	79
Figure 46 : pH des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	81
Figure 47 : Acidité titrable des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	81
Figure 48 : Teneur en extrait sec soluble (ESS) des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap.....	82
Figure 49 : Densité des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap.....	83
Figure 50 : Luminosité CIE L* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	84
Figure 51 : Indice de couleur CIE a* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	85
Figure 52 : Indice de couleur CIE b* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	85
Figure 53 : Saturation de la coloration CIE C* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap.....	86
Figure 54 : Tonalité CIE h° des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap.....	86
Figure 55 : Teneurs en polyphénols totaux des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	87
Figure 56 : Teneurs en anthocyanes totaux des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	87

Figure 57 : Teneurs en vitamine C totaux des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap	88
Figure 58 : Evolution de la teneur en anthocyanes dans la boisson et le sirop de Bissa pendant le stockage à différentes températures (4 à 45 °C).....	91
Figure 59 : Evolution des pertes en anthocyanes de la boisson et du sirop de Bissap au cours du stockage à différentes températures (4, 20, 30, 37 et 45 °C).....	93
Figure 60 : Pertes en anthocyanes au cours du stockage des boissons de Bissap : comparaison entre les valeurs expérimentales et les valeurs calculées avec le modèle d'Arrhenius.....	94
Figure 61 : Variation de l'activité de l'eau en fonction de la teneur en extrait sec soluble des concentrés.....	95
Figure 62 : Viscosité de l'extrait aqueux de Bissap au cours du procédé de concentration sous vide .	96
Figure 63 : Viscosité des extraits aqueux de calices de Bissap	97
Figure 64 : Variation du pH en fonction de la teneur en extrait sec soluble des solutions aqueuses de Bissap	97
Figure 65 : Evolution des paramètres de couleur des extraits aqueux de Bissap au cours du procédé d'évaporation des extraits aqueux de Bissap.....	99
Figure 66 : Teneur en anthocyanes des concentrés de Bissap en fonction de la température d'évaporation.....	101
Figure 67 : Evolution de la teneur en anthocyanes majoritaires des concentrés d'extraits aqueux de Bissap en fonction de la température d'évaporation	101
Figure 68 : Evolution de la teneur en anthocyanes des extraits de Bissap au cours du stockage à différentes températures	103
Figure 69 : Influence de la teneur en extrait sec soluble sur la vitesse de dégradation k des anthocyanes des extraits de Bissap.....	106
Figure 70 : Evolution des pertes en anthocyanes des extraits aqueux de Bissap en fonction de la température de stockage	107
Figure 71 : Sensibilité des extraits aqueux de Bissap à l'élévation de la température	109
Figure 72 : Corrélation entre les pertes expérimentales et les pertes calculées avec le modèle d'Arrhenius.....	110
Figure 73 : Dégradation des anthocyanes de l'extrait aqueux de Bissap à 40 °Brix (E40) lors des traitements thermiques.	111
Figure 74 : Variation du spectre d'absorption lors du traitement thermique des extraits aqueux de Bissap en fonction de la température de traitement et de la teneur en extrait sec soluble.....	115
Figure 75 : Augmentation de l'indice brun (IB) des extraits aqueux de Bissap au cours des traitements thermiques.	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques des variétés de Bissap cultivées au Sénégal.....	5
Tableau 2 : Composition générale des calices de Bissap.	9
Tableau 3 : Composition minérale des calices de Bissap.....	9
Tableau 4 : Composition en acides aminés des calices de Bissap.....	9
Tableau 5 : Composition générale des feuilles de Bissap.	10
Tableau 6 : Compositions en minéraux et en vitamines des feuilles de Bissap	10
Tableau 7 : Composition générale des graines de Bissap.....	11
Tableau 8 : Composition minérale des graines de Bissap.	11
Tableau 9 : Composition en acides aminés des graines de Bissap.	11
Tableau 10 : Composition moyenne en acides gras des graines de Bissap.	12
Tableau 11 : Principales classes de composés phénoliques	13
Tableau 12 : Principaux polyphénols retrouvés dans les plantes	15
Tableau 13 : Identification structurale des anthocyanidines	19
Tableau 14 : Zones de prélèvement et nombres d'échantillons de calices de Bissap	26
Tableau 15 : Relation entre pression et température en fonction de la teneur en extrait sec soluble ..	29
Tableau 16 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse HPLC/MS des composés phénoliques.....	38
Tableau 17 : Normes, milieux de cultures et températures d'incubation utilisés pour les analyses des différentes flores microbiologiques.....	40
Tableau 18 : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des principales variétés de calices d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. cultivées au Sénégal	51
Tableau 19 : Matrice de corrélation (Pearson) des variables dans l'analyse de la composition des calices de Bissap.....	54
Tableau 20 : Matrice de confusion pour les échantillons d'estimation en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques : anthocyanes totaux, lipides totaux, protéines totaux et clarté C* des calices de Bissap	57
Tableau 21 : Matrice de confusion pour les échantillons d'estimation en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques : anthocyanes totaux, lipides totaux, protéines totaux et clarté C* des calices de Bissap	58
Tableau 22 : Caractéristiques des chromatogrammes HPLC/MS des extraits de calices de Bissap. ...	60
Tableau 23 : Constantes de vitesse, durée de demi-vie et durée de destruction décimales des anthocyanes de deux variétés de calices (Vimto et Koor) pendant le stockage entre 4 et 45 °C	68
Tableau 24 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes des calices suivant les modèles d'Arrhenius, d'Eyring et de Ball.....	71

Tableau 25 : Résultats de l'analyse de la flore technologiques et des germes pathogènes de boisson Bissap (en UFC/g).....	90
Tableau 26 : Résultats de l'analyse de la flore technologiques et des germes pathogènes de boisson bissap (en UFC/g).....	90
Tableau 27 : Constantes de vitesse, durée de demi-vie et durée de destruction décimales des anthocyanes des produits boissons et sirop de Bissap pendant le stockage	92
Tableau 28 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes de produits à base de calices de Bissap au cours du stockage entre 4 et 45 °C	94
Tableau 29 : Constantes de vitesse (k), durée de demi-vie ($t_{1/2}$) et durée de destruction décimales (D) des anthocyanes des extraits de Bissap pendant le stockage (4 et 45°C)	104
Tableau 30 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes pendant le stockage entre 4 et 45 °C suivants les différents modèles de prédiction (Arrhenius, Ball et Eyring).....	108
Tableau 31 : Effet du traitement thermique sur la constante de vitesse k et le temps de demi-vie $t_{1/2}$, durée de destruction décimale D des anthocyanes et de l'apparition de l'indice brun des extraits aqueux de Bissap au cours du traitement thermique	112
Tableau 32 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes des extraits aqueux de Bissap pendant le traitement thermique entre 70 et 95 °C suivant les différents modèles de prédiction.....	113
Tableau 33 : Pertes expérimentales en anthocyanes et pertes estimées avec les modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring pour l'extrait à E60 durant le traitement thermique à 90 °C	114
Tableau 34 : Paramètres cinétiques de l'indice brun selon les modèles de prédiction (Arrhenius, Eyring et Ball) lors des traitements thermiques entre 70 et 95 °C des extraits aqueux de Bissap.	117

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1. Présentation de l'<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	3
1.1. Description	3
1.2. Origine	4
1.3. Répartition géographique	4
1.4. Variétés	4
1.5. Pratiques agricoles.....	5
1.5.1. Culture et récolte	5
1.5.2. Traitements post-récoltes	6
1.6. Composition de la plante d'<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	7
2. Les polyphénols	13
2.1. Classification	13
2.2. Les polyphénols dans les plantes	15
2.3. Les anthocyanes	17
2.3.1. Caractéristiques structurales.....	17
2.3.2. Propriétés bioactives	20
2.3.3. Stabilité des anthocyanes	20
2.3.4. Extraction des anthocyanes	25
II. MATERIEL ET METHODES.....	26
1. Matériel	26
1.1. Matériel végétal.....	26
1.2. Echantillonnage des boissons et sirops de Bissap	27
2. Méthodes	27
2.1. Extraction aqueuse des calices.....	27
2.2. Procédé d'évaporation sous vide des extraits aqueux des calices	27
2.2.1. Description du pilote d'évaporation.....	27
2.2.2. Protocole d'évaporation des extraits aqueux de calices.	29
2.2.3. Conditions de stockage des extraits aqueux de calices	30
2.2.4. Condition de traitement thermique des extraits aqueux des calices.....	30
2.3. Méthodes analytiques	30
2.3.1. Détermination de la teneur en matière sèche totale.....	30
2.3.2. Détermination de la teneur en cendres totaux	31
2.3.3. Mesure de la densité.....	31
2.3.4. Détermination du pH.....	31

2.3.5.	Détermination de l'acidité titrable.....	31
2.3.6.	Détermination de l'activité de l'eau (Aw).....	32
2.3.7.	Détermination de la teneur en vitamine C.....	32
2.3.8.	Détermination de la teneur en acides aminés libres	33
2.3.9.	Dosage des acides aminés totaux	34
2.3.10.	Dosages des protéines totales	35
2.3.11.	Détermination des paramètres de couleur	35
2.3.12.	Détermination de l'indice de brunissement IB.....	36
2.3.13.	Dosage des anthocyanes totaux.....	36
2.3.14.	Détermination de la teneur en polyphénols totaux.....	37
2.3.15.	Identification des composés phénoliques dans les calices de Bissap.....	37
2.3.16.	Mesure des spectres d'absorption des extraits de calices.....	38
2.4.	Méthode de modélisation des cinétiques de dégradation	39
2.5.	Analyses microbiologiques.....	40
2.6.	Analyses statistiques	40
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	41
1.	Caractérisation des principales variétés de calices de Bissap. cultivées au Sénégal	41
1.1.	Composition physicochimique et biochimiques des calices	41
1.2.	Identification par analyse multivariée des variétés de calices	51
1.2.1.	Caractéristiques physiques et sensorielles.....	51
1.2.2.	L'analyse en composantes principales (ACP).....	53
1.2.3.	Analyse factorielle discriminante (AFD)	56
1.3.	Identification du profil des composés phénoliques des calices	59
1.3.1.	Caractérisation des acides phénoliques	61
1.3.2.	Caractérisation des anthocyanes.....	62
1.3.3.	Caractérisation des flavonols	63
1.4.	Etude de la stabilité des anthocyanes des calices pendant le stockage	66
1.4.1.	Cinétique de dégradation des anthocyanes.....	66
1.4.2.	Modélisation et prédiction	70
2.	Procédés traditionnels de production des boissons et sirops à base de calices de Bissap.....	72
2.1.	Diagramme de fabrication des boissons et sirops	72
2.2.	Analyse des étapes de fabrication des boissons et sirops	73
2.3.	Caractéristiques physicochimique des boissons et des sirops.....	81
2.4.	Caractéristiques biochimiques des boissons et sirop d'<i>Hibiscus sabdariffa</i> L. ..	86
2.5.	Analyses microbiologiques des boissons et sirop à base de calices de Bissap	88
2.6.	Etude de la stabilité des boissons et sirop à base de calices pendant le stockage	

3. ETUDE DE LA PRODUCTION DE CONCENTRES AQUEUX.....	95
3.1. Caractéristique physicochimiques des concentrés aqueux d’extraits de calices d’<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	95
3.1.1. Activité de l’eau (Aw).....	95
3.1.2. Viscosité.....	96
3.1.3. pH des extraits aqueux	97
3.1.4. Paramètres de couleurs des extraits aqueux de calices.....	99
3.2. Impact de la température d’évaporation sur la qualité des extraits.....	100
3.3. Etude de la stabilité des extraits aqueux pendant le stockage.....	102
3.3.1. Cinétiques de dégradation des anthocyanes	102
3.3.2. Modélisation et prédiction.....	108
3.4. Etude de la stabilité au traitement thermique des extraits aqueux	110
3.4.1. Cinétique de dégradation thermique des anthocyanes des extraits	110
3.4.2. Modélisation et prédiction.....	113
3.4.3. Evolution du spectre d’absorption durant les traitements thermiques	114
3.4.4. Cinétique de dégradation de la couleur des extraits.....	116
CONCLUSION ET PERPECTIVES	118
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	121

INTRODUCTION

Hibiscus sabdariffa L. est une plante appartenant à la famille des Malvacées et cultivée dans de nombreuses régions tropicales et subtropicales d’Afrique, d’Asie et d’Amérique Centrale (Morton 1987). Les calices de cette plante sont très appréciés pour leur forte acidité et leur coloration rouge due à la présence de pigments anthocyaniques (Chang et al. 2012; Idham, Muhamad, et Sarmidi 2012a; Março et al. 2011). Ces calices sont largement utilisés dans la fabrication de produits alimentaires tels que les boissons, les sirops, les confitures et les concentrés (Cissé, Dornier, Sakho, Ndiaye, et al. 2009; Da-Costa-Rocha et al. 2014). Les extraits des calices rouges sont maintenant utilisés comme une alternative à la production de colorants naturels. Ces calices sont très connus pour leurs activités antioxydantes et antiradicalaires (Serrano-Cruz et al. 2013; Mohd-Esa et al. 2010). De nombreux travaux ont par ailleurs mis en évidence les propriétés thérapeutiques de ces calices (Kuo et al. 2012; Lin et al. 2012; Peng et al. 2011). L’intérêt sans cesse croissant pour ces calices entraîne une demande de plus en plus importante à l’exportation en particulier en Europe et aux Etats Unis (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009). La culture et la commercialisation des calices sont ainsi devenues une intéressante source de revenu pour les agriculteurs des pays en développement. Au Sénégal, cette plante est cultivée de manière traditionnelle par les femmes en général sur l’ensemble du territoire national mais principalement dans le bassin arachidier (centre du pays) comprenant les régions de Diourbel, Kaolack, Fatick et Thiès. Cette culture s’intensifie depuis peu. En effet, avec le déclin de la monoculture de l’arachide, les paysans sont confrontés à d’importants problèmes financiers. La recherche d’une culture de substitution a amené les paysans à s’orienter de plus en plus vers des solutions alternatives telles que la culture du Bissap.

Ces travaux de thèse s’inscrivent dans le cadre du projet AFTER (African Food Tradition rEvisited by Research) de l’Union Européenne. Ce dernier avait pour objectif général de revisiter les produits traditionnels africains, leurs connaissances et savoir-faire à la lumière des nouvelles technologies au profit des consommateurs, producteurs et transformateurs en Afrique et en Europe. Le projet AFTER était basé sur trois groupes de produits (produits fermentés à base de céréales, produits à base de poisson et de viande et extraits de plantes traditionnelles poursuivait quatre objectifs spécifiques :

- caractériser les connaissances et les savoir-faire,

- améliorer les processus combinés pour une meilleure sécurité et qualité nutritionnelle des aliments,
- évaluer l'acceptation des consommateurs,
- transférer les résultats en informations prêtes à l'emploi par les entreprises agro-alimentaires.

L'objectif général de ces travaux de thèse est l'étude des procédés traditionnels de transformation des calices d'hibiscus et le développement d'un concentré colorant à partir de cette matière première. Pour atteindre cet objectif, le travail réalisé est subdivisé en 3 parties. La première concerne la caractérisation physicochimique et biochimique des principales variétés de Bissap cultivées au Sénégal. Ils s'agit des variétés Vimto, Koor, Thaï et CLT92 produites dans les régions de Kaolack, Fatick, Thiès, Louga et Ziguinchor. La seconde partie repose sur le diagnostic des procédés locaux de transformation des calices de Bissap. Dans la dernière partie, nous abordons le procédé d'évaporation sous vide des extraits aqueux des calices rouges.

Ce mémoire de thèse est constitué de trois chapitres. Le premier est réservé à la synthèse bibliographique axé sur la connaissance d'*Hibiscus sabdariffa* L. et des pigments anthocyaniques. Le matériel et les méthodes utilisés sont présentés dans le deuxième chapitre. Les résultats et la discussion sont présentés dans le dernier chapitre.

I. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Présentation de l'*Hibiscus sabdariffa* L.

1.1. Description

Hibiscus sabdariffa L. var *sabdariffa* est une plante vasculaire appartenant à l'Embranchement des Spermaphytes, au Sous-Embranchement des Angiospermes, à la Classe des Dicotylédones, à la Sous-Classe des Dialypétales, à la Série des Thalamiflores, à l'Ordre des Malvales et à la Famille des Malvacées (**Figure 1**). Cette famille comprend 80 genres et 1 500 espèces. La majorité des variétés est utilisée comme plantes ornementales à l'exception du type *sabdariffa* dont deux variétés ont été identifiées (Charlotte 1974; Morton 1987). Il s'agit des variétés horticoles *altissima* et *sabdariffa* L. Cette plante est connue sous diverses appellations comme le Bissap au Sénégal, l'oseille de Guinée, le karkadé en Afrique du Nord, la flore de Jamaïque en Amérique centrale, le Groseille de Noël aux Antilles, le Ngaï-Ngaï en Afrique Centrale, le roselle, sorrel ou sour tea en anglais (Morton 1987; Glew et al. 1997; Lorenzo et al. 2000; Babalola 2001a; Cisse, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009)



Figure 1 : Plantes et calices rouges d'*Hibiscus sabdariffa* L

1.2. Origine

Hibiscus sabdariffa L. serait originaire de la région couvrant l'Inde à la Malaisie où il est couramment cultivé. Il aurait été ensuite transporté très tôt en Afrique avant de se répandre dans les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères. Les graines auraient été apportées en Amérique par les esclaves africains (Morton 1987).

1.3. Répartition géographique

Hibiscus sabdariffa L. se retrouve largement dans les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères. Il est aussi rencontré dans de nombreuses régions d'Amérique centrale et en Asie. En Afrique, l'*Hibiscus sabdariffa* L. serait domestiqué au Soudan, il y a environ 6000 ans, d'abord pour ses graines et ensuite pour la production de feuilles et de calices. Cette plante est présente actuellement dans toutes les régions tropicales. Mais les spécimens d'apparence vraiment sauvage de l'espèce ont été récoltés au Ghana, au Niger, au Nigeria et en Angola (Grubben 2004). En Asie, la sélection des variétés pratiquée pour la production de fibre (Inde, Sri Lanka, Thaïlande, Malaisie, île de Java) et aussi de calices destinés à l'utilisation alimentaire.

1.4. Variétés

Hibiscus sabdariffa L. se présente sous deux types : le type vert et le type rouge. Les calices du type vert sont utilisés comme condiment ou comme légume-feuille dans l'alimentation. Les calices de type rouge, plus connus, entre généralement dans la préparation des boissons, sirops, confitures, gelées et concentrés. Les calices rouges comprennent plusieurs variétés : Vimto, Koor, CLT92, Thaï, Bambara, Violette, Burkina, et Yoump (**Tableau 1**). Ces variétés présentent des différences morphologiques (diamètres, tailles des fruits, etc.), sensorielles (acidité, coloration, etc.) et chimiques (teneur en anthocyane) (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009).

Tableau 1 : Caractéristiques des variétés de Bissap cultivées au Sénégal (Cisse, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009)

Variétés	Morphologie	Dimensions calices (longueur/diamètre) (cm/cm)	Couleur calices	Rendement (kg calices sec/hectare)
Vimto	Sépales ouverts vers l'extérieur, droits, légèrement recourbé au sommet	8,5/4,5	Rouge sombre	500
Koor	Calices de forme conique	4,5/3,5	Rouge clair	250-300
Thaï	Arbre de grande taille (2m) Riche en fibre	4,5/3,5	Rouge clair	250-300
CLT 92	Arbre de taille moyenne	4,5/3,5	Rouge foncé, bleu violacé	250-300
Burkinabé	Calices de forme conique	4,5/3,5	Rouge	250
Yoump	Calices de forme conique	4,5/3,0	Rouge	250
Violette	hybride naturel entre les variétés Koor et Yoump	4,5/3,0	Violet	250

1.5. Pratiques agricoles

1.5.1. Culture et récolte

Hibiscus sabdariffa L. est cultivé au Sénégal pendant la saison des pluies sur un cycle de 130 jours. Le semis est fait entre Juillet et Août durant la saison des pluies à raison de 4 à 5 kg de graines par ha. Le semis se fait tantôt à la volée, tantôt en poquets. En général, le semis est direct à raison de 3 à 5 graines par poquet et à une profondeur de 2 à 3 cm. Certains producteurs font des semis en pépinières ombragées, qu'ils repiquent au champ au bout de 4 semaines environ (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009; Poublanc, Gomis, et Nugawela 2006)

Hibiscus sabdariffa L. répond bien aux engrais, et l'on a observé en Egypte que le sulfate d'ammonium donnait des rendements plus élevés que le nitrate de calcium ou l'urée. La production de calices est plus élevée lorsque l'engrais est apporté au moment du démarrage (20 à 30 jours après le semis) que lorsque les applications sont fractionnées et effectuées au cours du stade de développement végétatif et de la floraison. Mais, les engrais chimiques sont rarement utilisés en Afrique tropicale, parce qu'ils sont jugés onéreux dans les conditions climatiques incertaines de production de cette plante (Poublanc, Gomis, et Nugawela 2006).

La récolte du Bissap a lieu en Novembre-Décembre et la collecte des calices sur les marchés se déroule de décembre à mai. Au-delà du mois de Mai, les calices séchés perdent leur couleur et donc

leur valeur commerciale. Il est le plus souvent cultivé en lisière de champ ou en association avec d'autres cultures. La culture pure dans des conditions idéales peut donner des rendements de l'ordre de 700 à 800 kg de calices séchés par hectare et autant en graines. La moyenne de rendement devrait se situer au Sénégal autour de 200 à 250 kg ha⁻¹ en culture pure du fait que la plupart des paysans conduisent cette culture en mode extensif. Selon certaines informations, le ratio calices séchés/calices frais serait de 11 % (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009; Poublanc, Gomis, et Nugawela 2006). Les rendements de culture, en fonction des variétés, varient entre 250 à 1000 kg de calices séchés par hectare et autant en graines (Coly, Seck, et Mbaye 2005). Le rendement moyen en calices sec se situe autour de 250 kg ha⁻¹. Le rendement en calices au Sénégal est 6 fois plus faible qu'en Asie où les rendements sont en moyenne de 1500 kg de calices secs par hectare (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009). Cette différence est probablement liée à la généralisation de l'utilisation d'engrais en Asie. L'évolution de la production sénégalaise semble suivre celle des superficies puisque l'accroissement du rendement par hectare est relativement faible, voire nul, ce qui explique la faible vitesse d'accroissement de la production nationale. En d'autres termes, les superficies augmentent, alors que les pratiques agricoles ont peu évolué. Un simple apport d'engrais à une dose optimale et l'amélioration des pratiques agricoles pourraient rapidement augmenter de façon significative la production nationale.

Les travaux de récolte se font manuellement par une main d'œuvre essentiellement féminine. Les calices arrivés à maturité sont sectionnés de la plante, pour être ensuite décortiqués (séparation du calice et des graines) et séchés. Pour une même parcelle, on répète ces travaux de récoltes 2 à 3 fois tous les 10 jours pour assurer la récolte de calices de qualité à un stade optimum de maturité. De nouveaux outils ont récemment été introduits pour faciliter le décortilage.

1.5.2. Traitements post-récoltes

Les principales opérations réalisées sur les calices après récoltes sont le décortilage, le séchage et le conditionnement. Il est important que ces opérations se fassent par la suite dans un minimum de temps, et dans un environnement propre pour obtenir un produit de qualité (Cissé, Dornier, Sakho, Ndiaye, et al. 2009; Poublanc, Gomis, et Nugawela 2006)

Le décortilage est une opération manuelle, délicate et nécessitant une main-d'œuvre importante. Il consiste à prendre le fruit entre les deux mains puis à faire une incision verticale avec les deux pouces pour séparer la capsule et le calice. Il est souvent pénible et douloureux à cause de la pression à exercer sur les calices et la capsule et, pour certaines variétés, la présence de poils urticants gênants.

Certaines opératrices coupent la base pédonculaire de la fleur à l'aide d'un couteau pour libérer la capsule et obtenir un calice circulaire fermé. Cette méthode peut endommager la capsule qui s'ouvre partiellement et libère les graines. Des pertes par brisure des sépales supérieurs sont fréquentes avec le couteau. Pour réduire ces pertes, certaines paysannes ne décortiquent les fleurs que 24 h après la récolte. Les discussions menées auprès des producteurs ont mis en évidence un réel besoin de mécanisation de cette opération qui constitue un frein important au développement de la culture.

Le séchage permet de réduire l'humidité des calices de 86 % à 16 %, voire à 14 % pour une bonne conservation. Actuellement, le séchage des calices en milieu rural se fait par exposition directe au soleil sur des nattes, des tôles ou des toiles en plastique étalées directement sur le sol. Cette méthode présente des inconvénients majeurs : risque important de contamination microbienne, présence de sable et de débris divers, dégradation des anthocyanes. La durée du séchage est de 6 à 8 jours. Pour se plier aux exigences des collecteurs et transformateurs, des soins doivent être apportés lors du séchage en vue d'obtenir des produits contenant le moins possible de corps étrangers (brindilles, sable, feuilles, etc.). Un système de séchage sur claies fabriquées à partir de sacs tissés en propylène a été testé lors de la campagne 2006 par l'ASNAPP-Sénégal (Agribusiness in Sustainable Natural African Plant Products) dans le village de Thiaré, département de Nioro du Rip de la région de Kaolack (**Figure 2**).



Figure 2 : Claire de séchage des calices de Bissap. (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009)

1.6. Composition de la plante d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Les tableaux 2, 5 et 7 présentent la composition physico-chimique et biochimique des calices, des feuilles et des graines de Bissap

La composition des calices diffère selon le pays de culture de ce fruit. Cette variabilité de la composition est liée à plusieurs facteurs tels que la pluviométrie, la nature des sols et la température. Les teneurs en différents éléments peuvent varier considérablement d'un élément à l'autre selon le pays (**Tableaux 2, 3 et 4**).

La variabilité régionale observée au niveau des calices se retrouve également au niveau des feuilles (**Tableaux 5 et 6**). Des différences plus ou moins grandes sont observées pour un même élément selon la région de culture. Par exemple, les teneurs en phosphore et en fer sont respectivement de 40 et 5,40 mg/100g pour les feuilles des Philippines alors qu'elles sont de 273,20 et 8,98 mg/100g pour les feuilles de Guatemala (Morton 1987).

Les graines de Bissap sont riches en oligoéléments et présentent aussi un profil en acide gras très varié (**Tableaux 7, 8, 9 et 10**).

Tableau 2 : Composition générale des calices de Bissap (g/100g)

Références	Paramètres						
	Eau	Glucides	Lipides	Protéines	Fibres	Anthocyanes	Cendes
(Charlotte 1974; Cissé, Dornier, Sakho, Ndiaye, et al. 2009; D'Heureux-Calix et Badrie 2004; Morton 1987; Wong et al. 2002)	84,5-89,5	3,3-12,3	0,1-3,9	0,9-17,9	2,5-12,0	0,15-1,5	4,5-6,8

Tableau 3 : Composition minérale des calices de Bissap

Références	Minéraux (mg/100g)											
	Fe	Cu	Cr	Zn	Ni	Ca	Mn	Al	Pb	P	K	Na
(Bahemuka et Mubofu 1999; Charlotte 1974; Maiga et al. 2005)	37,8-40	0,6	0,6	3,7-6,5	0,31	1583	24	-	0,18	-	2060	5,5

Tableau 4 : Composition en acides aminés des calices de Bissap

Références	Acides aminés (mg/g)																			
	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
(Morton 1987)	3,7	3,6		16,3	1,3	7,2	-	3,8	1,5	3,0	5,0	3,9	1,0	3,0	5,6	3,5	3,0	-	2,2	3,8
(Glew et al. 1997)	3,46	4,48		10,50	0,87	8,85	-	2,47	1,19	2,70	4,21	2,77	0,65	2,32	5,82	-	2,36	0,45	1,44	3,33

Tableau 5 : Composition générale des feuilles de Bissap (g/100g)

Références	Eau	Glucides	Lipides	Protéines	Fibres	Cendres
(Morton 1987)	86,2-89,2	10,0	1,1-2,6	1,1-1,7	12	1,0-6,9
(Woot - Tsuen Wu Leung 1968)	85,6	9,2	0,3	3,3	1,6	-

Tableau 6 : Compositions en minéraux et en vitamines des feuilles de Bissap (mg/100g)

Références	Minéraux			Vitamines			
	Fe	Ca	K	Thiamine (Vitamine B1)	Riboflavine (Vitamine B2)	Niacine (Vitamine B3)	Acide ascorbique (Vitamine C)
(Morton 1987)	5,4-9,0	1,3-18,0	40,0-273,2	0,1	0,3	3,8	6,7
(Woot - Tsuen Wu Leung 1968)	4,8	213,0	93,0	0,2	0,5	1,2	54

Tableau 7 : Composition générale des graines de Bissap (g/100g)

Références	Eau	Glucides	Lipides	Protéines	Fibres	Cendres totaux
(El-Adawy et Khalil 1994; Babalola 2001b; Morton 1987)	5,6-12,9	23,6-51,7	16,0-23,3	19,6-31,0	1,2-16,8	4,8-7,0

Tableau 8 : Composition minérale des graines de Bissap

Références	Eléments minéraux (mg/100g)						
	Fe	Zn	Ca	Mn	Mg	K	Na
(Jirovetz et al. 1992)	8,8-9,1	5,5-5,9	590-680	3,9-4,1	420-480	1300-1390	590-680

Tableau 9 : Composition en acides aminés des graines de Bissap

Références	Acides aminés (mg/g)																			
	Ala	Arg	Asn	Asp	Cys	Gln	Glu	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val
(Jirovetz et al. 1992)	4,37	10,58	-	10,64	2,65	22,47	-	4,69	2,35	3,25	6,80	5,51	1,25	5,18	3,72	4,48	3,8	0,51	3,46	3,57

Tableau 10 : Composition moyenne en acides gras des graines de Bissap

Références	Acides gras		Pourcentage dans les lipides totaux (g/100g)
(Mohamed et al. 2007; Glew et al. 1997; Abu-Tarboush, Ahmed, et Al-Kahtani 1997; El-Adawy et Khalil 1994)	C14 : 0	Acide myristique	0,31
	C16 : 0	Acide palmitique	21,65
	C16 : 1	Acide palmitoléique	0,44
	C18 : 0	Acide stéarique	5,47
	C18 : 1	Acide oléique	30,90
	C18 : 2	Acide linoléique	39,16
	C18 : 3	Acide γ -linoléique	0,57
	C20 : 0	Acide arachidonique	0,72
	C20 : 1	Acide éicosanoïque	0,08
	C20 : 3	Acide éicosatriénoïque	0,34
C22 : 0	Acide béhénique	0,37	

2. Les polyphénols

2.1. Classification

Les polyphénols (8000 composés) représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne animal. On y trouve :

- les flavonoïdes (flavanols, flavanoïdes, chalcones et dihydrochalcones, anthocyanidines et tannins condensés) ;
- les acides phénoliques de type benzoïque ou cinnamiques et les tannins hydrolysables (gallo- et ellagitannins) ;
- les stilbènes ;
- les lignines et subérines.

Les polyphénols peuvent être subdivisés en de nombreuses classes (**Tableau 11**) qui se différencient d'abord par la complexité du squelette de base (allant de C₆ à des formes très polymérisées), ensuite par le degré de modification de ce squelette (degré d'oxydation, d'hydroxylation, de méthylation), enfin par les liaisons possibles de ces molécules de base avec d'autres molécules (glucides, lipides, protéines, autres métabolites secondaires pouvant être ou non phénoliques) (Sarni-Manchado et Cheynier 2006).

Tableau 11 : Principales classes de composés phénoliques (Harborne 1989)

Squelette carboné	Classe	Exemples	Origine (exemples)
C ₆	Phénols simples	Catéchol	Nombreuses espèces
C ₆ -C ₁	Acides hydrobenzoïques	p-hydrobenzoïque	Epices, fraises
C ₆ -C ₃	Acides hydrocinnamiques Coumarines	Acide caféique Scopolétine	Pomme de terre, pomme, Citrus
C ₆ -C ₄	Naphtoquinones	Juglone	Noix
C ₆ -C ₂ -C ₄	Stilbènes	Resvératrol	Vignes
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoïdes Isoflavonoïdes	Quercétine, cyanidine Daidzéine	Fruits, légumes, fleurs, soja, pois
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C ₆ -C ₃) _n	Lignines		Bois, fruits à noyau
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tannins condensés		Raisin, kaki

Les flavonoïdes sont les polyphénols les plus abondants dans les aliments. Ce groupe est composé de nombreuses molécules ayant en commun une structure de base à 15 atomes de carbones (C₆-C₃-C₆). Ils comprennent plus de 10 classes jouant d'importants rôles biologiques

et technologiques. Parmi ces composés on retrouve notamment les anthocyanes (anthocyanidines et anthocyanines), les flavonols et les flavanes (**Figure 3**).

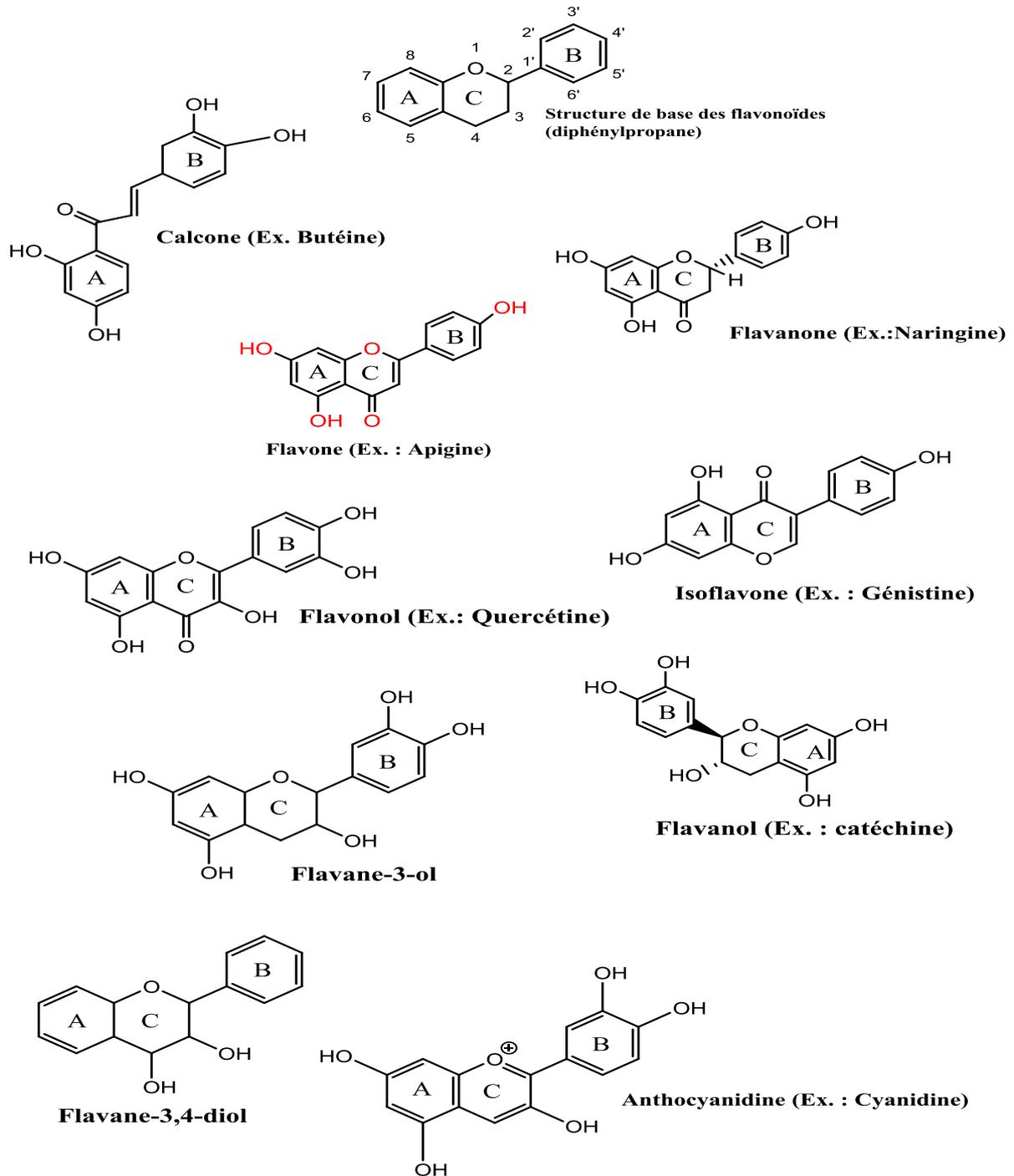


Figure 3 : Principales classes de flavonoïdes (Sarni-Manchado et Cheynier 2006)

2.2. Les polyphénols dans les plantes

Les polyphénols sont largement présents dans de nombreux produits alimentaires. Ils leur confèrent de nombreuses propriétés sensorielles (couleur, goût, etc) et technologiques. La répartition dans les produits végétaux est très variable (**Tableau 12**). On les retrouve dans les racines, les tiges, les feuilles, dans les fruits mais aussi au niveau des fleurs comme dans le cas du Bissap.

Tableau 12 : Principaux polyphénols retrouvés dans les plantes

Plantes	Noms scientifiques	Composés phénoliques	Références
Maïs, complet	<i>Zea mays L.</i>	acide férulique	(de la Parra, Saldivar, et Liu 2007)
Riz complet	<i>Oryza sativa L.</i>	acide vanilique	(Kato et al. 1983)
Cacao, poudre	<i>Theobroma cacao L.</i>	(-)-Epicatéchine	(Gu et al. 2006)
Raisin	<i>Vitis vinifera L.</i>	Acide caféyltartrique	(Karadeniz, Durst, et Wrolstad 2000)
Pruneau	<i>Prunus domestica L.</i>	3-acide caféylquinique	(Nakatani et al. 2000)
Dattes séchées	<i>Phoenix dactylifera L.</i>	acide férulique	(Al-Farsi et al. 2005)
Myrtille commune	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>	Quercétine	(Ehala, Vaher, et Kaljurand 2005)
Mûre (Ronce)	<i>Rubus sp.</i>	Cyanidine 3-O-xyloside	(Cho et al. 2004)
Framboise rouge	<i>Rubus idaeus L.</i>	Cyanidine 3-O-sophoroside	(Määttä-Riihinen, Kamal-Eldin, et Törrönen 2004)
Groseille	<i>Ribes rubrum L.</i>	(+)-Gallicatéchine	(Arts, van de Putte, et Hollman 2000)
Fraise, crue	<i>Fragaria L.</i>	Pélagonidine 3-O-glucoside	(S. Y. Wang, Zheng, et Galletta 2002)
Citron	<i>Citrus limon (L.) Burm. f.</i>	Hespérétine	(Mattila, Astola, et Kumpulainen 2000)
Orange (Blonde)	<i>Citrus sinensis (L.) Osbeck</i>	Hespérétine	(Justesen, Knuthsen, et Leth 1998)
Abricot, cru	<i>Prunus armeniaca L.</i>	(-)-Epicatéchine	(Dragovic-Uzelac et al. 2005)
Pêche, entière	<i>Prunus persica var. persica (L.) Batsch</i>	5-Acide caféoylquinique	(Möller et Herrmann 1983)
Prune, fraîche	<i>Prunus domestica L.</i>	Cyanidine 3-O-rutinoside	(Chun, Kim, et Lee 2003)

Cerise acide	<i>Prunus cerasus L.</i>	Cyanidine 3-O-glucosyl-rutinoside	(H. Wang et al. 1997)
Melon	<i>Cucumis melo L.</i>	Lutéoline	(Lugasi et Hovari 2002)
Pastèque	<i>Citrullus lanatus</i>	Lutéoline	(Lugasi et Hovari 2002)
Datte, fraîche	<i>Phoenix dactylifera L.</i>	acide férulique	(Al-Farsi et al. 2005)
Pomme [Cidre], entière	<i>Malus pumila P. Mill.</i>	Quercétine 3-O-arabinoside	(Price et al. 1999)
Poire, entière	<i>Pyrus communis L.</i>	5-Acide Caféoylquinique	(Möller et Herrmann 1983)
FRUITS TROPICAUX			
Banane, crue	<i>Musa L.</i>	(+)-Catéchine	(Méndez et al. 2003)
Corossol	<i>Annona reticulata L.</i>	(-)-Epicatéchine	(de Pascual-Teresa, Santos-Buelga, et Rivas-Gonzalo 2000)
Kiwi	<i>Actinidia chinensis Planchon</i>	(-)-Epicatéchine	(Arts, van de Putte, et Hollman 2000)
Néfle du Japon	<i>Eriobotrya japonica (Thunb.) Lindl.</i>	5-Acide Caféylquinique	(Ding et al. 2001)
Mangue	<i>Mangifera indica L.</i>	(+)-Catéchine	(Arts, van de Putte, et Hollman 2000)
Kaki, frais	<i>Diospyros kaki L. f.</i>	(+)-Catéchine	(de Pascual-Teresa, Santos-Buelga, et Rivas-Gonzalo 2000)
Ananas	<i>Ananas comosus (L.) Merr.</i>	Syringarésinol (lignane)	(Peñalvo et al. 2005)
Grenade	<i>Punica granatum L.</i>	(+)-Catéchine	(de Pascual-Teresa, Santos-Buelga, et Rivas-Gonzalo 2000)
Fraise, confiture	<i>Fragaria x ananassa Duchesne (pro sp.)</i>	Pélargonidine 3-O-glucoside	(Garcia-Viguera, Zafrilla, et Tomás-Barberán 1997)

2.3. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des flavonoïdes très abondants dans l'alimentation humaine par le biais des fruits, des légumes et des produits céréaliers (G. Mazza et Miniati 1993). Ils se distinguent des autres flavonoïdes par la propriété de charge positive de l'ion Flavylium (R Brouillard 1982; G. Mazza et Miniati 1993). Les anthocyanes sont responsables de la plupart des couleurs rouges, bleues et violettes des fruits, légumes, fleurs, et d'autres tissus ou produits végétaux. Ils sont particulièrement abondants dans les baies et autres fruits avec la couleur rouge, bleue ou violette, et dans les vins rouges (G. Mazza et Miniati 1993). A ce jour, il a été identifié approximativement 550 anthocyanes (Andersen et Jordheim 2006; Mateus et al. 2001; Wrolstad 2000).

Les anthocyanes sont d'un intérêt nutritionnel considérable car ils joueraient un rôle important dans la promotion de la santé et la prévention de certaines maladies (Katsube et al. 2003; Kamei et al. 1995). Les anthocyanes sont connues pour leur capacité à améliorer les facteurs de risque pour les maladies cardio-vasculaires, pour la prévention de l'obésité, pour leurs propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses, l'amélioration de la vision, ainsi que pour d'autres activités biologiques (Esselen et al. 2011; Feng et al. 2010; Hou et al. 2005).

2.3.1. Caractéristiques structurales

Les anthocyanidines sont les structures de base des anthocyanes (**Figure 4**). Les anthocyanes (ou aglycones) sont constitués d'un cycle aromatique [A] lié à un hétérocycle [C] qui contient de l'oxygène, qui est également lié par une liaison carbone-carbone à un troisième cycle aromatique [B].

Les six anthocyanidines les plus couramment rencontrées dans les plantes sont classées en fonction de la position des groupements hydroxyl et méthoxyl sur le noyau du cycle B et sont appelées cyanidine, delphinidine, péonine, pétunidine, la pélargonidine et malvine (**Figure.5**). L'anthocyanidine le plus abondant dans la nature est la cyanidine, présente dans 90 % des fruits (G. J. Mazza et Colin 2008). Les anthocyanes sont des glucosides ou des acylglycosides polyhydroxylés ou polyméthoxylés, qui sont des dérivés oxygénés du 2-phenylbenzopyrilium ou sels de flavylium (**Tableau 13**). La différence de couleur des anthocyanes est largement déterminée par le type de substitution du cycle B de l'aglycone, le type de glycosilation, le degré et la nature de l'estérification du sucre avec les acides aliphatiques ou aromatiques, et la présence de copigmentation (R Brouillard 1982; Raymond Brouillard 1988; G. Mazza et Brouillard 1990; G. Mazza et Miniati 1993; G. Mazza, Cacace, et Kay 2004).

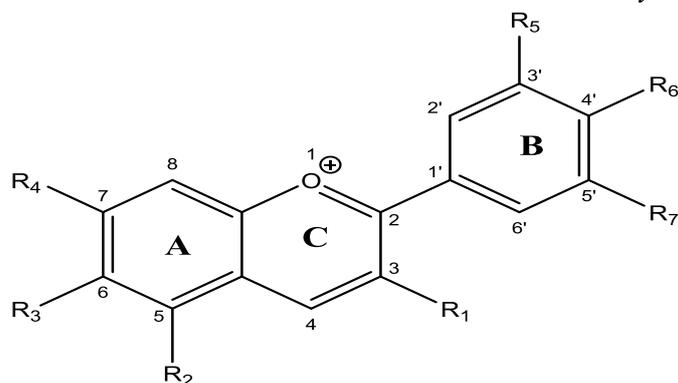


Figure 4 : Structure générale des anthocyanidines

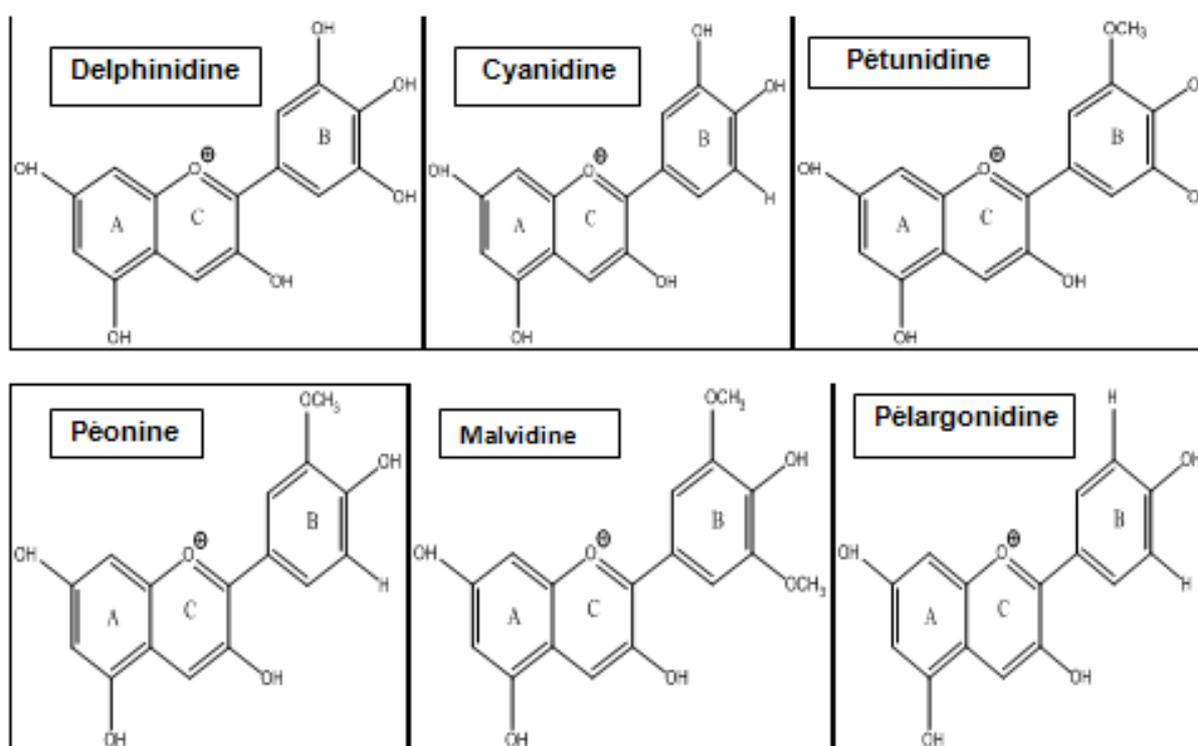


Figure 5 : Les six anthocyanidines les plus abondants dans la nature

Une caractéristique particulière des anthocyanes est qu'elles subissent une transformation moléculaire réversible par variation de pH. La molécule est incolore à pH 4,5, alors qu'elle forme une coloration rouge intense du flavylium à faible pH, et une forme quinoïdale bleue relativement instable est générée à des pH élevés. L'acylation et la position du groupement glycosique affectent aussi le pH auquel ce changement moléculaire apparaît (R Brouillard 1982; G. Mazza et Miniati 1993). La compréhension des caractéristiques moléculaires des anthocyanes est importante pour leur identification dans les liquides biologiques et les tissus

Tableau 13 : Identification structurale des anthocyanidines (Castañeda-Ovando et al. 2009)

Nom (abréviation)	Types de substitution							Coloration
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	
Apigéninidine (Ap)	H	OH	H	OH	H	OH	H	-
Arrabidine (Ab)	H	H	OH	OH	H	OH	OMe	-
Aurantinidine (Au)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	-
Capensinidine (Cp)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OMe	Bleu-rouge
Carajurine (Cj)	H	H	OH	OH	H	OMe	OMe	
Cyanidine (Cy)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Orange-rouge
Delphinidine (Dp)	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Bleu-rouge
Europinidine (Eu)	OH	OMe	H	OH	OMe	OH	OH	Bleu-rouge
Hirsutidine (Hs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	OMe	Bleu-rouge
3'-HydroxyAb (3'OHAb)	H	H	OH	OH	OH	OH	OMe	-
6-HydroxyCy (6OHCy)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Rouge
6-HydroxyDp (6OHDp)	OH	OH	OH	OH	OH	OH	OH	Bleu-rouge
6-HydroxyPg (6OHPg)	OH	OH	OH	OH	H	OH	H	-
Lutéoline (Lt)	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	-
Malvidine (Mv)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Bleu-rouge
5-MethylCy (5-MCy)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	H	Orange-rouge
Pélagonidine (Pg)	OH	OH	H	OH	H	OH	H	-
Péonidine (Pn)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Orange-rouge
Pétunidine (Pt)	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Bleu-rouge
Pulchellidine (Pe)	OH	OMe	H	OH	OH	OH	OH	Bleu-rouge
Riccionidin A (RiA)	OH	H	OH	OH	H	OH	H	-
Rosinidine (Rs)	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	H	Rouge
Tricétinidine (Tr)	H	OH	H	OH	OH	OH	OH	Rouge

2.3.2. Propriétés bioactives

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont montré que les anthocyanines présentent un large éventail d'activités biologiques y compris des propriétés antioxydantes (Duan et al. 2007; G. J. Mazza et Colin 2008), anti-inflammatoires and anti-carcinogènes (Kamei et al. 1995; Katsube et al. 2003); une amélioration de la vision (Matsumoto et al. 2003; Mercier et al. 1965); une induction de l'apoptose (Katsube et al. 2003); des effets neuroprotectifs (Kang et al. 2006). En plus, les anthocyanes ont montré divers effets sur les cellules, les vaisseaux sanguins (Andriambelason et al. 1998), les plaquettes (Demrow, Slane, et Folts 1995; Morazzoni et Magistretti 1990) et peuvent réduire les risques de maladies coronariennes (Renaud et de Lorgeril 1992).

Cependant, il faut noter que la plupart des études sur la prévention des maladies par les anthocyanes et les autres polyphénols sont issues d'expériences in-vitro ou sur des animaux. Ces derniers sont traités avec des doses plus élevées que celles qui sont observées dans l'alimentation humaine (G. J. Mazza et Colin 2008).

2.3.3. Stabilité des anthocyanes

Les anthocyanes isolées présentent une forte instabilité et sont susceptibles d'être dégradées (Giusti et Wrolstad 2003). Leur stabilité est affectée par plusieurs facteurs tels que le pH, la température de stockage, leur structure chimique, la concentration, la lumière, les solvants, la présence d'enzymes, les flavonoïdes, les protéines et les ions métalliques (M. Rein 2005). La stabilisation chimique des anthocyanes est l'objectif principal des récentes études en raison de leurs nombreuses applications potentielles, leurs effets bénéfiques et leur utilisation comme alternative aux colorants artificiels.

2.3.3.1. Effet du solvant

Les récentes études avec différentes solutions (acétonitrile: eau, éthanol, propylenglycol, dioxane et 2-butanone) ont montré que les changements de couleur dépendent du solvant et de la concentration du sel de flavylium. Dans les solvants protiques les sels de flavylium présentent une coloration rouge, tandis que dans les solvants aprotiques les solutions sont de couleur jaune. Cela s'expliquerait par le fait que les espèces rouges et jaunes correspondent respectivement à un monomère et à un dimère; par conséquent, pour une concentration croissante de sels de flavylium, la coloration rouge est favorisée. En outre, il a été observé que lorsque l'on augmente la proportion d'eau, dans le mélange acétonitrile/eau, le monomère est transformé en dimère de couleur verte. Ainsi, l'eau joue un rôle fondamental dans la dimérisation des sels flavylium du fait que ces molécules ont besoin de neutraliser leurs

répulsions électrostatiques avec des molécules d'eau pour que la dimérisation puisse être réalisée (Castañeda-Ovando et al. 2009).

2.3.3.2. Effet des enzymes

En présence d'autres polyphénols, les anthocyanes sont dégradés par voie enzymatique par les polyphénols oxydases (PPO). Ces enzymes peuvent être inactivées par chauffage doux et donc certains auteurs ont signalé que l'inclusion d'une étape de blanchiment (de chauffage à environ 50 °C) peut avoir un effet positif sur la stabilité enzymatique des anthocyanes. Skrede et al. (2000) ont démontré que l'addition d'un extrait de purée de myrtille blanchie dans un jus de myrtille jus n'a entraîné aucune dégradation des anthocyanes, tandis que l'addition d'un extrait non blanchies a provoqué une perte de 50 % des anthocyanes (Skrede, Wrolstad, et Durst 2000); ce qui suppose l'activité des enzymes dans la dégradation des anthocyanines.

2.3.3.3. Effet du pH

Le pH est le premier facteur agissant sur le changement de couleur d'un anthocyane donné. La variation de structure de l'anthocyane en fonction du pH est une particularité de ces molécules. Les observations visuelles d'une solution aqueuse d'anthocyanes montrent la forte coloration rouge d'une solution à pH très acide, coloration qui décroît quand le pH augmente vers la neutralité. Une solution neutre d'anthocyanes fraîchement préparée est bleue mais se décolore rapidement. Ces changements de couleur sont dûs à des équilibres chimiques entre différentes formes que peut prendre l'anthocyane (R Brouillard 1982). A pH 1, la cation flavylum est l'espèce prédominante et contribue à la coloration pourpre ou rouge. Pour des pH compris entre 2 et 4, les espèces prédominantes sont des quinoïdes bleues. A des pH de 5 à 6, seulement deux espèces incolores peuvent être observés, qui sont une pseudobase carbinol et une chalcone. A des pH supérieurs à 7, les anthocyanes sont dégradés en fonction de leurs groupes substituants. A des pH de 4 à 6, quatre formes structurelles des anthocyanes coexistent : le cation flavylum, la base anhydre quinoïde, la base de carbinol incolore et la chalcone jaune pâle (**Figure 6**). (R Brouillard 1982; Castañeda-Ovando et al. 2009).

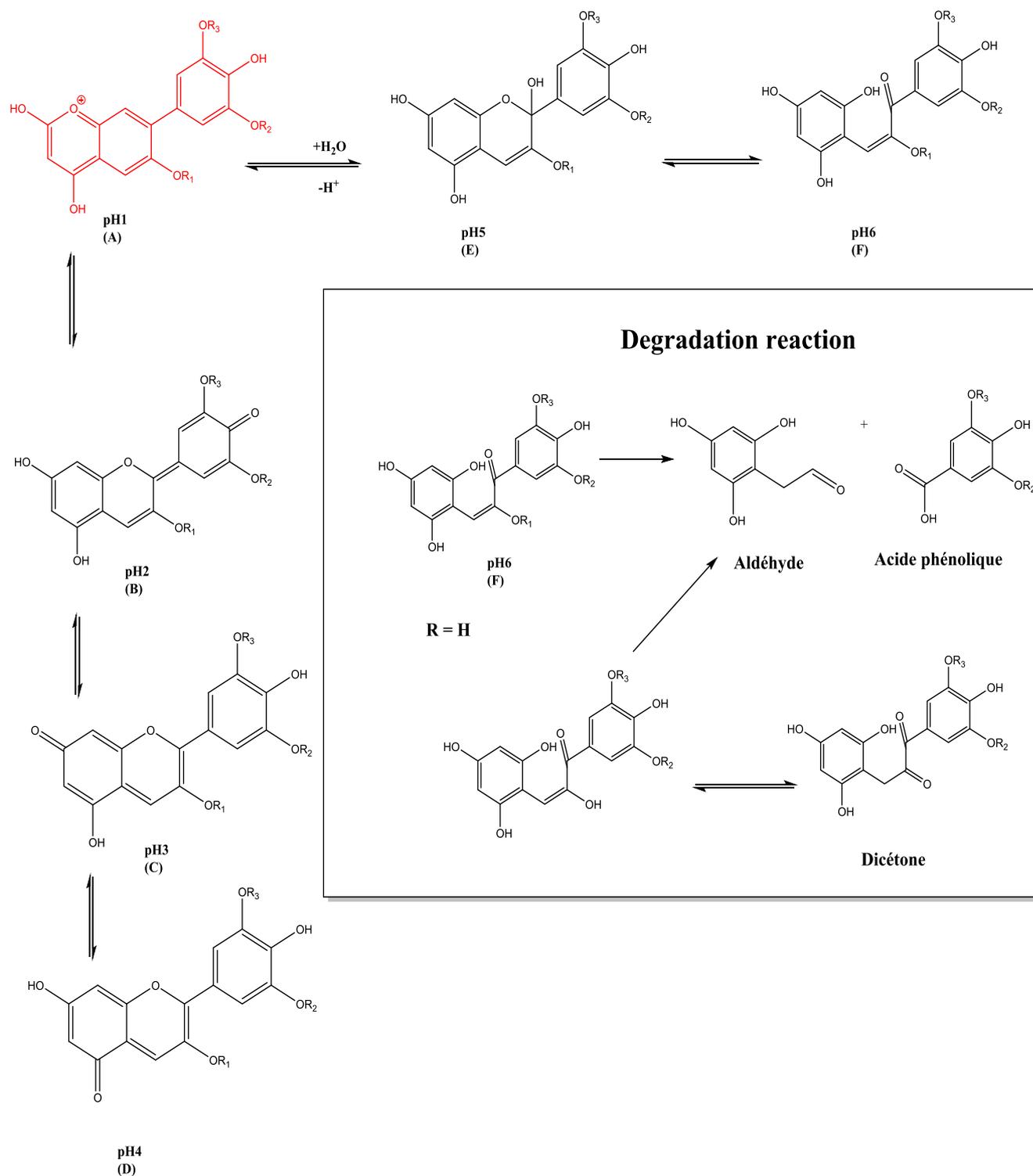


Figure 6 : Dégradation des anthocyanes en fonction du pH et produits de dégradation des anthocyanes. $R_1 = H$ ou un sucre ; R_2 et $R_3 = H$ ou méthyl (Castañeda-Ovando et al. 2009)

2.3.3.4. Effet de la copigmentation

La copigmentation est un phénomène dans lequel les pigments et autres composés organiques incolores, ou des ions métalliques, forment des associations moléculaires ou complexes, générant un changement ou une augmentation de l'intensité de la couleur (Boulton 2001). En sciences des aliments, ce phénomène est considéré comme une interaction très importante parce que la couleur est l'un des principaux facteurs de qualité essentiels dans l'acceptation du produit (Eiro et Heinonen 2002).

Certaines études soutiennent que la copigmentation des anthocyanines avec d'autres composés (copigments) est le principal mécanisme de stabilisation de la couleur dans les plantes (Davies et Mazza 1993; G. Mazza et Brouillard 1990). Les copigments sont des systèmes riches en π -électrons qui sont en mesure d'associer avec des ions flavylium, qui sont plutôt pauvre en électrons. Cette association offre une protection contre l'attaque nucléophile de l'eau dans la position 2 de l'ion flavylium (Matsufuji et al. 2003) et pour d'autres espèces telles que des peroxydes et de dioxyde de soufre dans la position 4 (Garcia-Viguera et Bridle 1999; G. Mazza et Brouillard 1987). Les copigments sont généralement incolores, mais lorsqu'ils sont mélangés avec une solution anthocyanique, une interaction est réalisée en produisant un effet hyperchrome et un déplacement bathochrome dans le spectre d'absorption UV-Visible. L'effet hyperchrome signifie une augmentation de l'intensité de la couleur, alors que le déplacement bathochrome correspond à un décalage de la longueur d'onde de l'absorbance maximale. Les copigments peuvent être des alcaloïdes, des flavonoïdes, des acides aminés, des acides organiques, des nucléotides, des polysaccharides, des métaux ou un autre anthocyane. Les acides phénoliques tels que l'acide férulique et l'acide syringique ont également été identifiés pour former des complexes avec les anthocyanes dans la fraise et le jus de framboise (M. Rein 2005). La copigmentation des anthocyanes est influencée par de nombreux facteurs tels que la température, le pH et les radiations UV. Par exemple, Bakowska et al. (2003) montrent que l'effet maximum de la copigmentation de la cyanidine-3-glucoside a été observée à pH 3,5 et l'influence de la dégradation du complexe cyanidine-copigment par l'irradiation UV était plus forte lorsque la température atteint 80 ° C (Bakowska, Kucharska, et Oszmiański 2003).

2.3.3.5. Formation de complexe avec les métaux

La variété des couleurs des fleurs a été expliquée dans un premier temps par la formation de chélates entre les métaux et les sels de flavylium (Clifford 2000). Certaines études sur la stabilité de la couleur dans les plantes, laisse penser que la coloration bleue des plantes est due à une complexation entre les anthocyanes et les métaux. En effet, une des principales

caractéristiques des anthocyanes et anthocyanidines avec des groupes o-di-hydroxy dans le cycle B (Cy, Dp, Pt), est leur capacité à former des complexes métalliques anthocyanes (Boulton 2001). Certaines études sur la stabilité de la couleur dans les plantes, donnent à penser que la coloration bleue est due à une complexation entre les anthocyanes et certains métaux tels que Al, Fe, Cu et Sn (Starr et Francis 1973) ou Mg et Mo (Hale, McGrath, et Stack 2001) (**Figure7**). Malgré le peu d'intérêt dans l'industrie alimentaire sur les complexes anthocyanine-métal, cette interaction constitue une alternative viable pour la stabilisation de la couleur particulièrement si les métaux concernés n'impliquent pas un risque pour la santé.

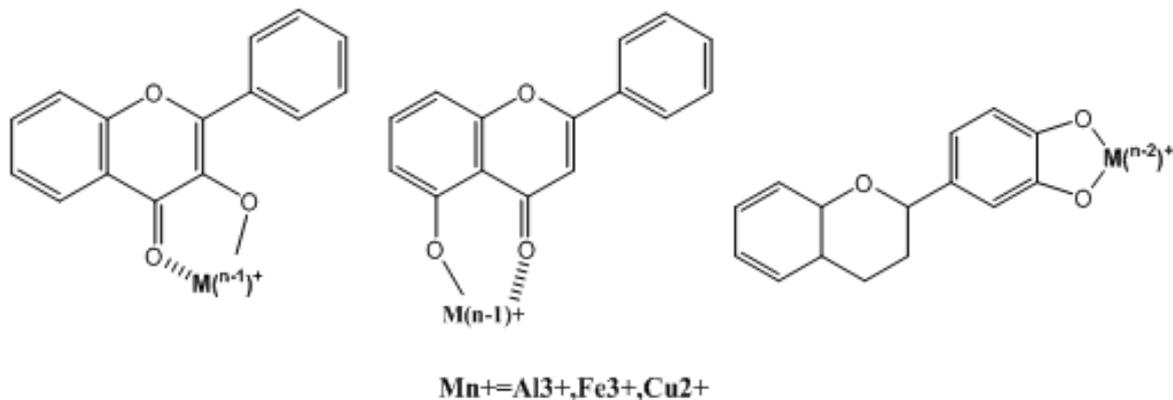


Figure 7 : Complexation métallique des flavonoïdes (Dangles 2006)

2.3.3.6. Effet de la température

Les procédés de traitement thermique des aliments consistent généralement à un chauffage à des températures allant de 40 à 150 °C en fonction du pH du produit et de la durée de vie souhaitée. Cependant, les anthocyanes sont des composés chimiques qui présentent une forte sensibilité à l'élévation de la température. Plusieurs auteurs ont montré que l'effet de la température sur la dégradation des anthocyanes est associé à d'autres paramètres intrinsèques du produit tels que le pH, la température de stockage, la structure chimique et la concentration des anthocyanes, la présence de lumière, l'oxygène, la présence d'enzymes, les protéines et les ions métalliques (G. A. Garzón et Wrolstad 2001; M. J. Rein et al. 2005). Les hautes températures favorisent l'ouverture de l'hétérocycle et la formation de chalcones qui sont incolores. La dégradation des chalcones conduit ensuite à la formation d'acide carboxylique provenant du cycle B et à des carboxyaldéhydes issues du noyau A de l'anthocyanane de départ. La déglycosilation peut se produire à des températures avoisinant les 100 °C ou par réaction enzymatique. La coumarine glycoside, l' α -dicétone et le phloroglucinol ont été identifiés comme étant des produits de dégradation des anthocyanes (Sarni-Manchado et Cheynier

2006). La dégradation thermique des anthocyanes suit une cinétique du premier ordre (Kara et Erçelebi 2013; Chisté, Lopes, et De Faria 2010; Harbourne et al. 2008).

2.3.4. Extraction des anthocyanes

L'extraction des anthocyanes reste un procédé technologique délicat dans la fabrication des colorants anthocyaniques (E163). L'instabilité de ces molécules en solutions neutres ou alcalines implique que les procédés technologiques d'extraction utilisent impérativement des solvants aqueux acidifiés qui ont pour fonction outre de fragiliser les structures membranaires des cellules mais aussi de favoriser la diffusion des formes flavylium plus stables.

Sur le marc de raisin, différents solvants d'extraction (méthanol, éthanol, eau) acidifié par différents acides (acétique, citrique, tartrique, propionique, formique et hydrochlorique) ont été testés. Le méthanol acidifié est cinq fois plus efficace que l'éthanol et sept plus efficace que l'eau (Hang 1988). Les industries agroalimentaires n'utilisent pas le méthanol comme solvant d'extraction mais l'éthanol acidifié avec l'acide chlorhydrique (même si ce solvant est plus difficile à concentrer en raison de son point d'ébullition plus élevé) ou encore des solutions aqueuses contenant du SO₂ (Jackman, Yada, et Tung 1987). Le SO₂, outre son rôle d'agent réducteur, protégeant les anthocyanes des oxydations, solubilise les anthocyanes par formation d'un complexe entre l'anthocyane et l'ion HSO₃⁻ en les dissociant des macromolécules telles que les pectines, cellulose et protéines. Gao et al. (1996) supposent aussi que le SO₂ améliore la diffusion des anthocyanes à travers la paroi des cellules et augmente ainsi la solubilité des pigments (Gao et Mazza 1996).

L'extraction des anthocyanes dépend aussi des paramètres tels que le ratio solvant/solide, la température utilisée. Cacace et Mazza (2002) ont montré que plus le ratio solide/solvant était grand et meilleure était l'extraction des anthocyanes. Une augmentation de température entraîne généralement une diminution de la viscosité, augmentant ainsi significativement la diffusion des molécules dans le solvant (Cacace et Mazza 2002). Mais l'élévation de la température d'extraction avec de l'eau sulfitée de 20 à 80 °C conduit à une diminution du taux d'anthocyanes. Ils recommandent plutôt d'extraire les anthocyanes de cassis avec une température comprise entre 30° et 35 °C afin d'éviter la dégradation thermique.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Matériel végétal

Quatre variétés de calices d'*Hibiscus sabdariffa* L. sont collectées dans 5 régions du Sénégal (**Figure 8**). Il s'agit des régions de Kaolack et de Fatick située au centre, de Thiès à l'Ouest, de Louga au Nord et de Ziguinchor au Sud du Sénégal.



Figure 8 : Les zones d'échantillonnage des calices de Bissap

Les enquêtes préliminaires réalisées au cours du projet AFTER ont permis de déterminer les grandes zones de culture de calices de Bissap. Les échantillons sont prélevés au point de vente et chez les producteurs ciblés pendant les enquêtes. Une masse de 1 kg de calices est prélevée, emballée dans des sacs en plastique, puis les échantillons sont étiquetés. Selon la disponibilité de la matière première, deux à quatre variétés sont prélevées par régions. Six échantillons de chaque variété ainsi obtenus (**Tableau 14**).

Tableau 14 : Zones de prélèvement et nombres d'échantillons pour chaque variété de calices de Bissap

Variété	Zones de prélèvement et nombre d'échantillons					Total
	Kaolack	Fatick	Ziguinchor	Thiès	Louga	
Koor	6	6	6	6	6	30
Vimto	6	6	6	6	6	30
Thaï	6	6	6	-	6	24
CLT92	6	-	6	-	-	12

1.2. Echantillonnage des boissons et sirops de Bissap

En ce qui concerne les boissons et les sirops produits par des entreprises locales, des échantillons de 1 litre ont été prélevés, transportés dans des glacières puis congelés à -24 °C en vue de leurs analyses.

2. Méthodes

2.1. Extraction aqueuse des calices

Le matériel végétal est constitué de calices secs de Bissap de variété Vimto produits au Sénégal dans la région de Kaolack. L'extraction aqueuse est réalisée par macération à environ 25 °C avec un ratio calice-eau de 1/5 pour une durée de 4 heures. Par agitation, ce mélange est homogénéisé toutes les demi-heures pour augmenter le rendement d'extraction des pigments anthocyaniques. Une filtration sur tamis en acier inox de diamètre 0,2 mm permet d'éliminer les calices épuisés de Bissap. Ensuite, l'utilisation de poche filtrante en polyester de porosité 0,45 µm permet de compléter la filtration. Ces extraits sont stockés dans des bacs en plastiques et conservés dans une chambre froide à 4 °C en vue de leur utilisation pour la production de concentrés.

2.2. Procédé d'évaporation sous vide des extraits aqueux des calices

2.2.1. Description du pilote d'évaporation

La boule de concentration a une capacité de 9 L. Elle fonctionne avec des pressions comprises entre -1 et 5 bars en valeur absolue. Les températures de service varient entre 5 et 110 °C. Le diamètre intérieur de la partie sous pression mesure 296 mm avec une hauteur de 185 mm. L'appareil utilise de l'eau à l'état liquide comme fluide de chauffage (**Figure 9**).

La boule de concentration est constituée :

- d'un couvercle : 1 fond GRC Ø 250 EP 3 mm tôle laminée emboutie à froid.
- d'une virole cylindrique formé en inox laminé (Diamètre : 250, Hauteur : 300 mm)
- d'un fond hémisphérique de 250 mm de diamètre.
- d'une double enveloppe cylindrique en tôle laminée de 300 mm de diamètre permettant de chauffer le produit au moyen d'un bain-marie sous une pression de 5 bars maximum.
- d'un calorifuge cylindrique isolant l'environnement immédiat de la zone chaude. Avec un diamètre de 336 mm, il est fabriqué en tôle laminée emboutie à froid ou repoussée à froid.

- de tubulures et piquages répartis sur la double enveloppe conformément au plan de construction. L'ensemble est en acier inoxydable.

La cuisson se fait par la double enveloppe de fond bain-marie qui est chauffée par un thermoplongeur. La boule permet 3 modes de cuisson différents :

- la cuisson des aliments à basse température sous vide ;
- la cuisson des aliments à haute température sous une pression de 0,5 bar (112 °C au maximum) ;
- cuisson traditionnelle des aliments à la pression atmosphérique.

Le mélangeur racleur sert à éviter l'accrochage des matières cuites sur le fond et à brasser le produit. La rotation du mélangeur est assurée par un motoréducteur monté au sommet de la boule.

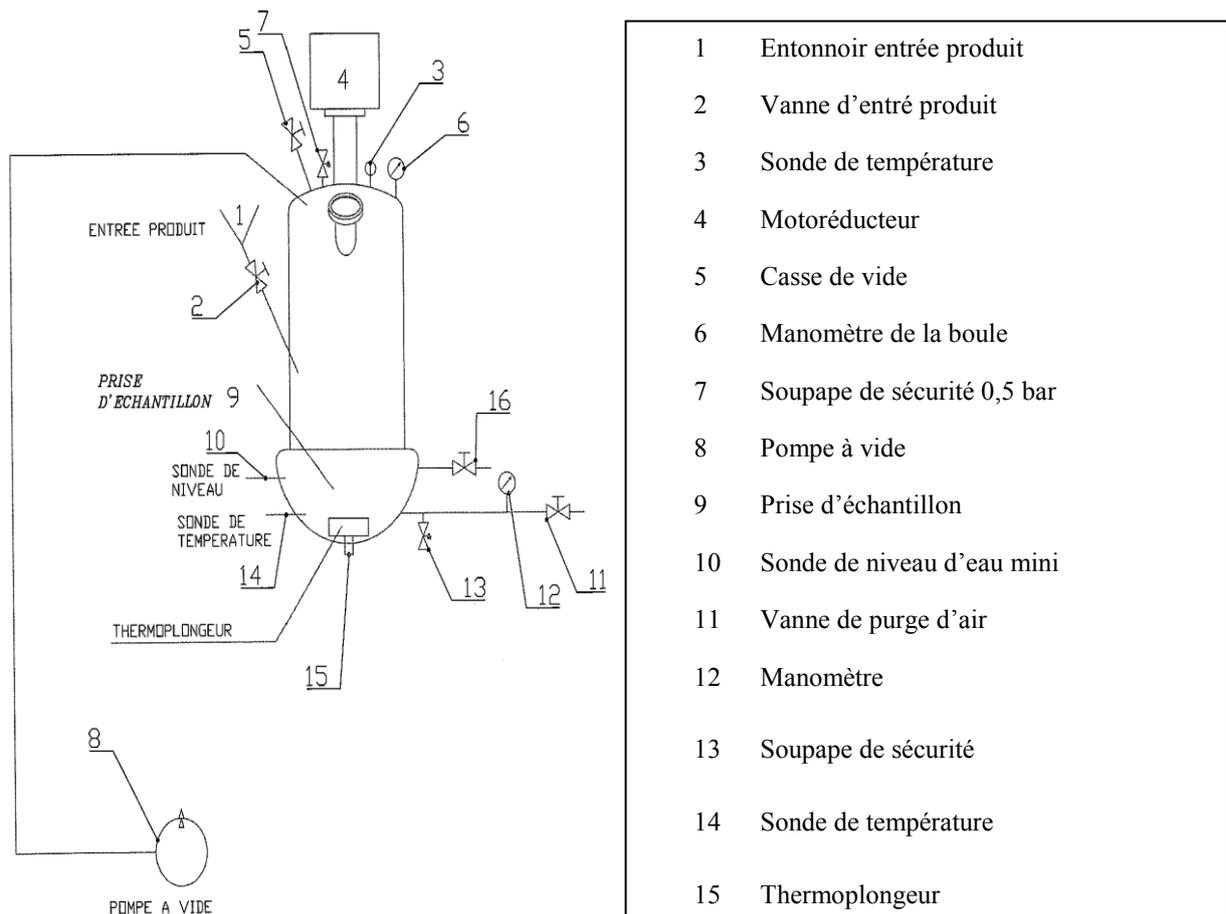


Figure 9 : Schéma du dispositif de concentration sous vide (CIRAD)

2.2.2. Protocole d'évaporation des extraits aqueux de calices.

Un volume d'extrait de 4 litres a été utilisé pour la fabrication de chaque concentré. La température de chauffe est fixée à 120 °C avant le démarrage.

- ✓ Etude de l'effet de la température d'évaporation sur la qualité des concentrés de Bissap

La teneur en extrait sec soluble finale est fixée à 60 °BRIX. Cinq concentrés de Bissap ont été obtenus par évaporation aux températures de 50, 65, 75, 85 et 100 °C.

- ✓ Etude de l'effet de la teneur en extrait sec soluble (ESS) sur la qualité des concentrés de Bissap

La température dans la partie sous pression est fixée à 75 °C et des concentrés à 20, 30, 40, 50 et 60 °BRIX sont successivement produits.

Dans les deux cas, la pression dans la boule est obtenue par extrapolation en utilisant un tableau de correspondance (**Tableau 15**)

Tableau 15 : Relation entre pression et température en fonction de la teneur en extrait sec soluble (ESS)

Extrait sec soluble (ESS) (g/100g)	Pression absolue (kPa)	Température d'ébullition (°C)
60	7,2	41,8
60	15,0	56,3
12	20	60,1
60	20	62,4
12	30	69,2
60	30	71,4
12	40	76,0
60	40	78,2
12	50	81,4
60	50	83,7

Un volume de 5 L d'extrait est concentré par évaporation sous vide à 60 °C à l'aide de la boule de concentration du CIRAD (AUREOL). A la fin de l'évaporation, la teneur en extrait sec soluble est mesurée à l'aide d'un réfractomètre manuel (ATAGO). Nous avons ensuite

effectué une dilution massique du concentré à 60 °Brix (E60) pour obtenir les extraits à 40 °Brix (E40) et 10 °Brix (E10).

2.2.3. Conditions de stockage des extraits aqueux de calices

Afin d'étudier l'effet de la teneur en extrait sec soluble sur la stabilité des anthocyanes, les extraits de Bissap sont stockés à 4, 20, 30, 37 et 45 °C. Pour le stockage à 4 °C, un réfrigérateur a été utilisé (Hoelzle & Chelius HC, Dreieich, Germany) ; à 20 °C un incubateur a été utilisé (Liebherr profi-line). Pour les stockages à 30, 37 et 45 °C, des étuves de marque Memmert ont été utilisées. L'analyse de la teneur en anthocyanes totaux est effectuée sur les échantillons pendant une durée de trois mois à une fréquence de deux semaines.

2.2.4. Condition de traitement thermique des extraits aqueux des calices

Les traitements thermiques sont réalisés à 70, 80, 90 et 95 °C à l'aide d'un bain marie équipé d'un système d'agitation et de circulation de l'eau (MEMMERT). Un volume de 10 mL d'extrait est rempli dans un tube en pyrex recouvert d'un bouchon puis introduit dans un bain marie préalablement réglé à la température de traitement. Des échantillons sont retirés à intervalle de temps régulier, refroidis rapidement dans un bain d'eau glacée puis conservés au réfrigérateur à 4 °C avant d'être analysés.

2.3. Méthodes analytiques

2.3.1. Détermination de la teneur en matière sèche totale

La méthode consiste à sécher une masse connue de l'échantillon à 105 °C dans une étuve isotherme jusqu'à masse constante (AFNOR 1982). Après refroidissement dans un dessiccateur, les échantillons sont pesés à nouveau. La teneur en eau représente la différence de masse avant et après passage à l'étuve. L'échantillon végétal broyé et tamisé à 400 µm, est introduit dans les nacelles préalablement nettoyées, séchées pendant 30 minutes à 105 °C à l'étuve, puis refroidies dans un dessiccateur. Après avoir noté la masse de la nacelle vide, on y introduit une masse d'échantillon et l'ensemble est porté dans l'étuve à 105 °C. Après 24 heures, la masse de la nacelle contenant l'échantillon séché est notée. Les résultats sont exprimés en g pour 100g de matière sèche.

2.3.2. Détermination de la teneur en cendres totaux

Les cendres sont déterminées par méthode gravimétrique après avoir calciné l'échantillon à analyser dans un four à moufles à $525\text{ °C} \pm 25\text{ °C}$ (AFNOR 1982). On évapore à sec 25 ml ou 25 g de l'échantillon à analyser dans une capsule de platine préalablement pesée à l'aide l'étuve. Chauffer lentement dans une hotte d'aspiration le résidu sec sur une plaque chauffante jusqu'à ce que la majeure partie des constituants organiques soit brûlée. On procède ensuite à une calcination du résidu dans un four à moufles à $525\text{ °C} \pm 25\text{ °C}$ jusqu'à l'obtention de cendres blanches. La capsule est ensuite refroidie à température ambiante dans un dessiccateur et peser rapidement. Les résultats sont exprimés en g pour 100g de matières sèches.

2.3.3. Mesure de la densité

La masse volumique de l'eau est mesurée à la température de 4 °C , qui correspond à une température où sa masse volumique passe par un maximum. Pour des raisons pratiques, la mesure de la masse volumique de la substance s'effectue à la température ambiante et généralement à 20 °C . Il est donc usuel de noter la densité d'un solide ou d'un liquide en indiquant les 2 températures : d_4^{20} qui signifie donc « densité de la substance à 20 °C par rapport à de l'eau à 4 °C ». Un pycnomètre est rempli de l'échantillon porté à 20 °C et sa masse est pesée avec une balance de précision. Le rapport de la masse volumique de l'échantillon sur la masse volumique de l'eau distillée à 4 °C donne densité de l'échantillon.

2.3.4. Détermination du pH

La mesure du pH de l'échantillon s'effectue par potentiométrie. Le pH-mètre (Titroline SCHOTT Instrument) est étalonné à l'aide de deux solutions tampons (pH 4 et pH 7). Le pH des échantillons liquides est lu directement par introduction de l'électrode de mesure. Concernant les calices, nous avons procédé à une mise en solution de 10 g d'échantillon dans 100 mL d'eau distillée. Le mélange est homogénéisé et placé pendant 1 heure sur un agitateur magnétique. La mesure est ainsi exprimée en pH dans un extrait à 10 g pour 100 mL.

2.3.5. Détermination de l'acidité titrable

Elle est obtenue par titrage potentiométrique à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium de normalité 0,1 N (AFNOR 1982). L'utilisation du potentiomètre nécessite un étalonnage

préalable à l'aide des solutions tampons pH 7 et pH 4 et suivant la fiche d'utilisation du Titrimètre.

Pour les échantillons liquides, nous avons procédé à des dilutions pour obtenir des chutes de burettes comprises entre 5 et 10 mL.

Dans les cas des calices, une étape de mise en solution des acides a été réalisée avant le dosage. Les échantillons sont découpés en petits morceaux puis une masse de 1,5 g est pesée à 0,1 g près. Un volume de 40 mL d'eau déminéralisée est ajouté puis le mélange est homogénéisé. Un réfrigérant à air est adapté à la fiole qui est placée dans un bain-marie bouillant pendant 30 min. Après refroidissement, l'échantillon est filtré, transvasé quantitativement dans une fiole de 50 mL puis complété au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée. Un volume est prélevé et dosé avec la soude 0,1 N jusqu'à pH 8,1.

2.3.6. Détermination de l'activité de l'eau (A_w)

L'activité de l'eau est déterminée selon la méthode du point de rosée en faisant la moyenne de plusieurs mesures (l'appareil doit atteindre son point d'équilibre moyen). Elle mesure l'équilibre de la phase liquide de l'eau d'un échantillon avec la phase vapeur dans une chambre hermétique. Un échantillon est placé sur une coupelle inséré dans un bloc muni de capteurs. Le capteur du point de rosée mesure la température du point de rosée de l'air alors qu'un thermomètre mesure la température de l'échantillon. L'appareil (Aw-mètre AQUALAB TE) est d'abord vérifié à l'aide d'une solution saturée de NaCl qui donne une valeur de 0,754 à 20 °C. La mesure de l'activité de l'eau de l'échantillon est directement lue sur l'écran de l'appareil.

2.3.7. Détermination de la teneur en vitamine C

a. Principe

La vitamine C est extraite de l'échantillon à analyser en utilisant une solution d'acide métaphosphorique (MPA) dont le rôle est également de ralentir l'oxydation de la vitamine C à l'air. Ensuite une solution réductrice de TCEP (Tris-2-carboxyéthyl phosphine hydrochloride) est utilisée pour transformer l'acide L(+) déshydroascorbique (DHAA) en acide L(+) ascorbique. La teneur totale en acide ascorbique est déterminée par HPLC à l'aide d'une détection UV à 265 nm après différence des aires des pics après et avant réduction.

b. Extraction

Une masse de 10 g de calices, mélangé avec 40 mL de solution d'acide métaphosphorique (MPA) 4 %, est introduite dans une fiole jaugée de 50 mL recouverte de papier aluminium. La solution obtenue est agitée durant 5 min à 4 °C puis centrifugée avec une vitesse de 10000 tours par minute. Le surnageant est filtré à l'aide d'un filtre Millipore 0,45 µm. Le culot est repris avec 40 mL de solution MPA 4 %. La centrifugation et la filtration sont répétées dans les mêmes conditions. Les deux filtrats sont regroupés et appelés extrait final.

c. Réduction

Dans un vial ambré, nous avons additionné 500 µL de la solution d'extrait de l'échantillon et 500 µL d'une solution de tris (2-carboxyéthyl) phosphine hydrochloride (TCEP) à 10 mM dans du MPA 4 %. Ce mélange est agité pendant 60 min à 30 °C dans le noir. Ce mélange est utilisé pour la chromatographie.

d. Conditions de la chromatographie

L'analyse est effectuée par HPLC (AGILENT 1100) équipé d'un détecteur à barrettes de diodes. La phase mobile est constituée d'acide sulfurique 0,01 % avec un débit isochratique de 0,8 mL min⁻¹. Un volume de 20 µL est injecté dans une colonne RP18 placée dans un four réglé préalablement à 30 °C.

e. Etalonnage

Nous avons réalisé une gamme d'étalonnage avec une solution pure d'acide ascorbique. Les concentrations sont comprises entre 10 et 150 mg L⁻¹. Le tracé de la courbe d'étalonnage (linéaire) a permis de calculer l'équation de la droite, de régler et de déduire la concentration en vitamine C des extraits des échantillons de Bissap.

2.3.8. Détermination de la teneur en acides aminés libres

Les acides aminés libres sont extraits par un tampon citrate (pH 2,2) en présence d'un standard interne de Norleucine (Merck). Ils sont analysés par une HPLC (BIOCHROM +30) équipée d'une colonne comportant une résine cationique (Na⁺). Des tampons de différents pH ainsi qu'un gradient de température (four à effet Peltier) permettent de séparer les différents acides aminés. L'éluant de colonne est mélangé à du réactif de ninhydrine passant par un serpentin chauffé à haute température formant avec les acides aminés une coloration

directement proportionnelle à la quantité d'acides aminés. Le mélange éluant/ninhydrine passe ensuite dans le photomètre. Après chaque analyse, la colonne est régénérée par une base forte puis équilibrée avec le tampon de départ avant une prochaine analyse. La séquence d'analyse dure plus de 90 min.

Les échantillons sont placés dans des vials de 1,5 mL, bouchés hermétiquement et disposés en attente dans le passeur (réfrigéré à 4 °C). 20 µL sont injectés et élués selon un diagramme d'éluion qui dure 95 min. Les acides aminés sont repérés par leur temps de rétention, et les calculs effectués à partir des aires mesurées à 570 nm pour tous les acides aminés, à l'exception de la proline ou la détection est réalisée à 440 nm.

2.3.9. Dosage des acides aminés totaux

Les protéines sont hydrolysées à l'aide d'acide Méthane sulfoxyde 4 N à 150 °C pendant 2 h. Ce protocole d'hydrolyse est rapide, facile à mettre en œuvre et protège certains acides aminés. L'hydrolysate est analysé par HPLC en utilisant une résine d'échange cationique et une détection après réaction à la ninhydrine.

Une masse de 15mg d'échantillon est introduite dans un tube à hydrolyse. On y ajoute 50 µL de Norleucine à 25 µmole mL⁻¹ (standard interne) et 450 µL de solution d'acide méthane sulfonique (AMS SIGMA réf M-4141 : 10x2 mL, MM=96,10g mol⁻¹, d=1,48g mL⁻¹). Le tube est vissé par un bouchon et placé sur le système de dégazage

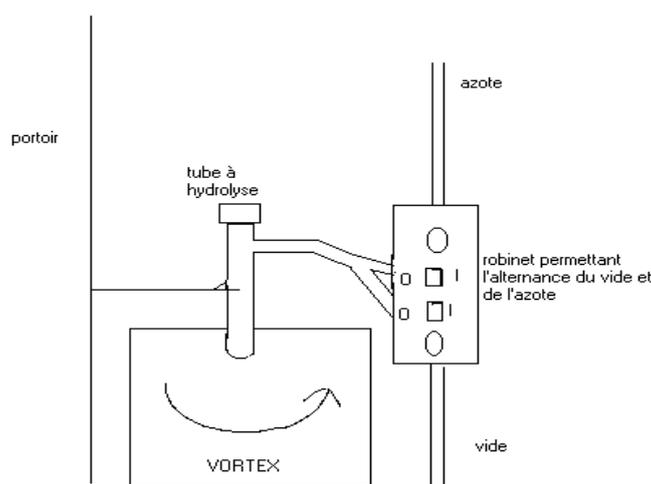


Figure 10 : Montage du système de dégazage de l'hydrolysate

Le tube dégazé est placé dans le bloc chauffant pendant 120 min. Après refroidissement 5 min de refroidissement à la température ambiante, nous introduisons 450 µL de NaOH 4 N dans le

tube pour arrêter la réaction. Le milieu réactionnel est ensuite prélevé avec une pipette Pasteur et placé dans une fiole jaugée de 5 mL. Le tube est rincé 3 fois avec le tampon de dilution (Citrates de sodium pH 2,2) et le volume de la fiole est ajusté à 5 ml. L'extrait est filtré à l'aide de filtre seringue (diamètre de pore 0,45 µm). Le dosage est effectué comme précédemment avec les acides aminés libres.

2.3.10. Dosages des protéines totales

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Kjeldahl (AFNOR 1982) Une prise d'essai de 5 g est introduite dans un tube à hydrolyse. On y ajoute 30 mL d'une solution de H₂SO₄ concentré et une pastille de catalyseur. Le tube est placé sur un bloc de minéralisation préchauffé à 450 °± 10 °C. Après 2 h de chauffage, l'échantillon est refroidi et est transféré quantitativement dans une fiole de 250 mL puis complété au trait de jauge avec de l'eau déminéralisée. Une aliquote de 25 mL est introduite dans un tube de distillation dans lequel est ajouté 10 ml de NaOH 10 N. Ce tube est ensuite placé dans un appareil de distillation (type Kjeldahl). Les vapeurs de NH₃ libérées sont condensées et piégées dans un bécher contenant 10ml d'acide borique 4 % contenant un indicateur coloré (mélange de rouge de méthyl et vert de bromocrésol). Cette solution est ainsi dosée par du H₂SO₄ 0,1 N pour déterminer le pourcentage en azote. La teneur en protéines est obtenue à partir de celle de l'azote multiplié par un facteur de conversion (5,7 pour les produits végétaux)

2.3.11. Détermination des paramètres de couleur

L'analyse de couleur des échantillons a été réalisée avec un colorimètre (Minolta CR/DP 400) suivant système de couleur du Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Les paramètres mesurés sont :

- La luminosité L* qui s'étend du noir (0) au blanc (100),
- Le chroma a * qui s'étend de vert (-60) au rouge (+60),
- Le chroma b * qui s'étend de bleu (-60) au jaune (+60).

Le chroma ou la saturation C * et l'angle de tonalité ou teinte h* sont calculés selon la méthode définie par Minolta (1994) (Minolta Corporation 1994) à partir des équations suivantes :

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$
$$h^* = \tan^{-1}\left(\frac{a^*}{b^*}\right)$$

Les échantillons sont placés dans boîtes de Pétrie claire en verre. Toutes les mesures sont effectuées en triple.

2.3.12. Détermination de l'indice de brunissement IB

Les échantillons sont d'abord dilués avec de l'eau distillée pour obtenir un extrait à 10 °Brix. Un volume de 100 µL de cet extrait est ensuite mélangé avec 2 mL de tampon pH 3 et les absorbances sont mesurées à 430 nm (A_{430}) et 520 nm (A_{520}) au spectrophotomètre UV-Visible. L'indice brun (IB) est calculé à partir de l'équation ci-dessous :

$$IB = \left(\frac{A_{430}}{A_{520}} \right)$$

2.3.13. Dosage des anthocyanes totaux

a. Principe

Le principe est basé sur la modification de la coloration des anthocyanes en fonction du pH (Lee, Durst, et Wrolstad 2005). Après dilution de l'extrait de calices dans deux solutions tampon à pH 1,0 et pH 4,5, l'absorbance est mesurée à 500 et à 700 nm.

b. Extraction des anthocyanes

✓ Dans les calices

Une masse d'environ 0,5 g de calices de Bissap broyés finement a été mélangée avec 20 ml de méthanol/HCl 1,5 M (85/15, volume/volume) sous agitation magnétique pendant 10 minutes. Cette opération est répétée au moins 3 fois jusqu'à l'obtention d'un résidu plus ou moins blanchâtre. L'ensemble est alors filtré sur verre fritté de porosité n° 4 et évaporé à sec sous vide à 30 °C. Les anthocyanes sont alors repris dans de l'eau distillée et dosés suivant la méthode du pH différentiel.

✓ Dans les extraits

On procède d'abord à des dilutions pour les extraits concentrés. Les solutions obtenues sont ensuite passées aux filtres de porosité 0,45 µm.

c. Expression des résultats

Les concentrations en anthocyanes dans les extraits aqueux et dans les calices d'hibiscus sont données par les formules ci-dessous:

$$Ca = \frac{Pm \times A \times Fd \times 1000}{\epsilon}$$
$$Cas = \frac{Pm \times A \times Fd \times 1000}{\epsilon} \times \frac{V}{m}$$

m : masse en gramme de l'échantillon solide (calices)

V : volume final en litre utilisé pour reprendre l'extrait concentré (cas des calices)

Ca : concentration en anthocyanes en mg L^{-1} dans l'extrait liquide

Cas : concentration en anthocyanes en mg g^{-1} de calice

Pm : poids moléculaire de l'anthocyane. Dans ce cas, Ca est exprimé par rapport au Sambubioside de Delphinidine qui est l'anthocyane majoritaire dans les calices de Bissap. Son poids moléculaire est égal à 597 g mol^{-1} .

ϵ : coefficient d'extinction moléculaire et est égal à $26\,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Fd : facteur de dilution

A : absorbance, calculée grâce à la formule

$$A = (A1 - A2) - (A3 - A4)$$

A1 = absorbance mesurée à pH 1 à 510 nm

A2 = absorbance mesurée à pH 1 à 700 nm

A3 = absorbance mesurée à pH 4,5 à 510 nm

A4 = absorbance mesurée à pH 4,5 à 700 nm

2.3.14. Détermination de la teneur en polyphénols totaux

Une masse de 0,5 g de poudre de calices de Bissap ou 3 g de jus ou d'extrait est utilisée selon le cas pour effectuer le dosage des polyphénols totaux. L'échantillon est extrait par 10 ml d'un mélange acétone/eau/acide formique (70/28/2 : v/v/v) durant 10 minutes. L'opération est répétée deux fois. Les deux fractions sont rassemblées et filtrées sur papier filtre. Le dosage est effectué à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode mise au point par Georgé et al. (2005) (George et al. 2005). Un volume de 5 μL de filtrat est complété à 500 μL avec du méthanol. Puis un dosage est réalisé avec le réactif de Folin-Ciocalteu. Parallèlement, 500 μL de filtrat sont additionnés à 3500 μL d'eau, puis 2 mL de ce mélange sont déposés sur une cartouche (OASIS) pour ensuite être lavés avec deux fois 2 ml d'eau. Le volume de la fraction éluée est mesuré et 500 μL de cette fraction sont ensuite dosés. Les absorbances sont mesurées à 760 nm par un spectrophotomètre UV 7200 (CECIL INSTRUMENTS, Royaume Unis). Les résultats sont exprimés en mg d'équivalents acide gallique pour 100 g de matière sèche et sont la moyenne de trois essais.

2.3.15. Identification des composés phénoliques dans les calices de Bissap

a. Extraction

Un gramme de poudre de calices de Bissap est additionné à 30 mL d'une solution acétone/eau/acide formique (70/28/2 : v/v/v). Le mélange est agité durant 10 min puis filtré.

Le filtrat est évaporé à sec sous vide et dissous à nouveau dans 10 ml d'un mélange méthanol/eau (50/50 : v/v). La solution est filtrée (Millipore, 0,45 μm) avant analyse par HPCL/MS.

b. Caractérisation du profil polyphénolique des extraits par CLHP-SM

L'analyse par HPLC/MS est réalisée sur une chaîne HPLC SURVEYOR, équipée d'un détecteur à barrette de diodes modèle UV6000LP, de pompes quaternaires P4000, d'un injecteur automatique AS3000 et couplée à un spectromètre de masse LCQ équipé d'une source d'ionisation électro-spray (THERMO FINNIGAN, San José, USA). La séparation est effectuée à l'aide d'une colonne ACE C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm , AIT, France) thermostatée à 30 °C. La phase mobile est constituée du solvant A : H₂O/HCOOH/ CH₃CN (90/2/8 : v/v/v) et B : CH₃CN. Le volume d'injection est de 20 μL et les conditions d'élution sont décrites dans le tableau 16.

Tableau 16 : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse CLHP/SM des composés phénoliques

Temps (min)	Débit (mL min ⁻¹)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	0,7	95	5
50	0,7	75	25
52	0,7	0	100
60	0,7	0	100
62	0,7	95	5
78	0,7	95	5

La détection est effectuée à 280, 330, 360 et 510 nm. L'électro-nébulisation est réalisée en mode négatif. La plage de masses est comprise entre 100 et 2000 Da. La température de désolvatation est de 300 °C. La tension du spray est de 5000 V. Les fragmentations de type MSⁿ sont réalisées avec des énergies de collision comprises entre 30 et 50 %.

2.3.16. Mesure des spectres d'absorption des extraits de calices

Les échantillons sont ramenés à un extrait sec soluble de 10 °Brix puis dilués avec le tampon pH 1. Les absorbances sont mesurées avant (témoin) et pendant le traitement thermique entre 400 et 800 nm.

2.4. Méthode de modélisation des cinétiques de dégradation

Les variations des anthocyanes et de l'indice de brunissement pendant le traitement thermique ont été déterminées à partir des équations suivantes :

$$\ln\left(\frac{Y_t}{Y_0}\right) = -k_{80} \times \exp\left(\frac{E_a}{R} \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{80}}\right)\right) t \quad (\text{Arrhenius})$$

$$\text{Log}\left(\frac{Y_t}{Y_0}\right) = -\frac{t}{D_{80}} \times 10^{\left(\frac{T-T_{80}}{z}\right)} \quad (\text{Ball})$$

$$\ln\left(\frac{Y_t}{Y_0}\right) = -\frac{k_B}{h} T \left(\exp\left(\frac{\Delta H^*}{RT}\right) \times \exp\left(\frac{\Delta S^*}{R}\right) \right) \times t \quad (\text{Eyring})$$

- **Y₀** est la valeur initiale,
- **Y_t** est la valeur finale après traitement à t minutes ;
- **T** est la température (en Kelvin pour les modèles d'Arrhenius et d'Eyring, en Celsius pour le modèle de Ball) ;
- **k₈₀** le facteur de vitesse prise à 80 °C,
- **T₈₀** la température de référence prise à 80 °C;
- **D₈₀** la durée de réduction décimale à 80 °C;
- **E_a** est l'énergie d'activation (J mol⁻¹) ;
- **ΔH*** est l'enthalpie d'activation (J mol⁻¹ K⁻¹) ;
- **k_B/h** est le rapport de la constante de Boltzmann sur la constante de Planck (2,084 × 10¹⁰ K⁻¹ s⁻¹) ;
- **z** est un facteur de température (°C).

Pour chaque modèle, les paramètres cinétiques sont déterminés en effectuant une minimisation (Solveur EXCEL) de la somme des écarts au carré (SEC) entre les variations (Y/Y₀) mesurées expérimentalement et les variations calculées à partir du modèle considéré.

$$SEC = \sum \left(\left(\frac{Y}{Y_0} \right)_{\text{Expérimental}} - \left(\frac{Y}{Y_0} \right)_{\text{Calculé}} \right)^2$$

La vitesse de réaction k du premier ordre pour chaque température est déterminée à partir de l'équation 6.

$$\left(\frac{Y}{Y_0}\right) = \exp(-kt)$$

Le temps de demi-vie $t_{1/2}$ et la durée de réduction décimale D sont calculés à partir des équations 7 et 8.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

$$D = \frac{\ln(10)}{k}$$

2.5. Analyses microbiologiques

Le **tableau 17** reprend les germes recherchés ainsi que les normes utilisées dans la caractérisation microbiologique des calices et boissons et sirops à base de calices de Bissap.

Tableau 17 : Normes, milieux de cultures et températures d'incubation utilisés pour les analyses des différentes flores microbiologiques

Germes recherchés	Norme ISO	Milieux de culture	Incubation (température/temps)
FMAT	NF EN ISO 4833	PCA (Plate Count Agar)	30°C / 24h
<i>Escherichia coli</i>	NF EN ISO	TBX (Tryptone Bile X-glucuronide)	44°C / 24h
<i>Bacillus cereus</i>	NF EN ISO 7932	Mossel	30°C / 24h
Bactéries lactiques	NF EN ISO	MRS (Gélose de Man, Rogosa, Sharpe)	30°C / 72h
<i>Listeria monocytogenes</i>	NF EN ISO 11290-1	Fraiser/Palcam	37°C/48h et 30°C/48h
Salmonelles	NF EN ISO 6579	Rappaport/SS(Salmonella-shigella)	37°C/24h et 37°C/24h
<i>Staphylococcus aureus</i>	NF EN ISO 6888	BP (Baird-Parker)	37° C / 48h
<i>Clostridium perfringens</i>	NF EN ISO 7937	TSN (Tryptone - Sulfite – Néomycine)	37°C / 24h
Coliforme totaux	NF EN ISO	VRBL (Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)	37°C / 48h
Coliforme fécaux	NF EN ISO	VRBL	44°C / 48h
Levures & Moisissures	NF EN ISO 7954	Sabouraud au chloramphénicol	30°C / 144h

2.6. Analyses statistiques

L'analyse de la variance a été réalisée en utilisant la version 10 de XLSTAT (Addinsoft, Paris, la France). Les tests de multivariance de Tukey ont été appliqués pour la comparaison des moyennes avec $P < 0,05$. L'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse factorielle discriminante (AFD) sont été réalisées à l'aide du logiciel de XLSTAT.

III. RESULTATS ET DISCUSION

1. Caractérisation des principales variétés de calices de Bissap cultivées au Sénégal

1.1. Composition physicochimique et biochimiques des calices

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'histogrammes permettant de comparer la composition de chaque variété de calices dans les zones de culture. Ils permettent de connaître :

- l'impact des zones de culture sur la composition des calices de Bissap ;
- la différence de composition en fonction des variétés de calices de Bissap

1.1.1. pH et acidité titrable

Les résultats obtenus dans l'analyse du pH et de l'acidité titrable sont présentés dans les figures 11 et 12.

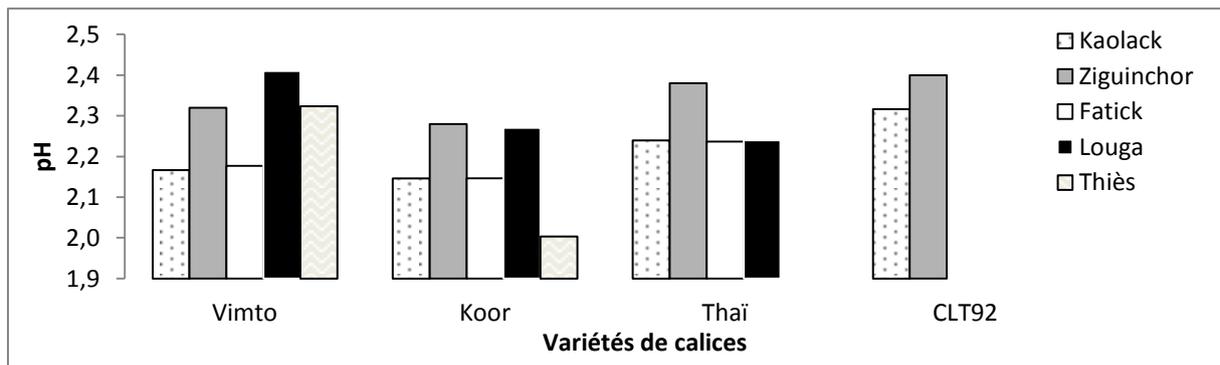


Figure 11 : pH des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

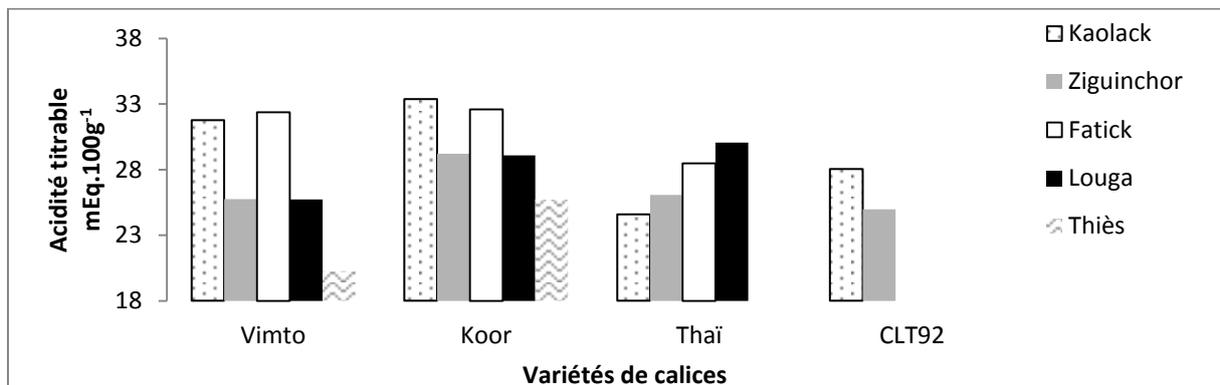


Figure 12 : Acidité titrable des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

La valeur de pH la plus faible (2,0) est retrouvée dans les calices Koor de la zone de Thiès. Les calices Vimto de Louga et CLT92 de Ziguinchor présentent les plus fortes acidités avec respectivement des pH moyennes de 2,4. Cela suppose que le pH des calices n'est pas influencé par les zones de culture (**Figure 11**).

Les calices Koor de Kaolack et Fatick contiennent les plus fortes teneurs en acidité titrable avec respectivement 33,4 et 32,6 mEq.100g⁻¹ (**Figure 12**).

1.1.2. Matière sèche totale et activité de l'eau

Les résultats des analyses de la teneur en matière sèche totale et de l'activité de l'eau (Aw) des calices sont illustrés par les figures ci-dessous :

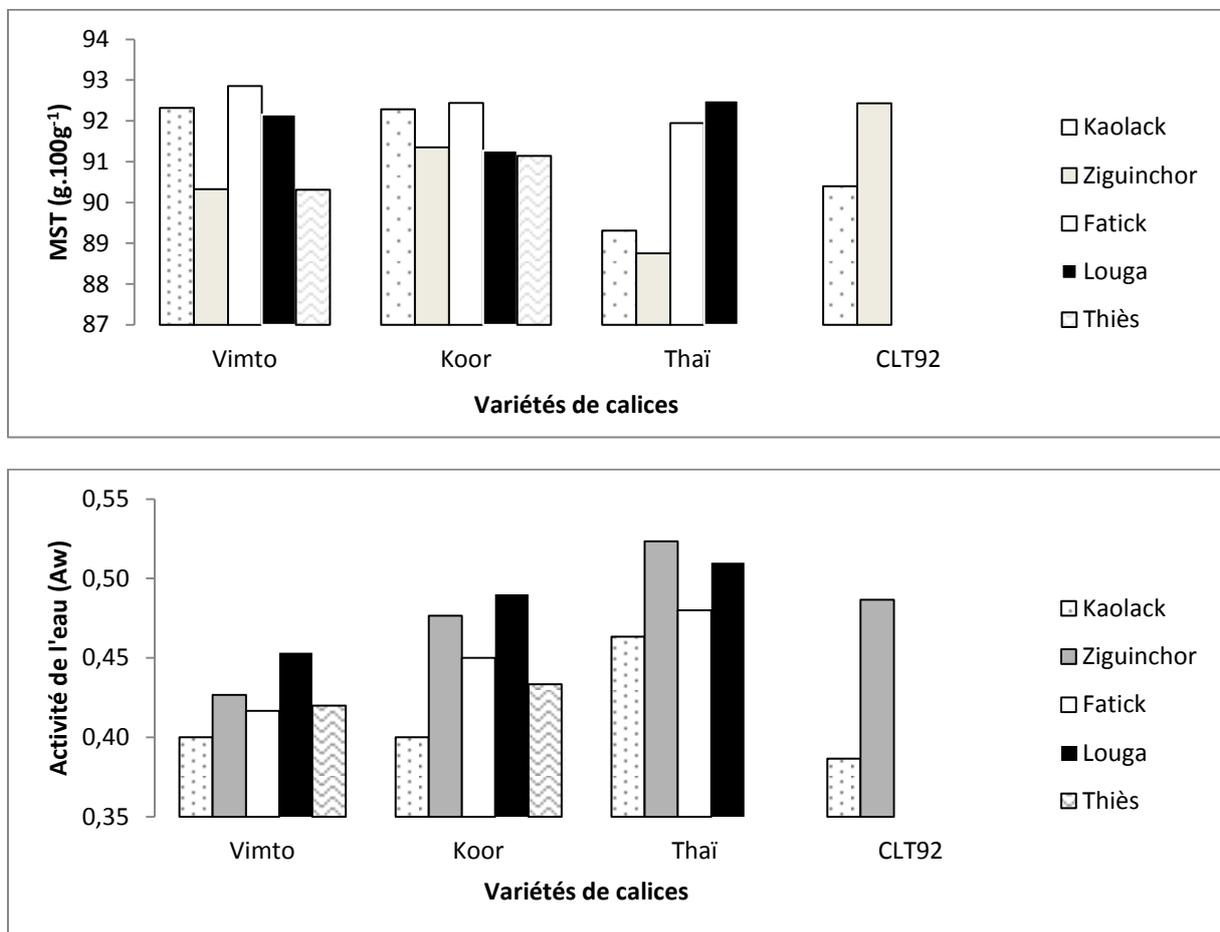


Figure 13 : Teneur en extrait sec total (ESS) et activité de l'eau (Aw) des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices Thai de Ziguinchor montrent les plus faibles teneurs en matière sèche totale (MST) avec des valeurs inférieures à 89 g/100g. De même, c'est dans ces calices que la plus forte activité de l'eau est relevée avec une valeur supérieure à 0,52 (**Figure 13**). Ces résultats

s'expliqueraient par la différence d'humidité des sols. En effet, la pluviométrie est beaucoup plus importante dans cette région du sud du Sénégal. La variation de la teneur en matière sèche est aussi très influencée par les conditions de séchage des calices : températures, durées et techniques.

1.1.3. Cendres totaux

Les résultats d'analyses de la teneur en cendres sont illustrés par la figure ci-dessous :

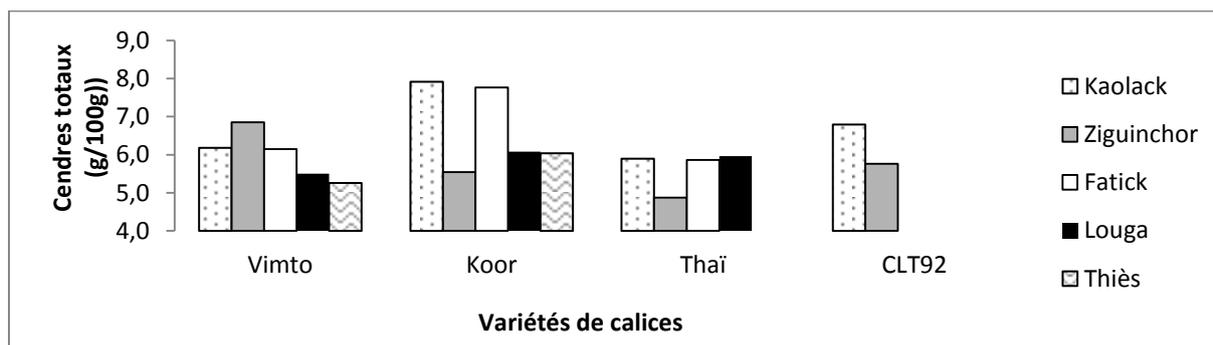


Figure 14 : Teneur en cendres des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices Koor des zones de Kaolack et de Fatick montrent les plus fortes teneurs en minéraux avec respectivement des valeurs de 7,91 et 7,76 g/100g (**Figure 14**). Ces deux zones, situées dans le bassin arachidier du Sénégal, sont caractérisées par des sols très salins, riches en chlore, en sodium et en fluor ; ce qui expliquerait les résultats observés.

1.1.4. Lipides totaux

Les résultats des analyses de la teneur en lipides sont illustrés par la figure suivante :

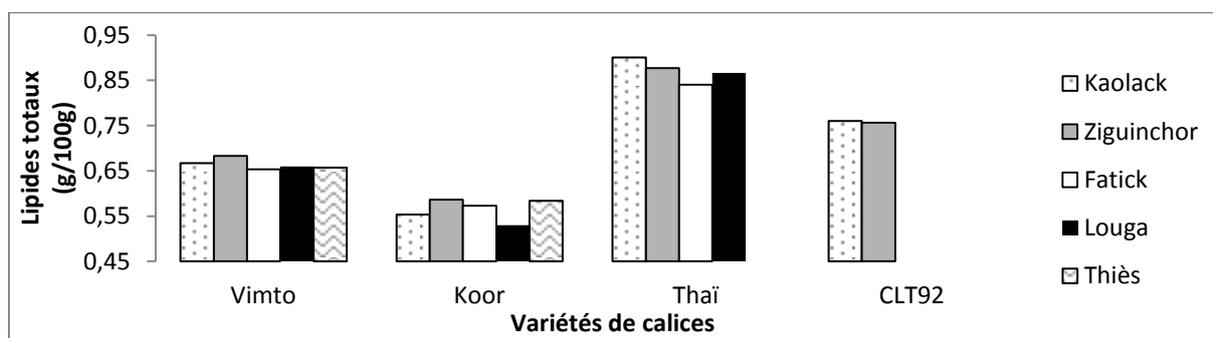


Figure 15 : Teneur en lipides totaux des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices Thaï de Kaolack présentent les plus grandes teneurs en lipides totaux avec une valeur moyenne de 0,90 g/100g. La plus faible valeur est retrouvée dans les calices Koor de Louga avec 0,53 g/100g (**Figure 15**). Cependant, la teneur en lipides semble peu influencée par la zone de culture.

1.1.5. Sucres réducteurs et en sucres totaux

Les figures ci-dessous présentent les résultats de la détermination des teneurs en sucres réducteurs et des sucres totaux dans les calices.

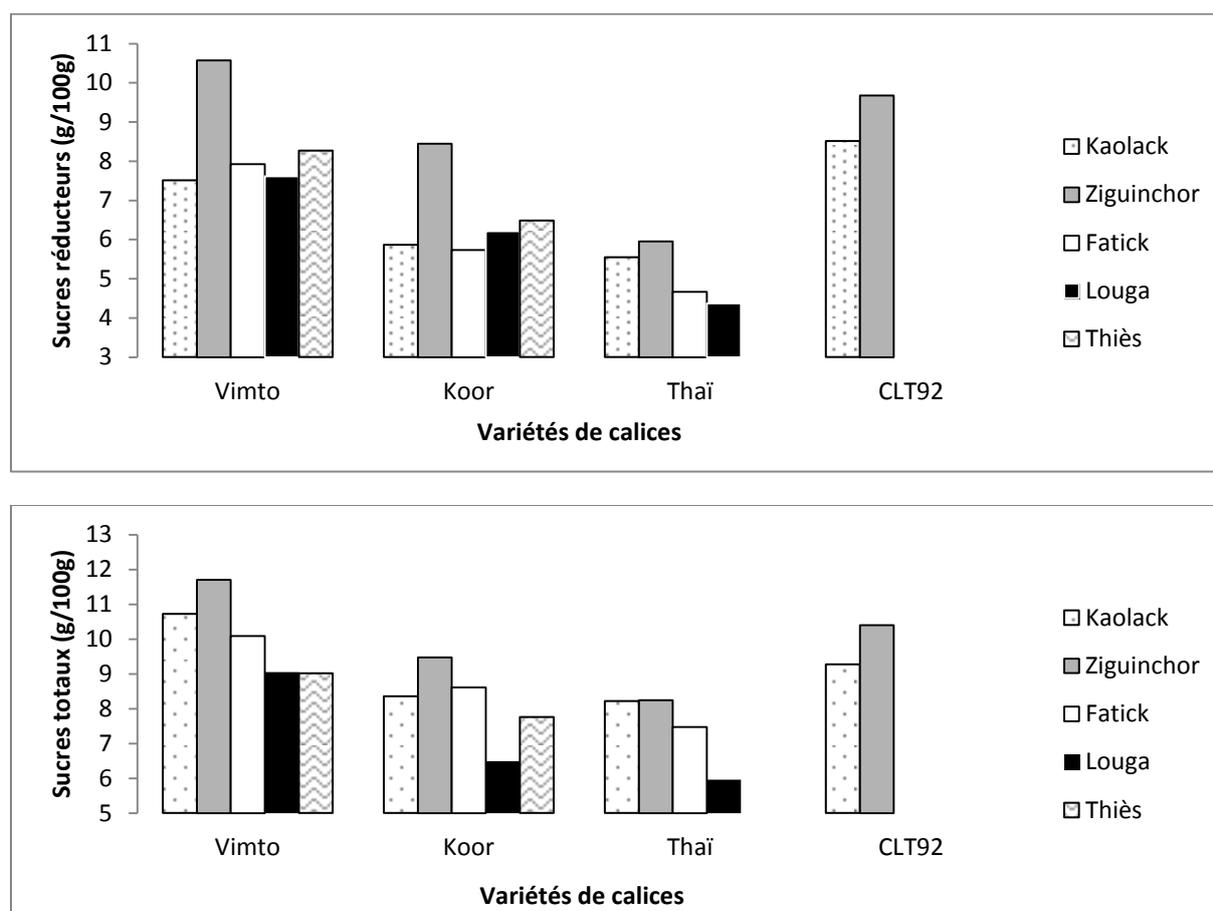


Figure 16 : Teneurs en sucres réducteurs et en sucres totaux des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices de Vimto et CLT92 de Ziguinchor présentent les plus grandes teneurs en sucres réducteurs avec des valeurs supérieures à 9,5 g/100g. La plus grande teneur en sucre totaux est aussi retrouvée dans les calices Vimto de la zone de Ziguinchor. Les plus faibles teneurs en sucres réducteurs sont notées dans les calices Thaï de la zone de Louga avec des valeurs inférieures à 6 g/100g (**Figure 16**). Les teneurs en sucres seraient ainsi influencées par les zones de cultures. Cela s'expliquerait par la forte humidité des sols dans la région de

Ziguinchor ce qui favorise une meilleure maturité de la plante et par conséquent une augmentation du taux de sucres.

1.1.6. Acides aminés totaux

Les résultats de l'analyse de la teneur en cendres sont illustrés par la figure ci-dessous :

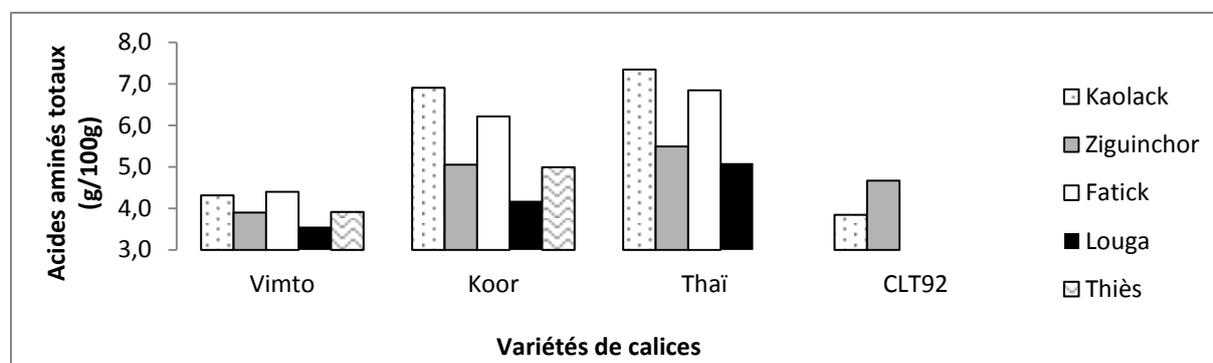


Figure 17 : Teneur en acides aminés totaux des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les teneurs les plus élevées en acides aminés totaux sont retrouvées dans les calices Thaï et Koor de Kaolack avec respectivement les valeurs de 7,34 et 6,91 g/100g (**Figure 17**). La proximité de ces deux zones laisse supposer une influence des sols sur la teneur en acides aminés. Les calices Vimto de Louga présente des valeurs inférieures à 4 g/100g.

1.1.7. Protéines totaux

Les résultats des analyses de la teneur en protéines des calices sont présentés par la figure ci-dessous :

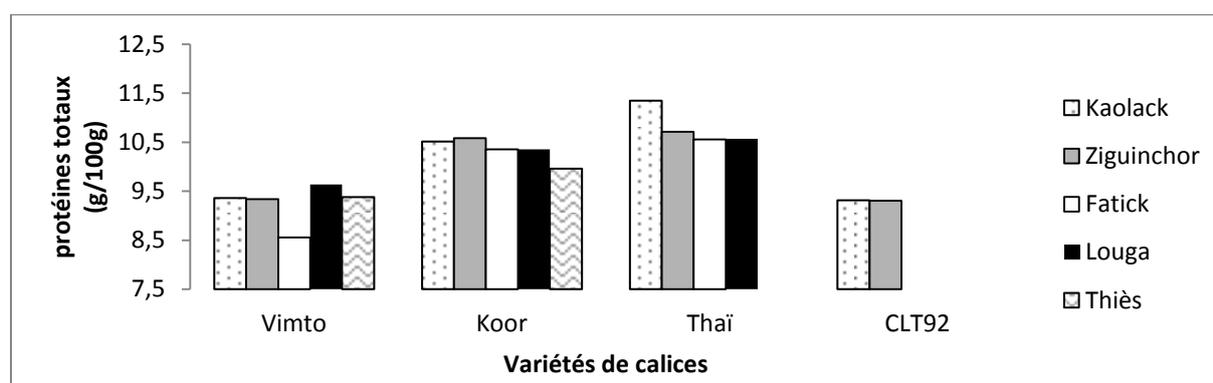


Figure 18 : Teneur en protéines totaux des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les teneurs en protéines totaux sont plus élevées dans les calices Thaï de Kaolack et Ziguinchor avec respectivement des valeurs de 11,34 et 10,71 g/100g. La plus faible valeur

est notée dans les calices Vimto de Fatick avec 8,56 g/100g (Figure 18). L'impact des zones de culture sur la variation de la teneur en protéines des calices semble peu important.

1.1.8. Vitamine C

Les résultats de l'analyse de la teneur en acides vitamine C sont illustrés par la figure suivante :

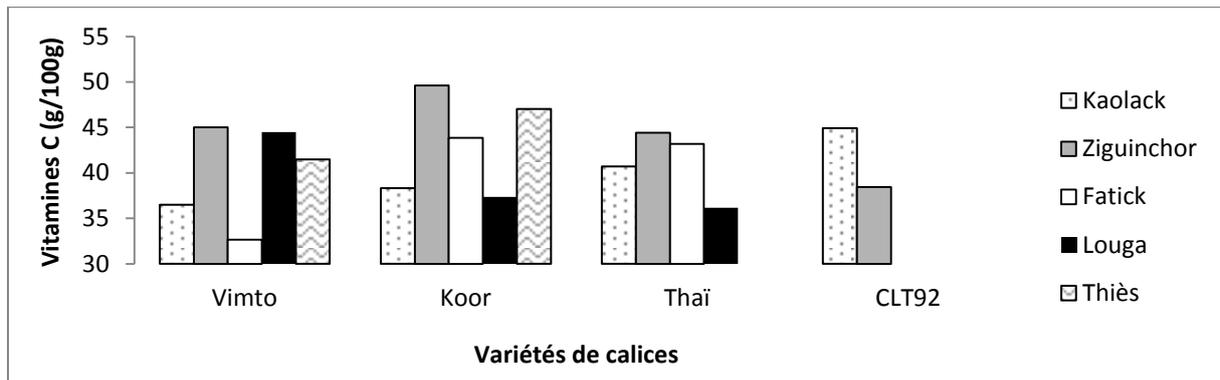


Figure 19 : Teneur en vitamine C des principales variétés de calices de Bissap dans 4 régions du Sénégal

Les teneurs en vitamine C sont plus élevées dans les calices de variété Koor de Ziguinchor et Thiès avec respectivement 49,62 et 47,00 g/100g. Les calices Vimto de Fatick présente des taux plus faible avec 32,67 g/100g (Figure 19).

1.1.9. Polyphénols totaux

La figure suivante permet d'illustrer les résultats obtenus dans la détermination de la teneur en lipides des calices de Bissap.

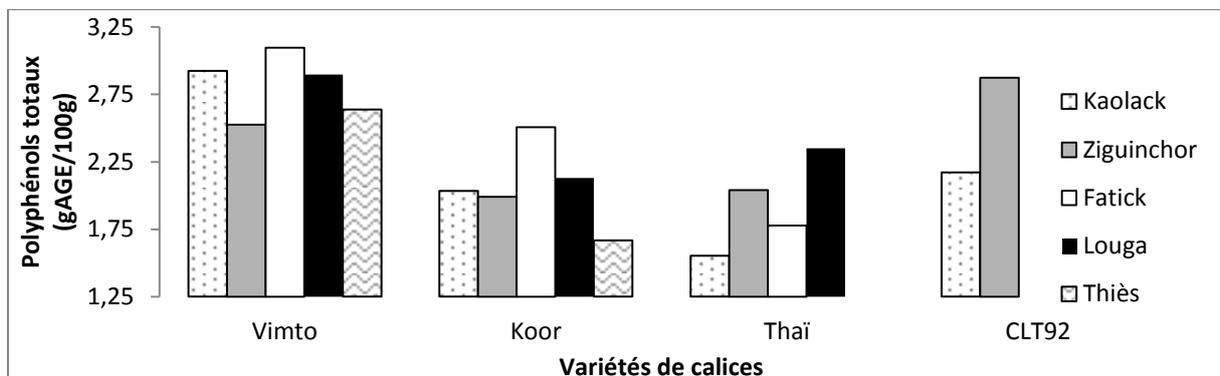


Figure 20 : Teneur en polyphénols totaux des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices Vimto de Fatick, de Kaolack et de Louga montrent des valeurs très proches avec respectivement 3,10, 2,92 et 2,90 g/100g. Les calices Thaï de Kaolack présentent les plus faibles teneurs en polyphénols avec une moyenne de 1,55 g/100g (**Figure 20**). Ces résultats montrent que les teneurs en polyphénols dans les calices de Bissap dépendraient très peu des zones de culture.

1.1.10. Anthocyanes totaux

Les résultats des analyses de la teneur en anthocyanes sont présentés dans la figure suivante :

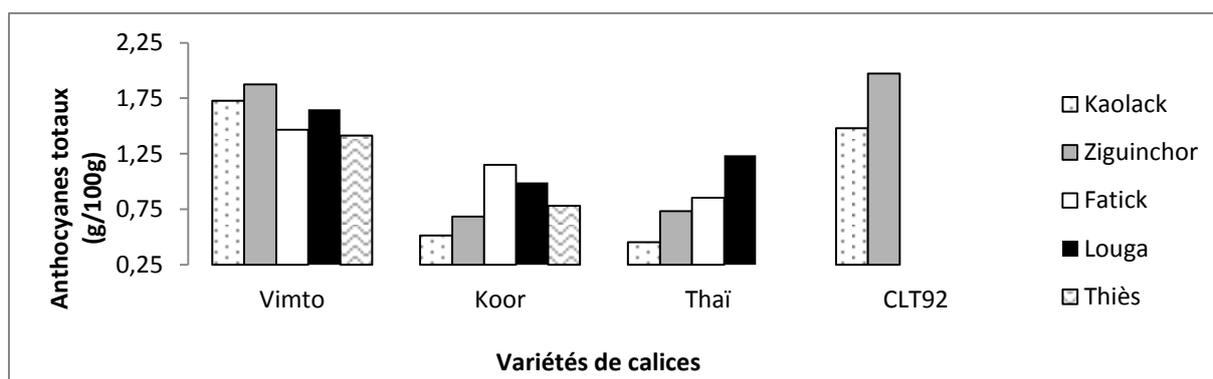


Figure 21 : Teneur en anthocyanes totaux des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices CLT92 et Vimto de Ziguinchor présentent teneurs en anthocyanes significativement plus élevées avec respectivement 1,97 et 1,87 g/100g. Les teneurs sont trois voire quatre fois moins importantes dans les calices Koor et Thaï de Kaolack avec des valeurs parfois inférieures à 0,6 g/100g (**Figure 21**). Ainsi, on peut constater que la teneur en anthocyanes est plutôt influencée par la variété de calices que par la zone de culture.

1.1.11. Paramètres de couleur

Les paramètres de couleur sont comparés individuellement et une analyse synthétique permettrait d'en tirer des renseignements utiles.

a. La clarté ou luminosité L*

La figure ci-dessous présente les résultats de la détermination du paramètre de couleur L*.

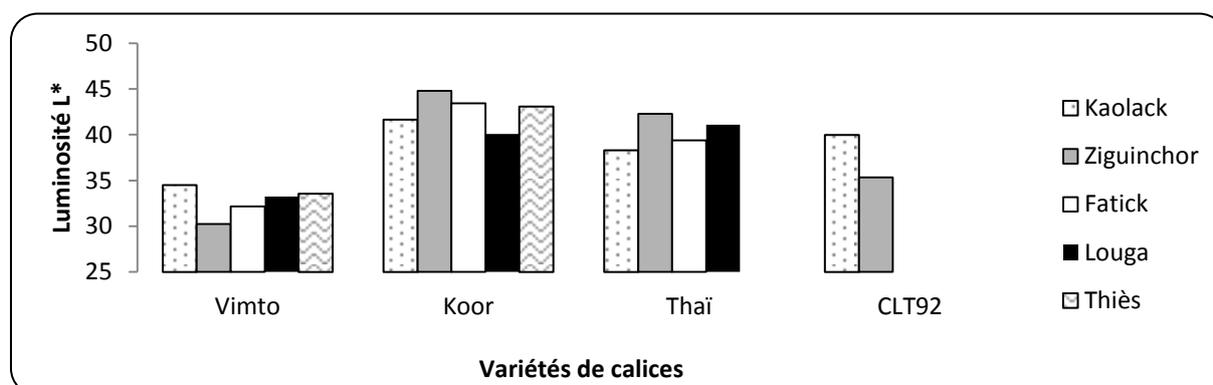


Figure 22 : Paramètre de couleur CIE L* (luminosité) des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Ce paramètre caractérise la capacité de l'échantillon à réfléchir plus ou moins la lumière. Les valeurs les plus élevées de L* sont notées sur les calices Koor de la zone de Ziguinchor avec 44,78. C'est aussi dans cette zone que la plus faible valeur est notée avec 30,26. La luminosité des calices varie sensiblement entre les échantillons indépendamment de la zone de culture et de la variété (Figure 22).

b. Paramètre de couleur a*

La figure ci-dessous présente les résultats de la détermination du paramètre de couleur a* :

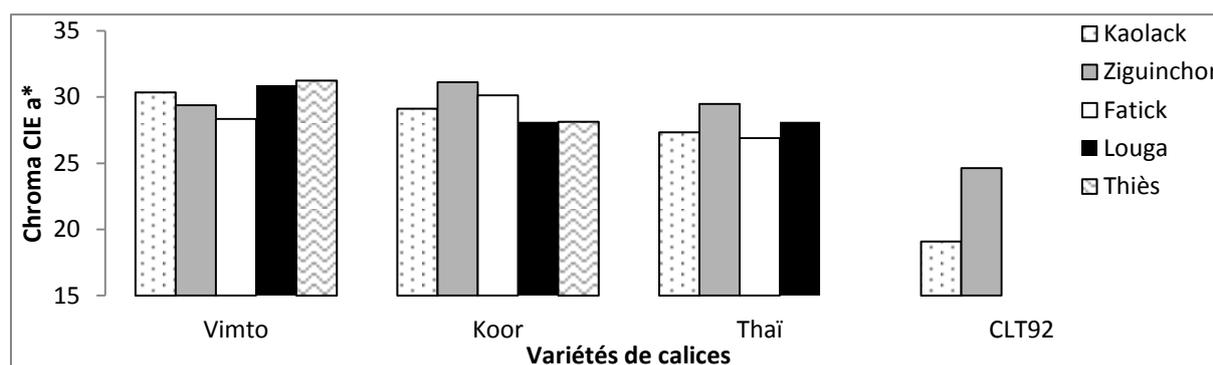


Figure 23 : Paramètre de couleur CIE a* des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les calices présentent des colorations rouges mais avec une intensité variable. Les calices Vimto de Thiès et Koor de Ziguinchor montrent les plus grandes valeurs de a* avec

respectivement 31,2 et 31,1. Les calices CLT92 de Ziguinchor et de Kaolack présentent les plus faibles valeurs avec respectivement 24,6 et 19,1 (**Figure 23**).

c. Paramètre de couleur b*

La figure ci-dessous présente les résultats de la détermination du paramètre de couleur b*.

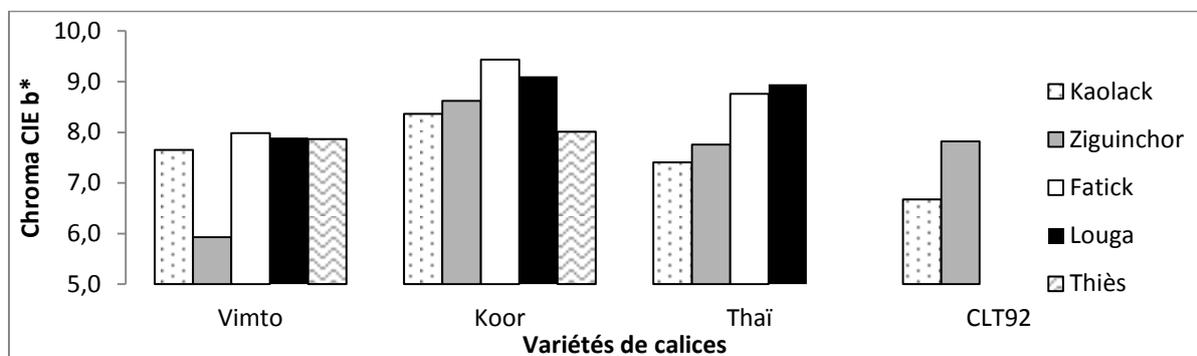


Figure 24 : Paramètre de couleur CIE b* des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Ce paramètre représente une nuance de couleur entre le bleu et le zone. Les valeurs de b* mesurés sont faibles (inférieures à 10) et ne semblent pas influencées par la zone de culture. Les calices Koor de Thiès et Louga présentent les plus grandes valeurs avec respectivement 9,4 et 9,1. La plus petite valeur est notée sur les calices Vimto de Ziguinchor. Les variations de l'indice de couleur b* entre les variétés de calices sont très faibles (**Figure 24**).

d. Paramètre de couleur CIE C* (Saturation de couleur)

La figure ci-dessous présente les résultats de la détermination du paramètre de couleur C*.

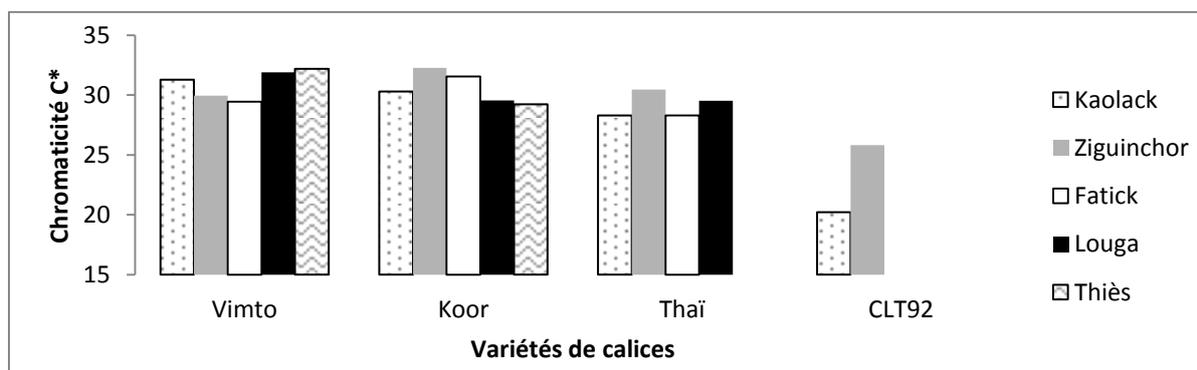


Figure 25 : Paramètre de couleur CIE C* (saturation de la coloration) des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Le paramètre C* mesure la saturation de la couleur. Les valeurs les plus élevées sont trouvées dans les calices Koor de Ziguinchor et Vimto de Thiès avec respectivement 32,3 et

32,2. Les calices CLT92 de Ziguinchor et de Kaolack avec respectivement 25,8 et 20,2 présentent les plus faibles valeurs (**Figure 25**).

e. La tonalité chromatique h^*

La figure ci-dessous présente les résultats de la détermination du paramètre de couleur h^* :

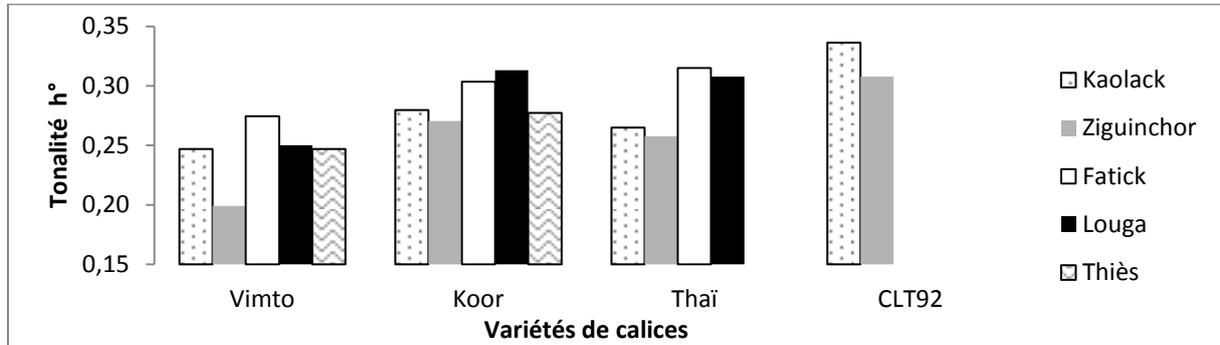


Figure 26 : Paramètre de couleur CIE h^* (tonalité) des principales variétés de calices de Bissap cultivées dans 4 régions du Sénégal

Les valeurs de la teinte h sont très faibles pour nos échantillons. Les calices CLT92 de Kaolack présentent la plus grande valeur de h^* avec 0,34. Les plus petites valeurs sont mesurées sur les calices Vimto de Ziguinchor avec h égal à 0,20 (**Figure 26**).

En définitive, les résultats montrent qu'il n'existe que très peu de corrélation entre les variables mesurées et l'origine géographique des calices de Bissap. Ainsi, dans la suite de nos travaux, nous tenterons de réaliser une identification des calices basée seulement sur leur composition.

1.2. Identification par analyse multivariée des variétés de calices

1.2.1. Caractéristiques physiques et sensorielles

Les moyennes présentées dans le tableau 18 illustrent la composition des calices de Bissap incluant les différentes régions de collecte.

Tableau 18 : Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des principales variétés de calices de Bissap cultivées au Sénégal.

Composition physicochimique	VIMTO	KOOR	THAI	CLT92
pH	2,28 ^a (0,10)	2,17 ^b (0,11)	2,27 ^a (0,07)	2,36 ^a (0,05)
Activité de l'eau	0,42 ^b (0,02)	0,45 ^a (0,04)	0,49 ^b (0,03)	0,44 ^b (0,06)
L*	32,7 ^d (1,5)	42,6 ^a (1,6)	40,26 ^b (1,5)	37,65 ^c (2,5)
a*	30,04 ^a (1,09)	29,32 ^a (1,20)	27,96 ^b (1,02)	21,86 ^c (3,03)
b*	7,46 ^b (0,81)	8,71 ^a (0,53)	8,22 ^a (0,68)	7,25 ^b (0,63)
C*	30,96 ^a (1,12)	30,59 ^a (1,21)	29,15 ^b (0,95)	23,03 ^c (3,07)
h°	0,24 ^c (0,03)	0,29 ^b (0,02)	0,29 ^b (0,03)	0,32 ^a (0,02)
Composition générale	VIMTO	KOOR	THAI	CLT92
Matière sèche totale (g.kg ⁻¹)	916 (12)	917 (7)	906 (17)	914 (12)
Cendres totaux (g.kg ⁻¹)	59,9 (6,2)	66,7 (10,3)	56,5 (5,0)	62,8 (5,7)
Protéines totaux (g.kg ⁻¹)	92,5 ^c (4,3)	103,5 ^b (3,1)	108,0 ^a (4,1)	93,1 ^c (3,1)
Acides amines libres (g.kg ⁻¹)	11,6 ^c (8,0)	20,1 ^b (4,1)	25,2 ^a (4,7)	12,1 ^c (1,4)
Acides amines totaux (g.kg ⁻¹)	40,2 ^b (3,6)	54,7 ^a (10,5)	61,9 ^a (9,9)	42,6 ^b (6,1)
Sucres totaux (g.kg ⁻¹)	101,1 ^a (11,3)	81,4 ^b (10,9)	74,7 ^b (10,4)	98,4 ^a (8,1)
Sucres réducteurs (g.kg ⁻¹)	83,8 ^a (12,0)	65,5 ^b (10,6)	51,3 ^c (7,4)	90,9 ^a (7,4)
Lipides totaux (g.kg ⁻¹)	6,6 ^c (0,4)	5,7 ^d (0,5)	8,7 ^a (0,5)	7,6 ^b (0,4)
Acidité titrable (mEq.kg ⁻¹)	271 (47)	299,9 (30)	272,9 (25)	265,0 (23)
Polyphénols totaux (g AGE.kg ⁻¹)	28,2 ^a (2,2)	20,7 ^b (2,8)	19,3 ^b (3,2)	25,2 ^a (3,9)
Anthocyanes totaux (g.kg ⁻¹)	16,3 ^a (1,8)	8,2 ^b (2,3)	8,2 ^b (3,0)	17,3 ^a (2,7)
Vitamine C (mg.kg ⁻¹)	400,3 (49,4)	425,7 (54,0)	407,9 (39,5)	416,8 (35,8)

Valeurs moyennes et écart type (entre parenthèse) de trois répétitions. Les moyennes avec la même lettre ne sont pas significativement différentes (Turkey, P > 0,05).

L'analyse de la variance (ANOVA) a montré des différences significatives (p<0,05) dans la composition des calices (**Tableau 18**). En effet, les 4 seuls paramètres non significativement différents sont la vitamine C, le taux de cendre, l'acidité titrable et la matière sèche. Les valeurs moyennes trouvées pour ces variables sont de 400 mg.kg⁻¹ pour la vitamine C, 61 g.kg⁻¹ pour les cendres totales, 277 mEq.kg⁻¹ pour l'acidité titrable et 920 g.kg⁻¹. Ces

résultats sont en accord avec les travaux réalisés sur les calices par Beschoff et al. (2014), Suliman et al.(2011) et Cissé et al. (2009). (Suliman, 2011; Bechoff et al. 2014; Cisse, Dornier, Sakho, Ndiaye, et al. 2009).

La valeur de la luminosité L^* moyenne des calices de 38,3 avec une variabilité significative entre les différentes variétés. La plus grande valeur de L^* est trouvée dans les calices de variété Koor et Thaï ; la variété Vimto montre la plus faible luminosité.

L'intensité de la coloration rouge, appréciée par l'indice de couleur a^* , est parfois utilisée pour la distinction des différentes variétés de calices. Dans notre étude, l'indice de couleur a^* des calices secs varie très peu entre les variétés Vimto Koor et Thaï avec une valeur moyenne de 29.

Par contre, la coloration rouge est moins intense au niveau de la variété CLT92. L'indice de chromaticité C^* qui mesure la saturation de la couleur est plus forte au niveau de la variété Vimto suivie des variétés Koor et Thaï. La variété CLT92 présente une chromaticité relativement faible.

L'indice de couleur b^* est plus important dans les calices de variétés Koor et Thaï. Les différences observées sur tous ces paramètres de couleur peuvent expliquer la variabilité globale de la coloration des calices

Concernant l'acidité, les échantillons de calices ont révélé un pH avec une valeur moyenne de 2,3. Cependant, les calices de la variété Koor présentent la plus forte acidité.

Les teneurs en lipides totaux sont significativement différentes selon les variétés. La quantité de lipides est plus importante dans les calices de variété Thaï avec des valeurs qui dépassent $8,5 \text{ g.kg}^{-1}$. Un taux de lipides plus faible ($1,6 \text{ g.kg}^{-1}$) est trouvé dans des calices de Bissap cultivés au Soudan (Suliman, 2011).

Les variétés CLT92 et Vimto contiennent les plus fortes quantités de sucres totaux et de sucres réducteurs avec des valeurs qui peuvent dépasser respectivement 80 et 100 g.kg^{-1} .

Les teneurs moyennes en protéines et en acides aminés totaux des calices sont respectivement de 87,5 et $50,1 \text{ g.kg}^{-1}$. Les acides aminés se trouvent à environ 350 g.kg^{-1} sous forme libre, le reste est réparti en petites peptides et protéines.

Les calices de variétés CLT92 et Vimto se distinguent particulièrement par des teneurs élevées en anthocyanes et en polyphénols totaux. Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Cissé et al.(2009) sur la caractérisation de ces calices (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009).

L'analyse de la variance montrant des différences significatives de compositions physicochimiques en fonction des variétés, il devient donc intéressant d'étudier les corrélations éventuelles entre ces paramètres.

1.2.2. L'analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse des valeurs propres montre que les composantes F1, F2 et F3 englobent 74 % de l'information. Une projection peut donc être réalisée d'abord sur les axes F1 et F2 qui représentent 62% de la variabilité puis sur les axes F1 et F3 qui représentent 55% de la variabilité. Les polyphénols, les anthocyanes, les protéines, les acides aminés, les sucres réducteurs, les sucres totaux et la clarté L* contribuent à environ 85 % de la composante F1 (**Figure 27a**). Les paramètres de couleur a* et C* présentent une contribution supérieure à 68 % sur la composante F2. Les lipides totaux et le pH sont mieux projetés entre les axes F1 et F3 car ces variables présentent des contributions plus importantes sur F3 (**Figure 27b**).

Les résultats de l'analyse de la matrice de corrélation (**Tableau 19**) et des biplots des composantes principales (**Figure 27**) mettent en évidence différentes relations entre les variables analysées. On peut d'abord constater des corrélations logiques entre les anthocyanes et les polyphénols, les sucres réducteurs et les sucres totaux, les acides aminés et les protéines.

Par ailleurs, des relations moins évidentes sont notées entre certaines variables. En effet, on observe que les sucres totaux et les sucres réducteurs présentent des corrélations positives avec les anthocyanes et les polyphénols. Ainsi, ces paramètres évoluent dans le même sens dans les calices d'hibiscus. Par contre, les teneurs en acides aminés et en protéines sont anticorrélées à celles des sucres, anthocyanes et polyphénols ; ces paramètres varient dans le sens inverse dans les calices. Enfin, certaines variables comme le pH, les lipides totaux et l'indice de couleur b* présentent des corrélations nulles avec les autres paramètres.

La projection des individus sur les composantes montre que les calices des variétés Thaï et Koor présentent des caractéristiques physicochimiques proches. Cependant, les calices de variété Thaï se distinguent par leur plus forte teneur en lipides totaux et les calices de variété Koor par leur faible pH et leur forte chromaticité C*. D'autre part, les calices des variétés Vimto et CLT92 se particularisent par leurs fortes teneurs en anthocyanes et en polyphénols mais aussi en sucres. Les travaux de Cissé et al. (2009) (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009) montrent que la variété CLT92 récemment introduite au Sénégal présentait des ressemblances au niveau sensoriel à la variété Vimto qui est très appréciée des consommateurs.

Tableau 19 : Matrice de corrélation (Pearson) des variables dans l'analyse de la composition des calices de Bissap.

Variables	Anthocyanes	Protéines	AAT	AAL	Lipides	Sucres totaux	Sucres réducteurs	pH	L*	a*	b*	C*	h*	Aw
Polyphénols	0,831	-0,741	-0,611	-0,768	-0,197	0,529	0,498	0,289	-0,682	0,174	-0,120	0,160	-0,234	-0,235
Anthocyanes		-0,783	-0,723	-0,830	-0,038	0,594	0,670	0,380	-0,740	-0,143	-0,415	-0,169	-0,189	-0,236
Protéines			0,707	0,835	0,280	-0,593	-0,668	-0,098	0,668	0,155	0,408	0,182	0,169	0,507
AAT				0,898	0,252	-0,356	-0,644	-0,360	0,506	0,039	0,367	0,065	0,225	0,188
AAL					0,331	-0,453	-0,668	-0,279	0,631	0,054	0,339	0,078	0,197	0,328
Lipides						-0,150	-0,239	0,341	-0,060	-0,330	-0,241	-0,340	0,085	0,379
Sucres totaux							0,796	0,182	-0,600	0,033	-0,646	-0,018	-0,542	-0,475
Sucres réducteurs								0,375	-0,574	-0,107	-0,657	-0,154	-0,416	-0,337
pH									-0,344	-0,119	-0,295	-0,138	-0,110	0,349
L*										-0,081	0,572	-0,035	0,535	0,331
a*												0,318	0,997	-0,643
b*													0,387	0,518
C*														-0,585
h*														0,174

Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05

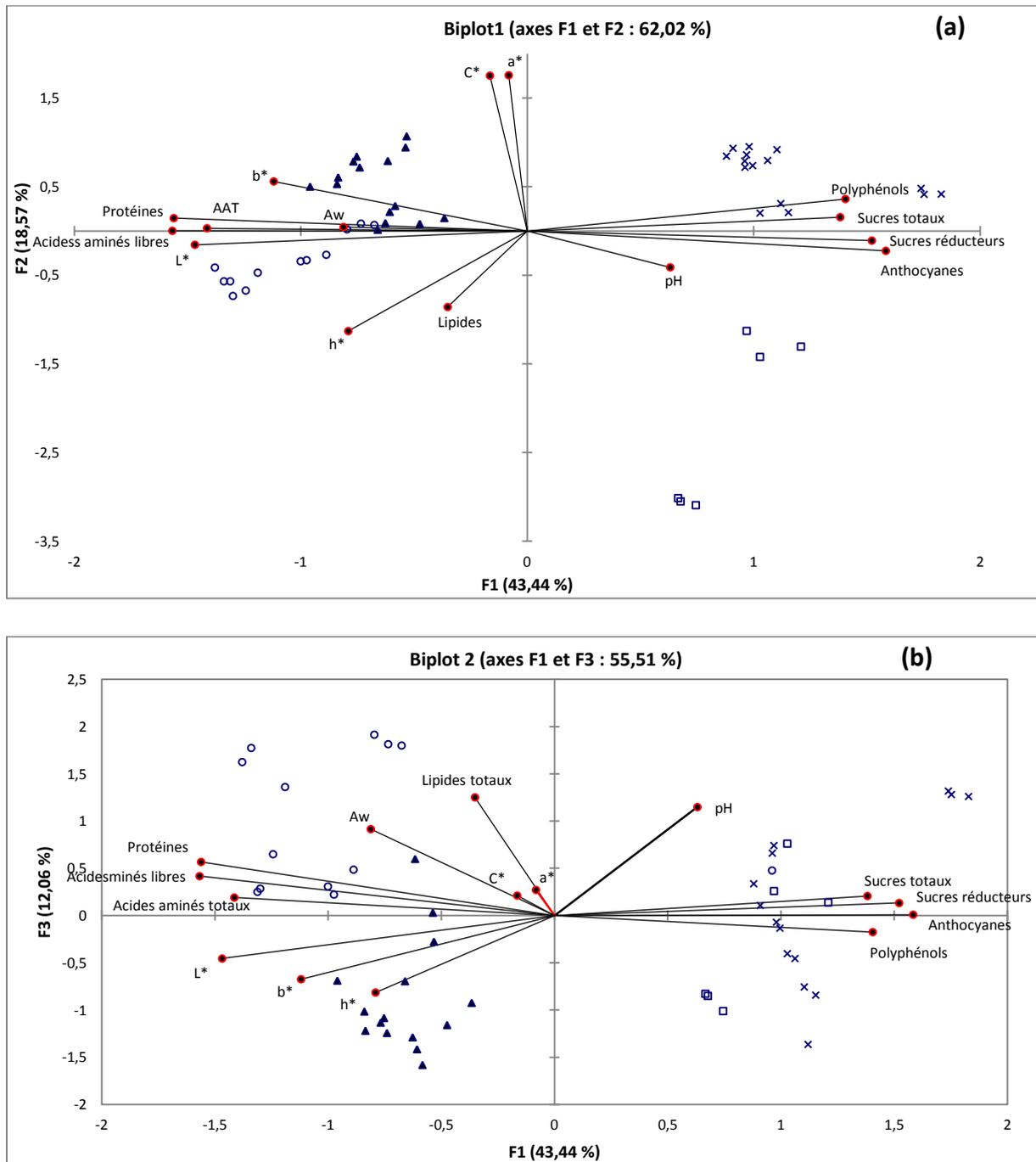


Figure 27 : Biplots des composantes principales tracés avec les axes F1 et F2 (a) et les axes F1 et F3 (b) des variétés de calices de Bissap.

×, Vimto ; o, Thaï ; □, CLT92 ; ▲, Koor

L'ACP a permis globalement d'identifier les paramètres caractéristiques des variétés et d'identifier les redondances. Une fois les multicollinéarités éliminées, les variables non corrélées peuvent être choisies afin d'optimiser la discrimination tout en permettant une certaine simplicité d'analyse.

1.2.3. Analyse factorielle discriminante (AFD)

Les résultats obtenus dans l'ACP mettent en évidence des tendances claires de composition physico-chimique entre les différentes variétés de calices. L'AFD est ainsi utilisé pour tester différentes combinaisons de variables non corrélées et mettre en évidence la meilleure pour identifier les variétés de calices d'hibiscus. Par conséquent, les variables les plus simples à mesurer ont été retenues dans le cas des multicolinéarités.

L'AFD a été utilisée à la fois dans un but de discrimination et dans un but de prédiction des variétés de calices. Ainsi, les données expérimentales obtenues ont été divisées en deux parties. La première, correspondant aux échantillons prélevés dans les 4 régions (Kaolack, Fatick, Ziguinchor et Louga), a permis de réaliser la discrimination des variétés. La deuxième, contenant des calices variétés Vimto et Koor provenant de la région de Thiès, a permis de valider la prédiction des variétés de calices.

Globalement, les combinaisons de variables ont donné des résultats satisfaisants. Cependant, le meilleur résultat a été obtenu en utilisant la chromaticité C*, les teneurs en lipides totaux, en protéines et en anthocyanes totaux. En effet, ces variables ont permis de réaliser une classification des variétés avec un taux de réussite de 100 % (Tableau 20). En plus, les échantillons de prédiction ont été identifiés sans aucune confusion (Figure 28).

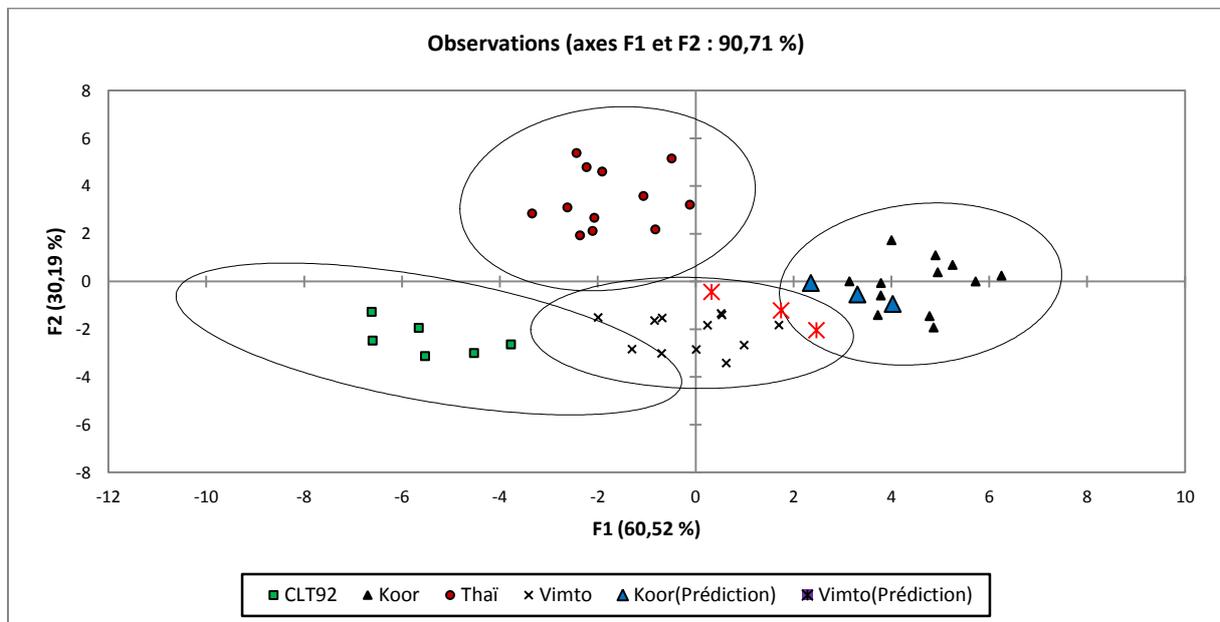


Figure 28 : Plot de discrimination en AFD de 4 variétés de calices de Bissap construit en utilisant les anthocyanes totaux, les lipides, les protéines et l'indice de couleur C*

Tableau 20 : Matrice de confusion pour les échantillons d'estimation en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques : anthocyanes totaux, lipides totaux, protéines totaux et clarté C* des calices de Bissap

de \ Vers	CLT92	Koor	Thaï	Vimto	Total	% Réussite
CLT92	6	0	0	0	6	100
Koor	0	12	0	0	12	100
Thaï	0	0	12	0	12	100
Vimto	0	0	0	12	12	100
Total	6	12	12	12	42	100

Une identification peut aussi être réalisée avec les paramètres suivants : anthocyanes totaux, lipides totaux, protéines totaux et le pH (**Figure 29**). Cette méthode a permis de classer les échantillons de variétés Thaï et Koor avec une réussite de 100 % (**Tableau 21**). Par contre, avec un pourcentage de classification de 66 %, les calices de la variété CLT92 sont parfois confondus à ceux de la variété Vimto. Cette confusion, due à des compositions physico-chimiques proches entre ces deux variétés (Vimto et CLT92), est notée dans les travaux de Cissé et al. (2009) (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009).

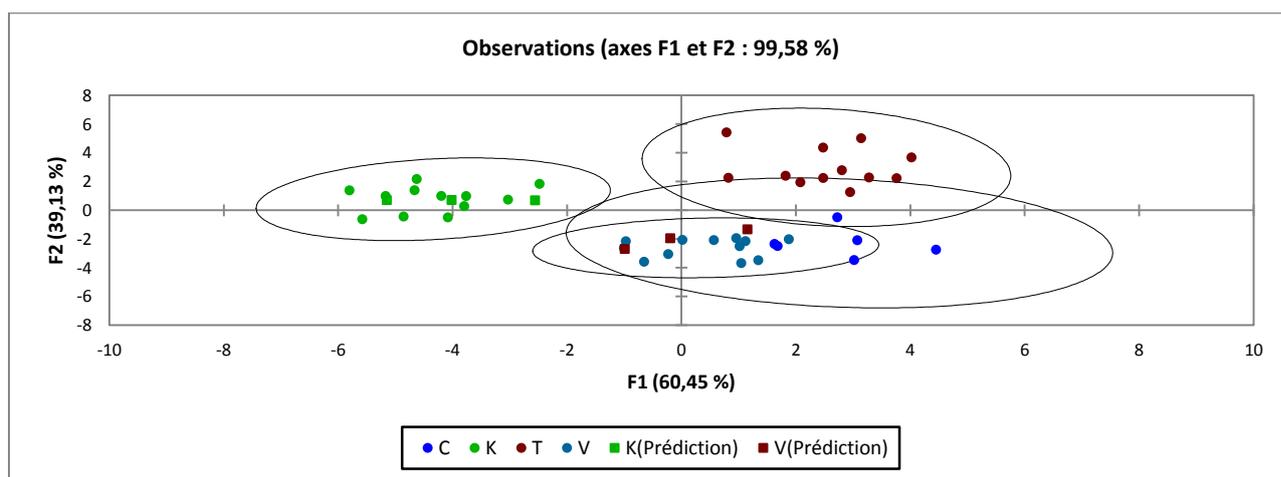


Figure 29 : Plot de discrimination en AFD de 4 variétés de calices de Bissap construit en utilisant les anthocyanes totaux, les lipides totaux, les protéines totaux et le pH

Tableau 21 : Matrice de confusion pour les échantillons d'estimation en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques : anthocyanes totaux, lipides totaux, protéines totaux et pH des calices de Bissap

de \ Vers	CLT92	Koor	Thaï	Vimto	Total	% réussite
CLT92	4	0	0	2	6	66,67%
K00R	0	12	0	0	12	100,00%
THAI	0	0	12	0	12	100,00%
VIMTO	0	0	0	12	12	100,00%
Total	4	12	12	14	42	95,24%

1.3. Identification du profil des composés phénoliques des calices

La figure ci-dessous présente les chromatogrammes obtenus par analyse HPLC des extraits de calices de Bissap :

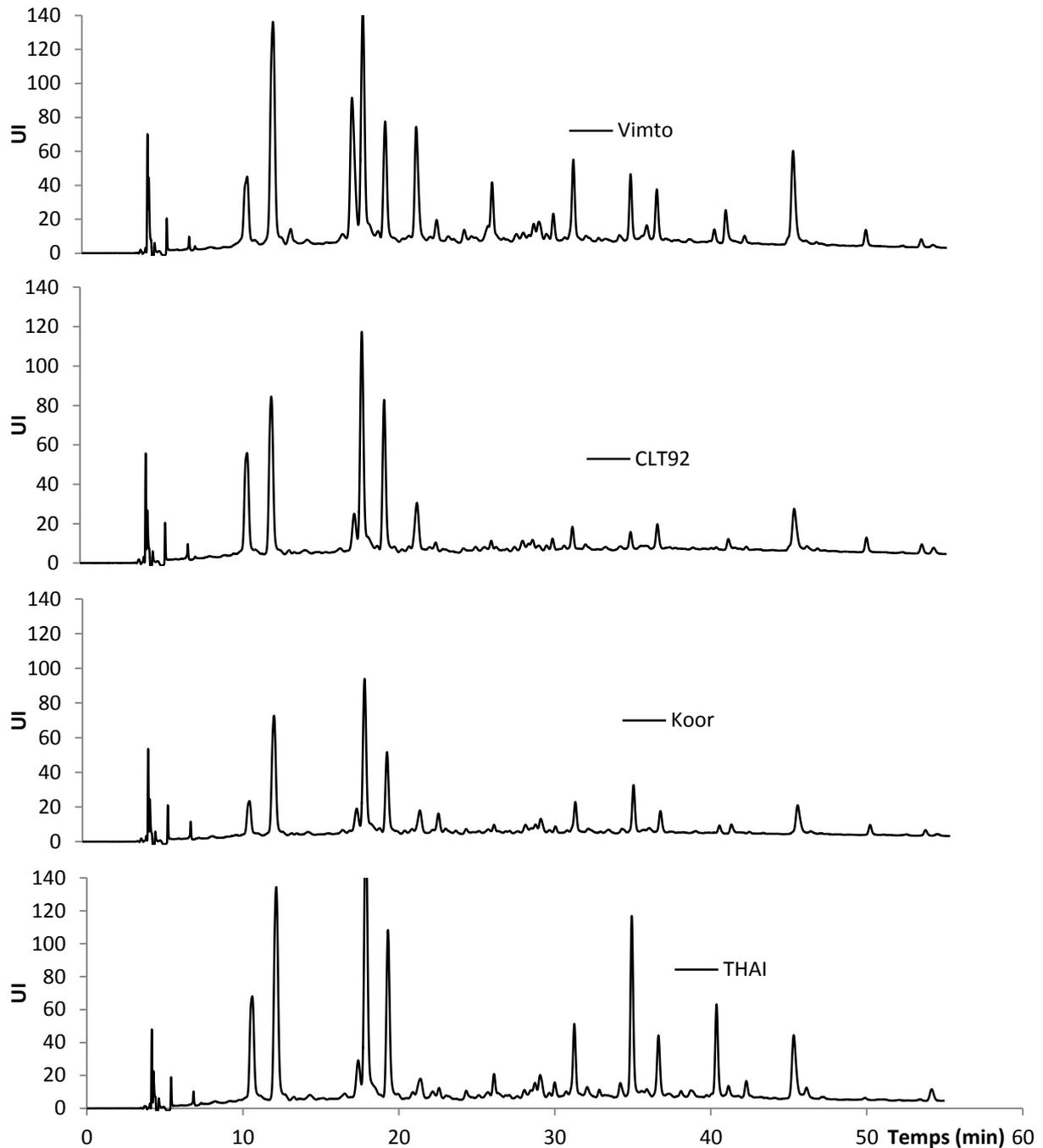


Figure 30 : Chromatogrammes à 360nm des calices des 4 principales variétés de Bissap cultivées au Sénégal.

Les analyses réalisées ont montré que les calices des 4 variétés de calices de Bissap présentaient les mêmes profils en polyphénols (**Figure 30**). Cependant, une simple comparaison des pics

chromatographiques permet de constater des variabilités de concentrations selon les polyphénols considérés.

L'identification des composés phénoliques a été réalisée sur la base des spectres UV-visible, des masses des ions moléculaires et des ions fragments ainsi que des données de la littérature. Les données spectrale, chromatographique et les masses moléculaires des composés obtenues par HPLC-MS sont résumées dans le tableau 22.

Tableau 22 : Caractéristiques des chromatogrammes HPLC-MS des extraits de calices de Bissap

Numéro de pic	Temps de rétention Tr (min)	Longueur d'onde λ_{\max} (nm)	MS (-) m/z	MS ² m/z
1	16,5	300sh, 322	353	191(100%), 179 (75%)
2	22,5	276, 524	595	355/300
3	23,6	300sh, 325	353	191 (100%), 179 (<10%)
4	24,9	300sh, 325	353	179/173 (~100%), 191 (<10%)
5	26,6	279, 516	579	339/285
7	33,4	254, 303sh, 350	611	316
9	35,3	304sh, 327	335	161 (100%) 179/135
10	36,1	254, 352	741	609, 300
11	37,2	264, 352	479	316
12	38,3	255, 352	595	463, 300
13	41,6	255, 353	609	301
14	43,4	256, 354	463	301
15	46,7	265, 349	593	285

Les résultats de l'analyse HPLC/MS permettent d'identifier plusieurs composés phénoliques dans les calices. Il s'agit notamment des anthocyanes, des flavonols et des acides phénoliques.

1.3.1. Caractérisation des acides phénoliques

Les pics 1, 3 et 4 constituent des isomères acide caféique quinique (**Figure 31**). Ces composés sont caractérisés en MS⁻ par ion moléculaire de masse m/z égale à 353 [M-H]⁻ ; ils présentent aussi les masses $m/z = 191$ [M-H-cafféoyl] et $m/z = 179$ [acide caféique] en MS². Les ions de masses m/z de 191 (100%) et 179 (75%) en MS² correspondant au pic 1 ($T_R = 16,5$ min et $\lambda_{max} = 325$ nm), montrent qu'il s'agit de l'acide 3-caféoylquinine. Le pic 3 ($T_R = 23,6$ min et $\lambda_{max} = 322$ nm) présente des ions de masse m/z de 191 (100%) et $m/z = 179$ (<10%) qui caractérise l'acide 5-caféoylquinique. Le pic 4 ($T_R = 24,9$ min et $\lambda_{max} = 325$ nm) est identifié comme étant celui de l'acide 4-caféoylquinique avec ions de masse $m/z = 179/173$ (~100%) et $m/z = 191$ (<10%) De nombreux travaux ont permis d'identifier ces fragments caractéristiques en HPLC-MS (Clifford et al. 2003),(Barros et al. 2012),(Narváez-Cuenca, Vincken, et Gruppen 2012) . L'analyse montre aussi la présence de l'acide shikimique correspondant au pic 9 (**Figures 31**). avec un ion moléculaire de masse $m/z = 335$ [M-H]⁻ et en MS² les fragments $m/z = 161$ (100%) et $m/z = 179/13$ (Zhang et al. 2013).

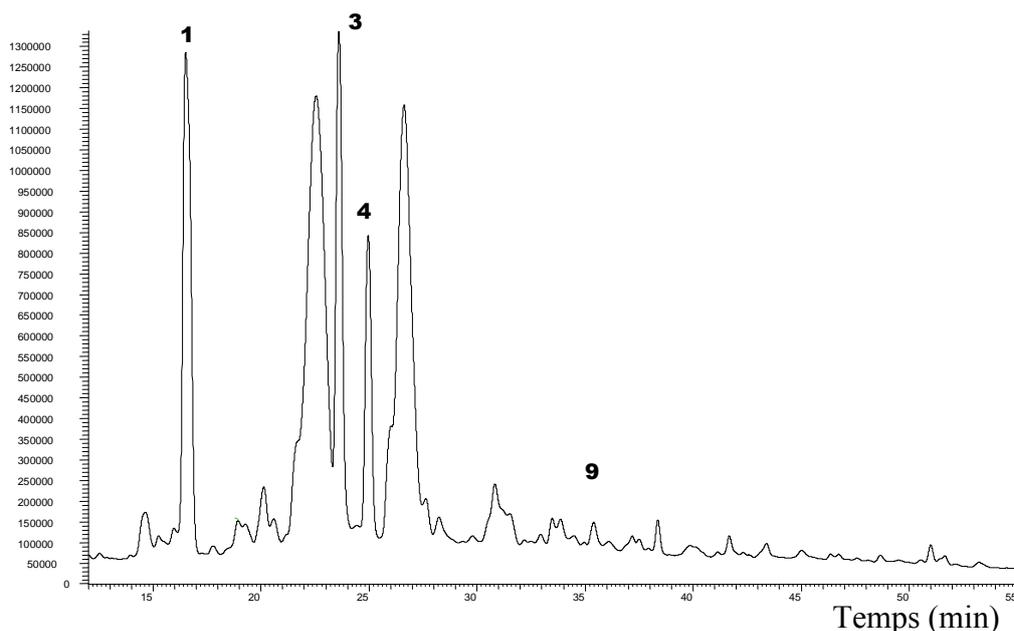


Figure 31 : Chromatogramme à 280 nm des extraits de calices de Bissap

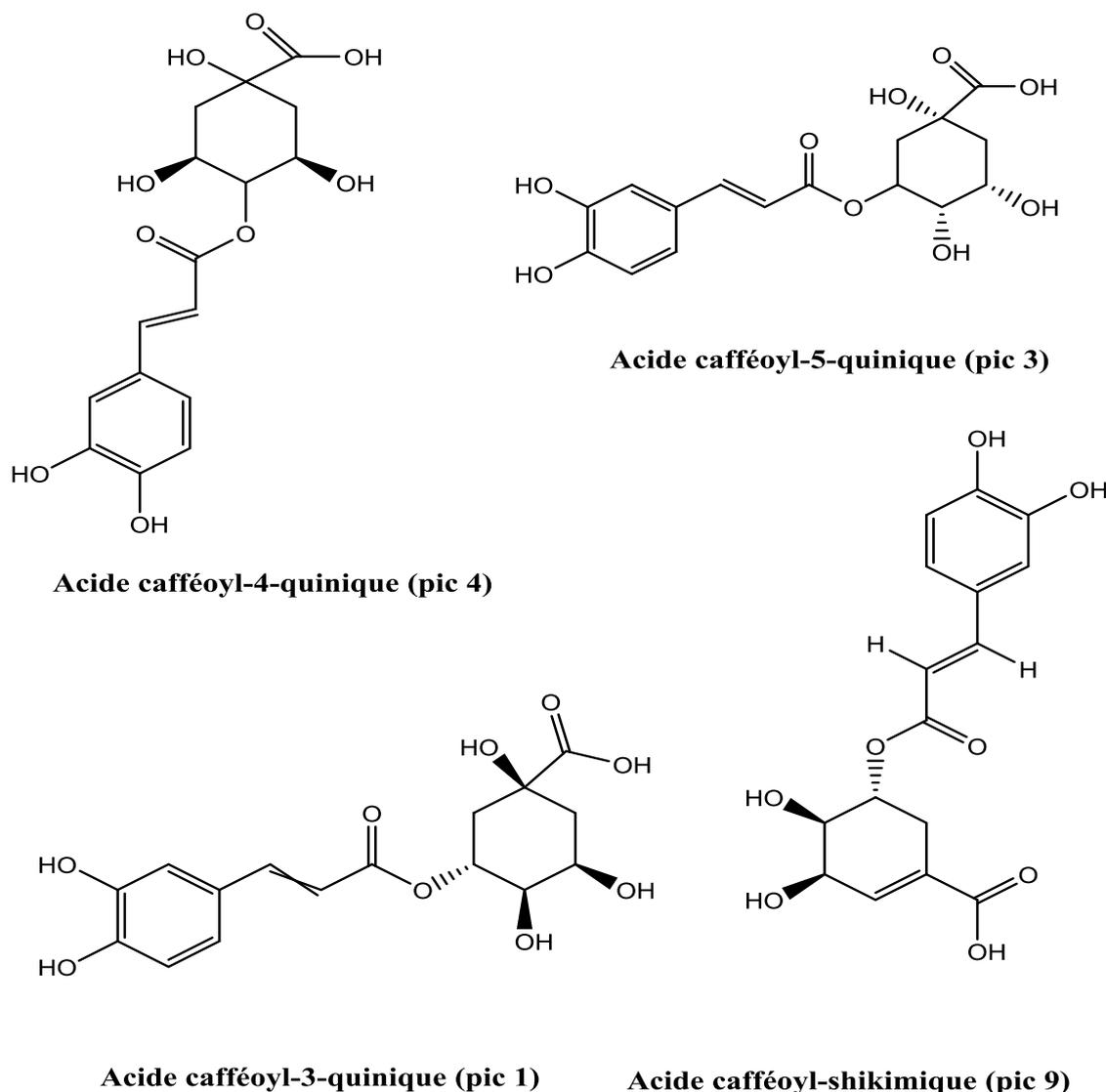


Figure 32 : Acides phénoliques identifiés dans les calices de Bissap

1.3.2. Caractérisation des anthocyanes

Les anthocyanes identifiés dans les calices sont présentés sur la **figure 33**. Le pic 2 ($T_R = 22,5$ min et $\lambda_{max} = 524$ nm) correspond à la delphinidine sambubioside. La masse m/z 295 $[M-H]^-$ correspond à l'ion moléculaire ; en MS^2 nous avons les masses m/z 300 $[M\text{-glucose-xylose}]^-$ et m/z 355 (Wei et al. 2011). Le pic 5 ($T_R = 26,6$ min et $\lambda_{max} = 516$ nm) est identifié comme étant la cyanidine sambubioside avec l'ion moléculaire $m/z = 579$ $[M-H]$ et en MS^2 les fragments m/z 285 $[M\text{-glucose-xylose}]^-$ et m/z 339 (Wei et al. 2011) ; (Gavrilova et al. 2011). Les pics 6 et 8 présentent les mêmes caractéristiques UV-visible et les fragmentations de leurs ions moléculaires (m/z 767 et 751) laissent penser aux dérivés de la delphinidine et de la cyanidine Sambubioside. Cependant, ces composés n'ont pu être formellement identifiés.

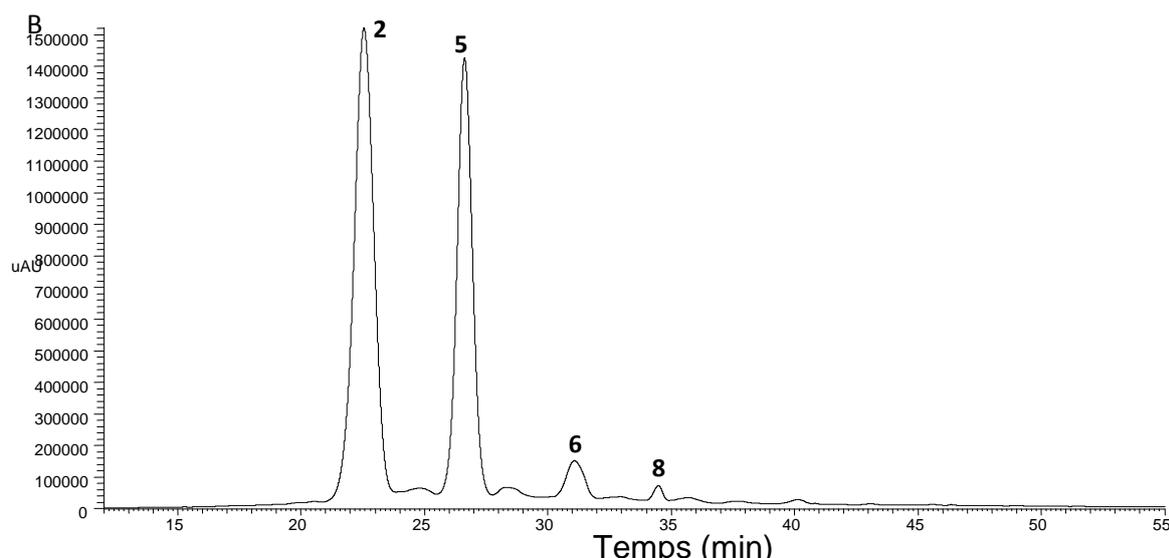
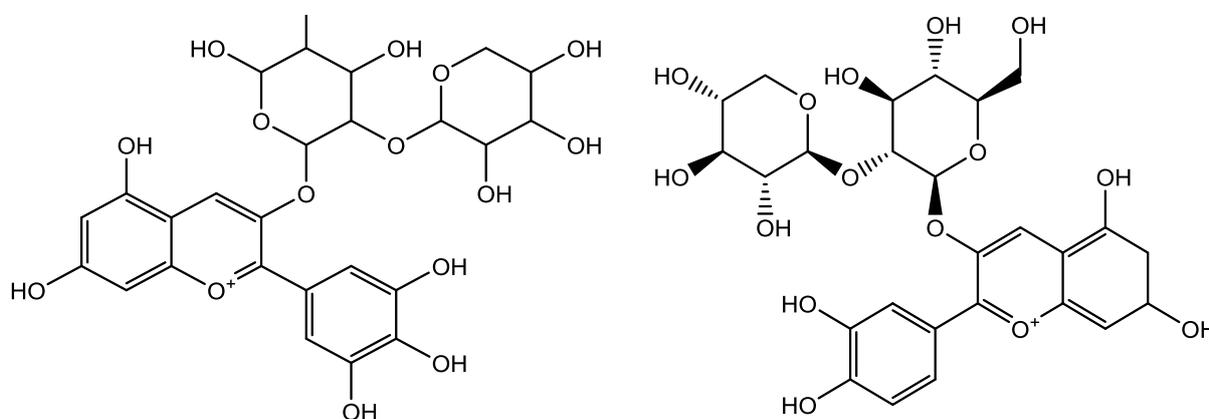


Figure 33 : Chromatogramme à 510 nm des extraits de calices de Bissap



Delphinidine 3-O-Sambubioside (pic 2)

Cyanidine 3-O-Sambubioside (pic5)

Figure 34 : Anthocyanes majoritaires des calices rouges d'*Hibiscus sabdariffa* : Delphinidine 3-O-Sambubioside et Cyanidine 3-O-Sambubioside

1.3.3. Caractérisation des flavonols

L'analyse montre la présence de nombreux flavonols dans les calices de Bissap (**Figure 35**). En effet, le pic 7 ($T_R = 33,4$ min et $\lambda_{max} = 350$ nm) avec un ion moléculaire m/z 611 $[M-H]^-$ et fragment en MS^2 de $m/z = 316$ correspond au myricétine sambubioside. Le pic 10 ($T_R = 36,1$ min et $\lambda_{max} = 352$ nm) identifié comme le quercétine rutinoside pentoside présente un ion moléculaire $m/z = 741$ $[M-H]^-$ et les masses m/z 609 et 300 (Simirgiotis et Schmeda-Hirschmann 2010). Le pic 11 ($T_R = 37,2$ min et $\lambda_{max} = 352$ nm) avec un ion moléculaire $m/z = 479$ et un fragment en MS^2 à $m/z = 316$ est identifié comme étant le myricétine hexoside (Fang et al. 2007). Le pic 12 ($T_R = 38,3$ min et $\lambda_{max} = 352$ nm) présente un ion moléculaire $m/z = 595$ $[M-H]^-$ et les fragments $m/z = 463$ et $m/z = 300$ est la quercétine sambubioside (Fernández-Arroyo et al. 2011). Le pic 13 ($T_R = 41,6$ min et $\lambda_{max} = 353$ nm) correspond à la

quercétine rutinoside ; il montre un ion moléculaire m/z 609 $[M-H]^-$ et en MS^2 les fragments $m/z = 301$ et $m/z = 300$ (Li et al. 2013; Marks, Mullen, et Crozier 2007). Le pic 14 ($T_R = 43,4$ min et $\lambda_{max} = 354$ nm) montre un ion moléculaire $m/z = 463$ $[M-H]^-$ et un fragment $m/z = 301$ et MS^2 (Barros et al. 2012; Marks, Mullen, et Crozier 2007). Le pic 15 ($T_R = 46,7$ min et $\lambda_{max} = 349$ nm) correspondant avec un ion moléculaire $m/z = 593$ $[M-H]^-$ et le fragment $m/z = 285$ est le Kampférol rutinoside (Fernández-Arroyo et al. 2011; Barros et al. 2012).

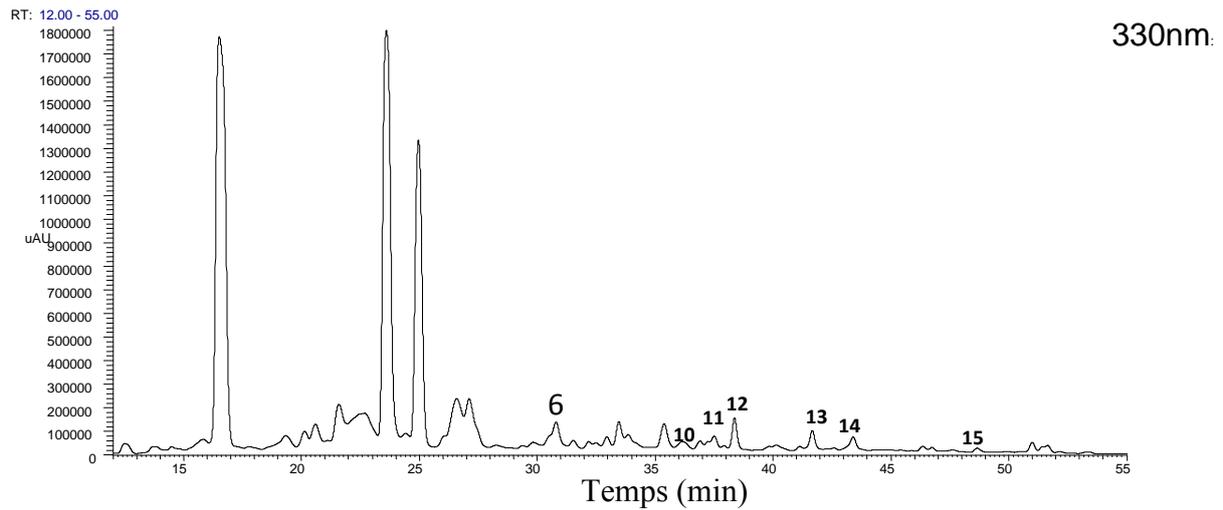
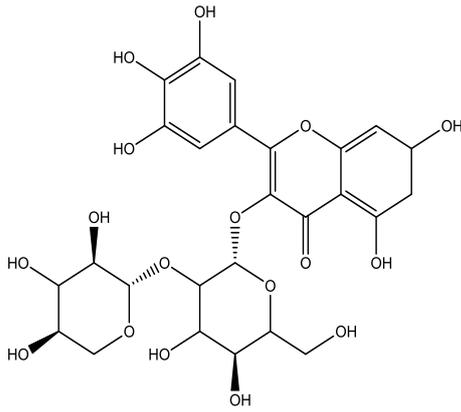
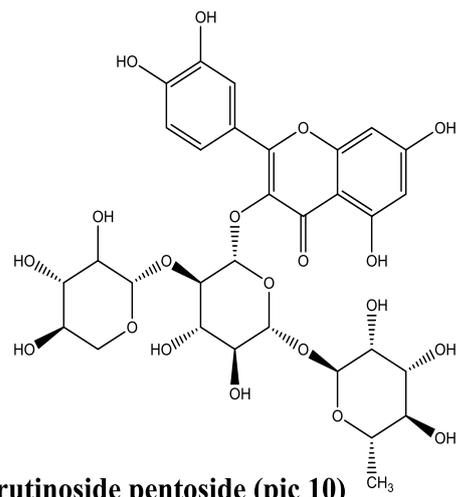


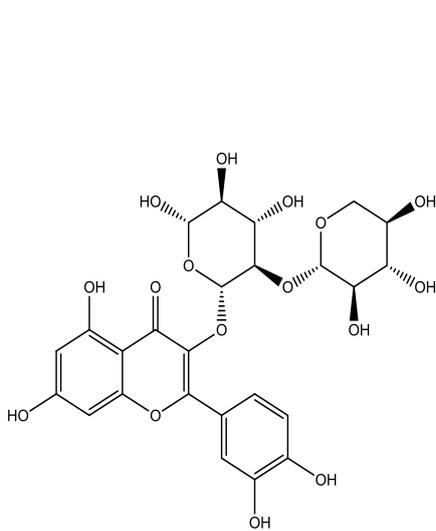
Figure 35 : Chromatogramme à 330 nm des extraits de calices de Bissap



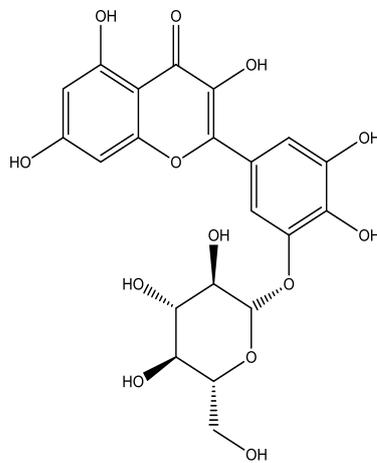
Myricétine Sambubioside (pic 7)



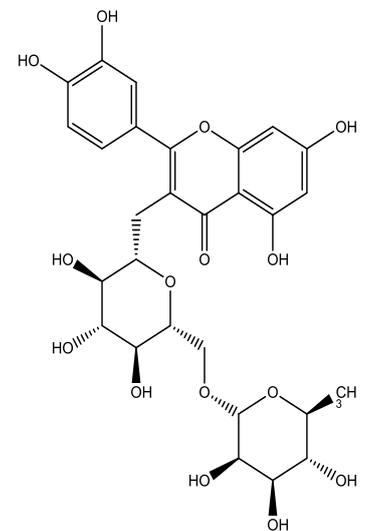
Quercétine rutinoside pentoside (pic 10)



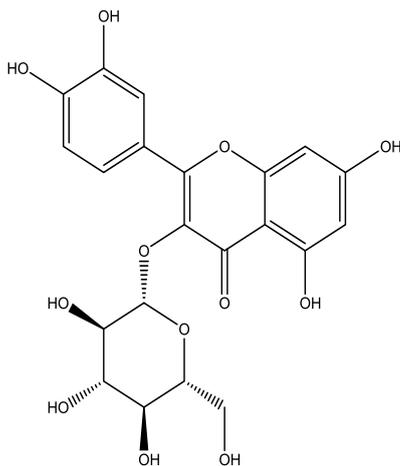
Quercétine Sambubioside (pic 12)



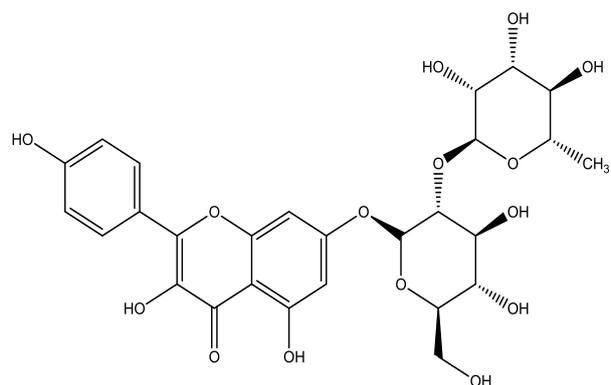
Myricétine hexoside (pic 11)



Rutine (pic 13)



Quercétine hexoside (pic 14)



Kampférol rutinoside (pic 15)

Figure 36 : Flavonols identifiés dans les calices rouges de Bissap

1.4. Etude de la stabilité des anthocyanes des calices pendant le stockage

1.4.1. Cinétique de dégradation des anthocyanes

L'évolution de la teneur en anthocyanes dans les calices sec de Bissap a été suivie pendant une durée de 3 mois. L'étude a porté sur les calices des variétés Koor et Vimto qui sont les plus consommées au Sénégal. L'objectif est de déterminer la stabilité des anthocyanes au cours de la conservation à différentes températures.

Une diminution de la teneur en anthocyanes des calices est observée pendant leur stockage. Elle est proportionnelle à la température. La régression linéaire indique que la dégradation des anthocyanes dans les calices suit une cinétique de réaction d'ordre 1 (**Figure 37**). La même régression linéaire est notée dans des travaux sur des anthocyanes d'extraits de calices. (Cisse et al. 2012; Idham, Muhamad, et Sarmidi 2012a; Idham, Muhamad, et Sarmidi 2012b; Aurelio, Edgardo, et Navarro-Galindo 2008). Plusieurs auteurs ont trouvé une dégradation des anthocyanes d'ordre 1 dans d'autres fruits tels que l'orange rouge, la canneberge et le mûre (Hadjal et al. 2013; Moldovan et al. 2012; Chisté, Lopes, et De Faria 2010; Ahmed, Shivhare, et Raghavan 2004).

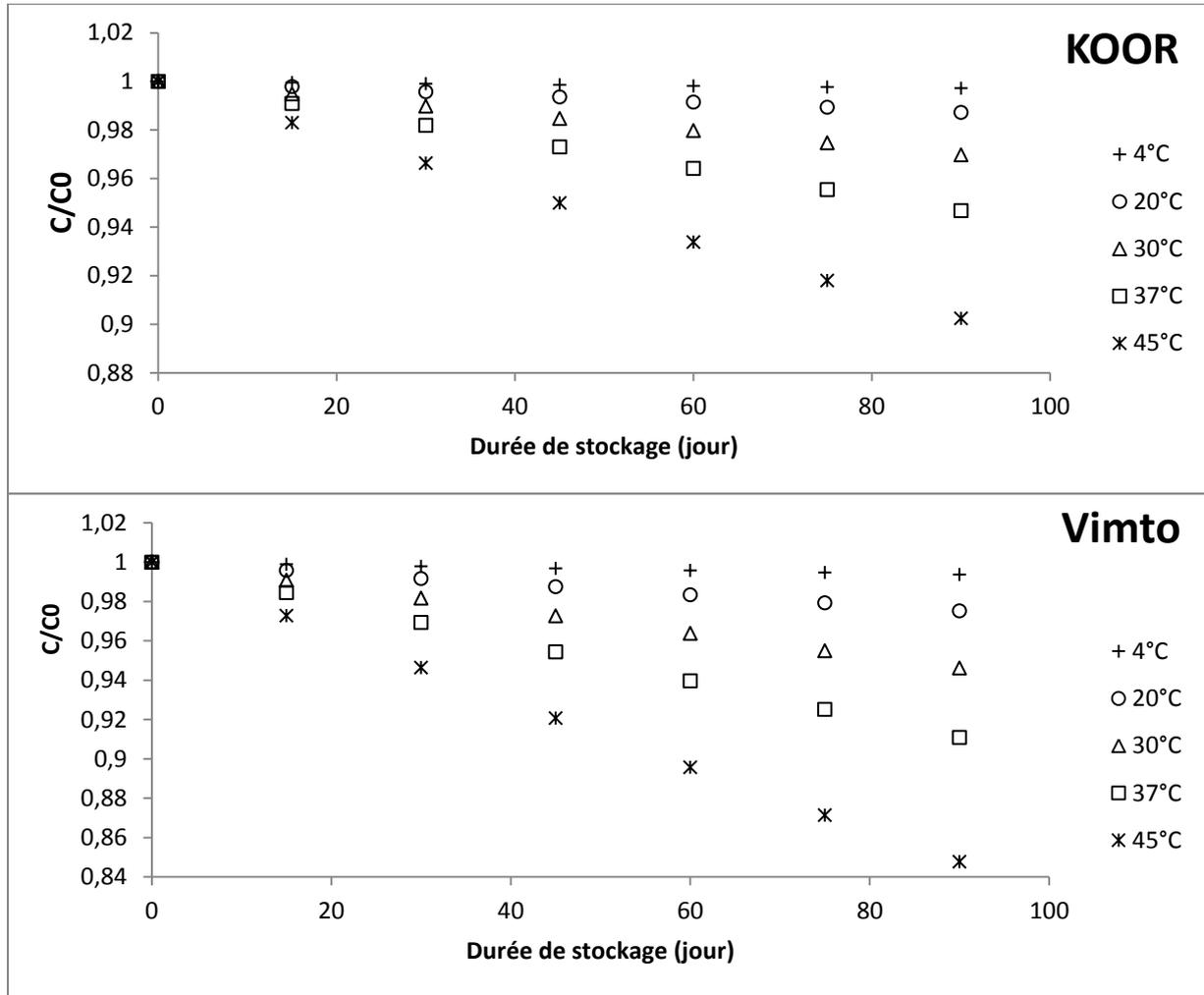


Figure 37 : Evolution de la teneur en anthocyanes des calices de Bissap au cours du stockage

Les vitesses de dégradation des anthocyanes pendant le stockage des calices sont présentées dans le tableau 23. Ces résultats montrent que la dégradation augmente fortement avec la température de stockage. Ainsi, dans les calices de variété Koor, la constante de dégradation k varie de $0,39 \cdot 10^{-8}$ à $1,32 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ entre 30 et 45 °C. De même, dans les calices de variété Vimto cette vitesse k passe de $0,71 \cdot 10^{-8}$ à $2,13 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ entre 30 et 45 °C. Ces résultats confirment les nombreux travaux qui ont mis en évidence l'influence de la température sur la dégradation des anthocyanes (Harbourne et al. 2008; Jiménez et al. 2010; LIU, CAO, et PAN 2011).

Les résultats montrent également que la dégradation des anthocyanes dans les calices varie sensiblement avec la variété. En effet, la vitesse de dégradation des anthocyanes est plus élevée dans les calices de variété Vimto que dans les calices de variété Koor (**Tableau 23**). Nous constatons ainsi qu'à la température de 20 °C les constantes de vitesse k sont de $0,16 \cdot 10^{-8}$ et de $0,32 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ respectivement pour les calices de variété Koor et Vimto. De même, à une température plus élevée de 37 °C, cette vitesse varie entre $0,70 \cdot 10^{-8}$ et $1,2 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ entre ces deux variétés de calice. Nous pouvons en déduire que la durée de conservation des calices de variété Koor est plus longue que celle des calices de variétés Vimto.

Tableau 23 : Constantes de vitesse, durée de demi-vie et durée de destruction décimales des anthocyanes de deux variétés de calices de Bissap pendant le stockage entre 4 et 45 °C

Calices	Température (°C)	Valeurs expérimentales		Valeurs prédites avec le modèle d'Arrhenius	
		k $10^{-8} (\text{s}^{-1})$	$t_{1/2}$ (mois)	k $10^{-8} (\text{s}^{-1})$	$t_{1/2}$ (mois)
Variété Koor	4	0,058 (-)	463	0,035	764
	20	0,201 (0,006)	133	0,163	164
	30	0,420 (0,014)	64	0,393	68
	37	0,639 (0,028)	42	0,703	38
	45	1,094 (0,036)	24	1,324	20
Variété Vimto	4	0,104 (-)	258	0,079	340
	20	0,303 (0,024)	88	0,318	84
	30	0,691 (0,035)	39	0,707	38
	37	1,234 (0,047)	22	1,198	22
	45	2,027 (0,011)	13	2,130	13

La stabilité des anthocyanes totaux est plus importante dans les calices secs d'hibiscus que dans les extraits aqueux. Plusieurs auteurs ont en effet trouvé des constantes de vitesse plus élevées dans leurs travaux sur les extraits aqueux riches en anthocyanes. Ainsi, la constante de dégradation à 37 °C est de $1,2 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans les calices de variété Vimto alors qu'elle est de $17,36 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans les extraits aqueux d'hibiscus (Cisse et al. 2012) et de $3,16 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ dans les jus de grenade (Alighourchi et Barzegar 2009). C'est ainsi que les durées de demi-vie des anthocyanes dans les calices d'hibiscus sont supérieures à 3 ans pour un stockage à 30 °C.

Cette stabilité est d'autant plus importante lorsque les calices sont stockés à basse température (**Figure 38**). Ainsi, pour une durée de conservation de 3 mois à 4 °C, nous obtenons des pertes en anthocyanes de 0,5 % pour la variété Koor et 1,3 % pour la variété Vimto. Par contre, ces pertes deviennent plus importantes avec l'accroissement de la température de stockage. Par exemple, pour la même durée de stockage, mais à 20 et 45 °C, les pertes passent respectivement de 1,6 à 11,7 % pour la variété Koor et de 2,9 à 16,5 % pour la variété Vimto.

La stabilité des anthocyanes dans les calices est sans doute due à la faible présence de l'eau dans cette structure cristalline. Markakis et al. (1957), observent que les anthocyanes sont stables lorsqu'elles sont stockées sous forme cristalline sèche ou sur chromatogrammes de papier séchés. Cela suppose que l'eau est impliquée dans les réactions de dégradation (Markaris, Livingston, et Fellers 1957). D'autres auteurs ont aussi démontré que la disponibilité de l'eau est essentielle pour la dégradation des anthocyanes (Erlandson et Wrolstad 1972). En effet, l'eau elle-même peut être nécessaire pour la dégradation du pigment. Markakis et al (1957) proposent deux mécanismes hydrolytiques ; l'un étant une hydrolyse de la liaison glycosidique pour conduire au aglycone instable et l'autre impliquant une ouverture de la liaison pyrilium pour former une chalcone substituée (Markaris, Livingston, et Fellers 1957).

Ces résultats sont comparables à ceux de Gradinaru et al. (2003) qui montrent que la vitesse de dégradation des anthocyanes dans un lyophilisat d'extrait de calices d'*Hibiscus. sabdariffa* L. augmente avec l'activité de l'eau surtout lorsque celle-ci dépasse une valeur de 0,53(Gradinaru et al. 2003)

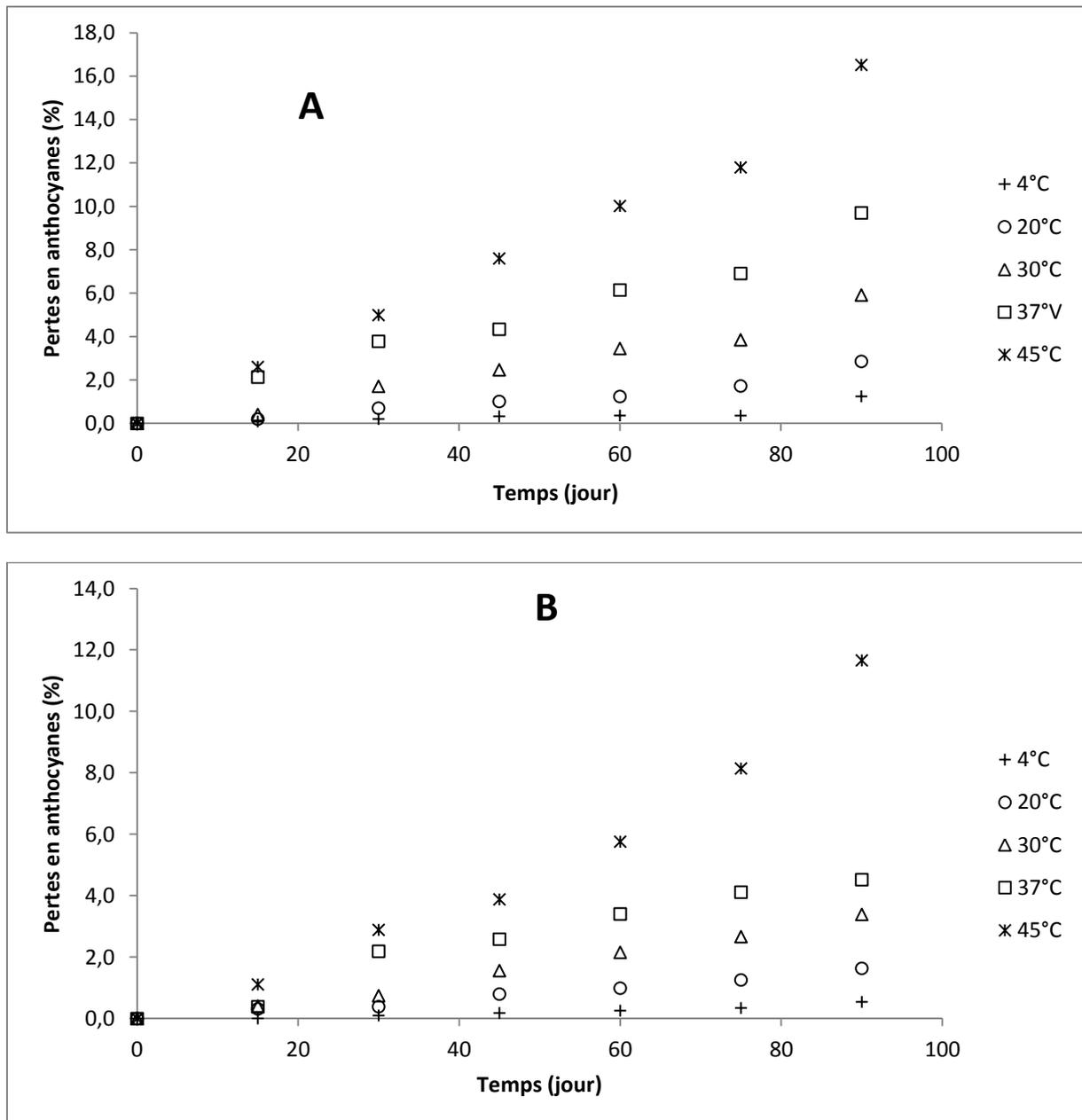


Figure 38 : Evolution des pertes en anthocyanes au cours du stockage des calices de variétés Vimto (A) et Koor (B)

1.4.2. Modélisation et prédiction

Les paramètres cinétiques des modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring sont présentés dans le tableau 24. Ces modèles confirment que la dégradation des anthocyanes dépend fortement de la température. Les énergies d'activation sont de 65 kJ mol^{-1} dans les calices Koor et de 59 kJ mol^{-1} dans les calices Vimto. Cette faible différence montre que ces calices présentent la même sensibilité à l'élévation de la température. L'enthalpie d'activation des calices est de 15 kJ mol^{-1} pour la variété Vimto et de 30 kJ mol^{-1} pour la variété Koor.

Tableau 24 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes des calices de Bissap suivant les modèles d'Arrhenius, d'Eyring et de Ball

Calices	Modèle d'Arrhenius		Modèle d'Eyring		Modèle de Ball	
	k_{30} ($10^{-8} s^{-1}$)	E_a ($kJ mol^{-1}$)	ΔS^* ($J mol^{-1} K^{-1}$)	ΔH^* ($kJ mol^{-1}$)	D_{30} (10^3 jour)	z ($^{\circ}C$)
Vimto	0,71 (0,03)	59,0 (2,2)	-122 (7)	56,0 (2,2)	3,78 (0,12)	31,3 (1,2)
Koor	0,39 (0,03)	65,0 (4,1)	-107 (13)	62,0 (4,1)	6,82 (0,44)	28,3 (1,7)

Afin d'évaluer la qualité de la prédiction de la dégradation des anthocyanes dans les calices, une comparaison a été effectuée entre les résultats expérimentaux et ceux obtenus avec les modèles (**Figure 39**). Le paramètre utilisé est le pourcentage de perte en anthocyanes pendant le stockage aux températures de 4, 20, 30, 37 et 45 °C. La différence maximale entre les pertes expérimentales et les pertes calculées ne dépasse pas en valeur absolue à 2 % pour les 3 modèles de prédiction. La figure 39 montre la variation des pertes en anthocyanes calculée avec les modèles en fonction des pertes expérimentales. Les coefficients de corrélation sont en moyenne supérieurs à 0,95 pour les trois modèles. En plus, la progression des points autour de la première bissectrice montre que la prédiction avec les modèles est de très bonne qualité.

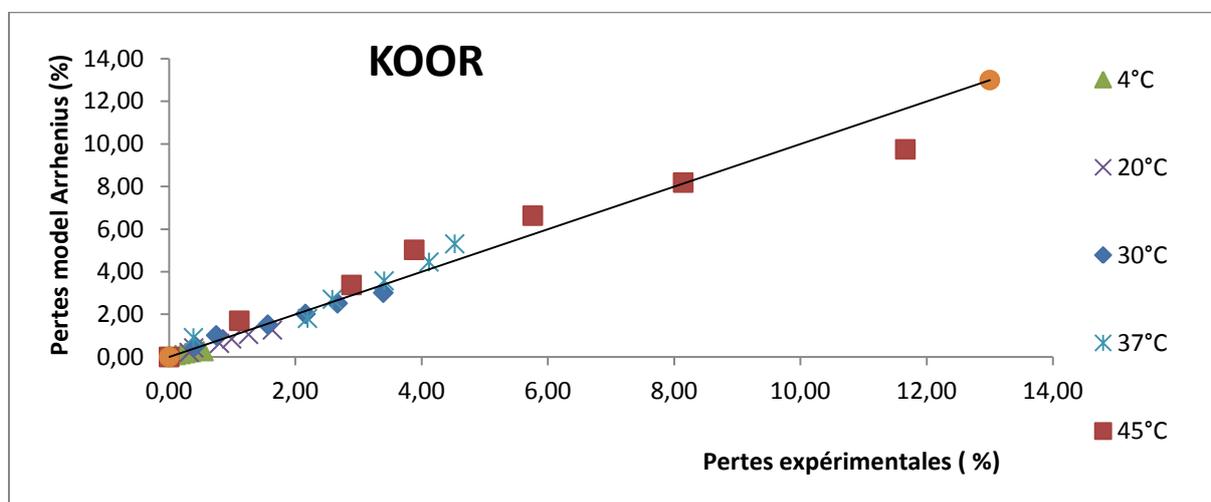


Figure 39 : Comparaison des pertes en anthocyanes dans les calices de Bissap entre le modèle de prédiction d'Arrhenius et les résultats expérimentaux

A la suite de l'étude de l'influence des conditions de stockage sur la stabilité des anthocyanes, nous aborderons la préparation des boissons et sirops à partir des calices de Bissap.

2. Procédés traditionnels de production des boissons et sirops à base de calices de Bissap

Avec la valorisation des produits locaux, les calices de Bissap sont de plus en plus transformés en boissons et sirops. Cependant, les modes de préparation varient d'un producteur à l'autre. L'étude des diagrammes de fabrication ainsi que les analyses des paramètres physico-chimiques et microbiologiques permettront de proposer des méthodes d'amélioration de ces produits.

2.1. Diagramme de fabrication des boissons et sirops

Les figures 40 et 41 montrent les différentes étapes des procédés de fabrication des boissons et sirops à base de calices de Bissap dans deux entreprises. Les procédés de fabrication présentent quelques variabilités selon les producteurs. Ces différences reposent essentiellement sur quelques étapes et notamment celle de la formulation. Les producteurs des entreprises de Dakar et Kaolack utilisent un mélange de calices de deux variétés (Vimto et Koor) dans une proportion de 50/50. L'entreprise Thiès fabrique la boisson et le sirop à partir d'un concentré aqueux de Bissap. Le schéma du procédé fabrication des sirops de Bissap pour les entreprises Dakar et Kaolack sont exactement les mêmes que celle de la boisson. En outre, le même équipement est utilisé. Les différences observées sont liées dans les proportions calice/eau au niveau de l'étape de formulation et les températures utilisées pendant le traitement thermique.

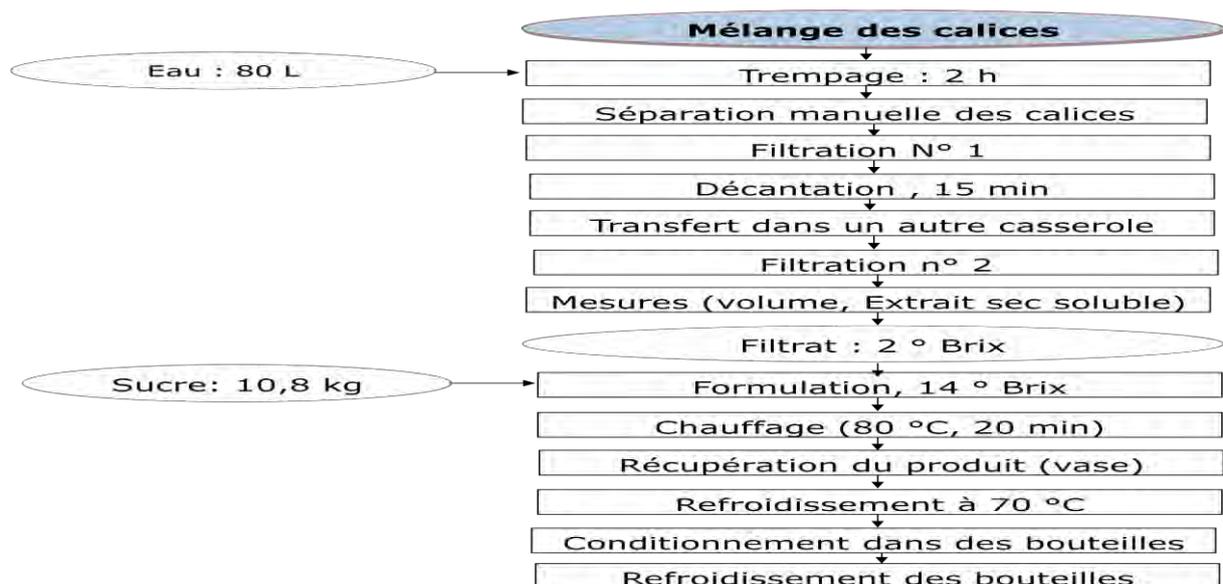


Figure 40 : Diagramme de fabrication d'une boisson (nectars) à base de calices de Bissap

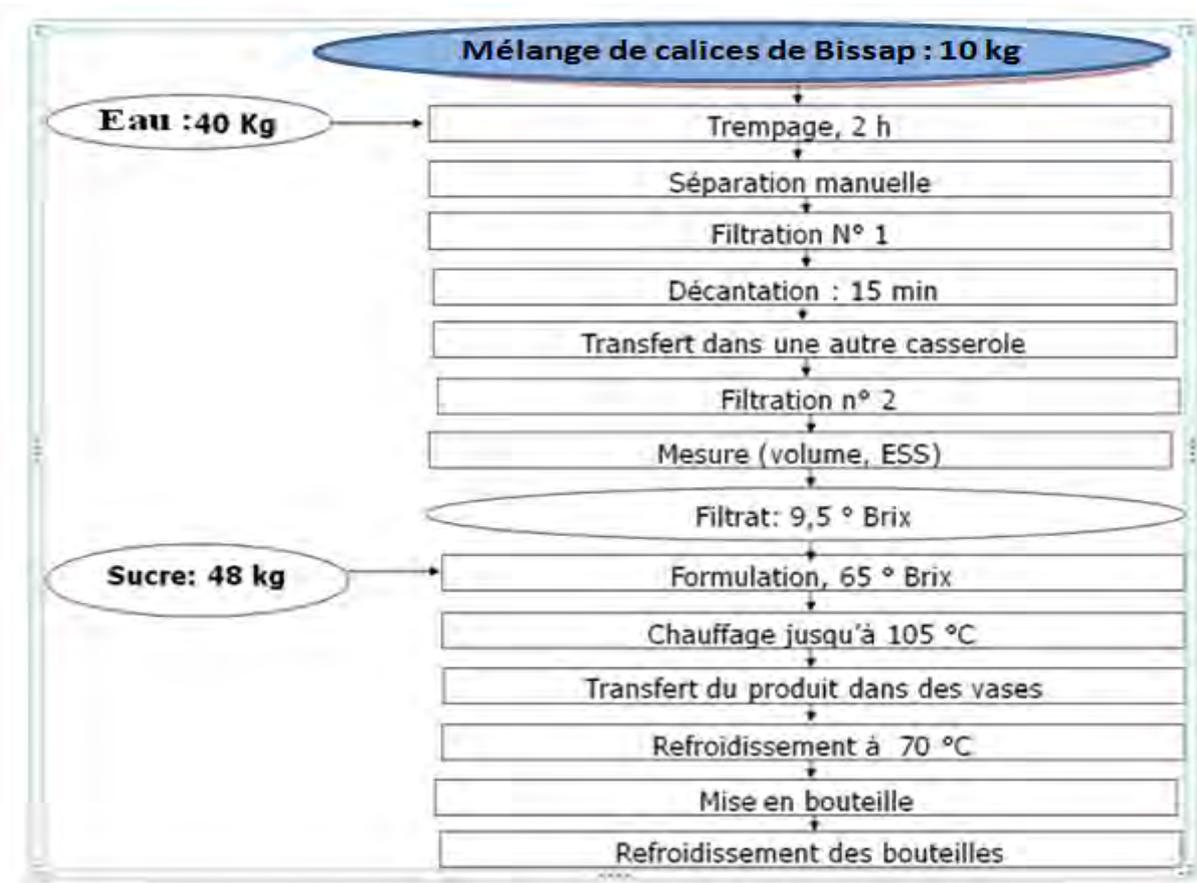


Figure 41 : Diagramme de fabrication d'un sirop à base de calices de Bissap

2.2. Analyse des étapes de fabrication des boissons et sirops

La production des boissons et sirops de Bissap est réalisée en suivant un certain nombre d'étapes.

2.2.1. Le triage

Cette opération consiste à éliminer les impuretés contenues dans les calices : herbes, tiges, cailloux, etc. Les calices couverts de moisissures ou présentant un aspect ou une odeur de fermentation sont aussi retirés. Seuls les calices mûrs de couleur rouge, bien secs et sans odeurs particuliers sont retenus. Le matériel utilisé est constitué de bassines en plastiques, de toiles en plastique et d'une table de travail.

2.2.2. Le trempage

Les calices placés dans des bacs ou bassines sont mélangés à l'eau de robinet à la température ambiante d'environ 25 °C (**Figure 42**). Le mélange est d'abord agité puis laissé au repos pendant une durée variable (2 à 4 heures) selon les entreprises.

Les ratios calice/eau (kg/kg) utilisés dans la production de boisson sont de 1/20 et 1/26 respectivement pour les entreprises de Dakar et de Kaolack. Celles de Thiès utilisent un mélange concentré d'hibiscus et eau avec un ratio 1/8.

Dans la production des sirops, afin d'obtenir des extraits plus concentrés, les proportions en calices sont plus élevées. Ainsi, les ratios utilisés sont d'environ 1 kg de calices pour 5 kg d'eau. Cela permet d'avoir un goût acceptable lors de la dilution des sirops.



Figure 42 : Trempage des calices de Bissap en vue de la préparation des boissons

Dans les procédés traditionnels de fabrication des boissons de Bissap, l'extraction aqueuse est réalisée par traitement thermique. Deux méthodes sont généralement utilisées : l'infusion ou la décoction.

Dans le cas de l'infusion, de l'eau bouillante est versé sur les calices ; le mélange est agité puis refroidi. La décoction consiste à extraire les pigments en versant les calices dans de l'eau maintenue en ébullition pendant une certaine durée. Ces deux méthodes ont l'avantage d'accélérer le temps d'extraction des pigments et de réduire considérablement la charge microbienne provenant des calices, du matériel et des manipulateurs. Cependant, ces méthodes d'extraction présentent comme inconvénients une importante dégradation des anthocyanes du Bissap.

Le rendement et la durée de l'extraction des pigments anthocyaniques sont conditionnés par le ratio calice-eau et la taille des calices. Les meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec des calices entiers pour un ratio calice-eau de 1/25 (kg/kg). Cependant, ce ratio est aussi proche de celui utilisé pour la production des boissons à base de fruits. Par ailleurs, le broyage des calices permet de faciliter la diffusion des pigments dans la phase aqueuse et de réduire ainsi la durée de la macération. Mady et al.(2012) montrent qu'avec réduction des calices jusqu'à une taille de 150 µm de diamètre, le rendement en anthocyanes est maximisé (63%) et le temps d'extraction est réduit à 10 minutes (Cissé et al. 2012).

Cependant, l'utilisation de calices finement broyés impose la mise en place d'un système de filtration performant pour éviter la présence de particules solides dans l'extrait aqueux d'hibiscus. L'utilisation de concentré de fruit est très courante dans la production de boisson. Les concentrés ont l'avantage d'être simples d'utilisation et de réduire les opérations et par conséquent la main d'œuvre. Cependant, la qualité sensorielle des boissons dépendra fortement de celle des concentrés, ce qui impose un choix rigoureux des fournisseurs de cette matière semi-finie. En ce moment, seule l'ITA (Institut de Technologie Alimentaire) est connue au Sénégal pour disposer des pilotes d'évaporation sous vide pour la production des concentrés d'extrait de fruit locaux pour les industries de la place. Ce procédé, doit être optimisé en termes de température et de durée de traitement pour éviter la dégradation des anthocyanes et les réactions de brunissement. C'est ainsi que l'impact des conditions de production de concentrés sur la qualité du produit sera présenté dans la suite du travail. Pendant la durée de la macération, les bassines doivent être recouvertes pour éviter une contamination par des impuretés.

2.2.3. La séparation des calices

Cette opération consiste à éliminer les calices à la fin de la macération. Elle est réalisée pour la plupart des entreprises de manières manuelles. Les calices sont retirés et pressés pour récupérer le maximum de liquide.

A ce niveau, de fortes pertes en extrait sont notées à cause du gonflement des calices qui absorbent de l'eau. En effet, les calices de Bissap retiennent deux fois leur masse en eau ; ce qui veut dire par exemple que pour une masse de 50 kg de calices, une masse de 100 kg de jus retenue. Ces pertes très importantes peuvent être réduites en utilisant un système de presse mécanique comme dans le cas de l'extraction des jus de fruits.

Les calices éliminés à ce niveau peuvent être réintroduites dans l'alimentation car ils sont très riches en fibres insolubles et aussi en composés phénoliques résiduelles. Une application simple consisterait à les introduire dans l'alimentation du bétail.

Nous pouvons souligner que la séparation manuelle est une source évidente de contamination microbienne. Pour éviter ce phénomène, l'utilisation de gant doit alors être un impératif pendant cette opération. La mise en place d'un bac (en inox) de macération équipé d'un système de transfert (par exemple robinet) peut améliorer la qualité hygiénique et rendre cette opération moins pénible.

2.2.4. La filtration

Cette opération permet d'éliminer les fragments de calices et les autres particules solides présentes dans l'extrait. Les extraits sont d'abord filtrés par des tamis pour retenir les particules de grande taille. Ensuite, l'extrait est filtré sur du coton hydrophile disposé en minces couches pour retenir les particules fines (**Figure 43**)

Cette étape est très importante pour obtenir un extrait de bonne clarté. En effet, le séchage des calices d'hibiscus est généralement réalisé au soleil en plein air, ce qui entraîne très souvent la présence de poussières, de grains de sable, de brindilles d'herbes qu'il faut forcément éliminer. Une filtration de mauvaise qualité a pour conséquence l'apparition de dépôts solides après la production des boissons. L'utilisation du coton dans le procédé de filtration entraîne souvent des risques de fuites de particules solides dans l'extrait aqueux d'hibiscus. En plus, le coton devient inadéquat lorsque les volumes à filtrer deviennent très importantes. Les poches filtrantes de 25 µm de diamètres sont alors une alternative pour garantir un niveau de filtration optimale des extraits d'hibiscus (**Figure 43**). Grâce au support de filtration métallique, facilement constructible et adapté aux contenants utilisés sur site, l'étape de filtration peut être assurée par un seul opérateur dans un minimum de temps. Ces poches filtrantes sont ainsi plus pratiques et peuvent être réutilisées pour une période de 4 à 6 mois selon les fréquences de la production. En plus, elles peuvent facilement être rentabilisées et constituent ainsi une source d'économie non négligeable.



Figure 43 : Procédés de filtration des extraits de calices de Bissap

2.2.5. Le sucrage

A l'issue de l'étape de filtration, les volumes et dans certains cas, la teneur en extrait sec soluble des extraits sont mesurés pour évaluer la quantité de sucre à rajouter. Pour les boissons préparées à partir des calices, la teneur en extrait sec soluble avant ajout de sucre est en moyenne de 1,5 °Brix. Les quantités de sucre ajoutées sont variables suivant les producteurs. Les teneurs finales en extrait sec soluble suivant les producteurs varient de 14 à 23 °Brix. Ainsi, l'extrait sec soluble des boissons est principalement apporté par le sucre ajouté lors de la formulation. La proportion de sucre dépend de la nature des produits mais aussi des habitudes alimentaires des consommateurs. En ce qui concerne les extraits aqueux de calices d'hibiscus, les quantités de sucres rajoutées sont parfois très importantes pour masquer la forte acidité des extraits avec un pH qui peut atteindre des valeurs de 2,5 voir 2 suivant les ratios calice/eau (Aurelio, Edgardo, et Navarro-Galindo 2008; Cisse et al. 2012) et les variétés de calices utilisées (Cissé, Dornier, Sakho, Diop, et al. 2009). En plus, comparés

aux consommateurs européens, les consommateurs africains préfèrent généralement des boissons au goût relevé en sucre. Les teneurs en sucres dans les boissons varient en moyenne de 11 % pour les consommateurs européens et de 14 % pour les consommateurs africains.

Dans la préparation des sirops, les quantités de sucres ajoutées sont beaucoup plus importantes. Les ratios calice/eau vont ainsi de 1/8 jusqu'à 1/4. L'extrait sec soluble des sirops varie ainsi de 65 à 85 °Brix selon les producteurs. Un chauffage à 100 °C pendant 15 à 20 min permet de réaliser à la fois la dissolution du sucre et la concentration du sirop. Ce traitement thermique entraîne une réduction voire une élimination de la flore microbienne présente dans le produit. Par contre, il favorise la dégradation des anthocyanes du Bissap qui sont sensibles au traitement thermique (Ahmed, Shivhare, et Raghavan 2004; Harbourne et al. 2008).

2.2.6. Stabilisation par pasteurisation

Après sucrage, les boissons sont placées dans des marmites et chauffées au gaz à environ 80 °C pour une durée de 20 à 25 minutes (**Figure 44**). Le produit est ensuite refroidi par agitation jusqu'à 70 °C.



Figure 44 : Equipement de pasteurisation de boissons et sirop de Bissap

Cette étape est très importante pour garantir la qualité microbiologique du produit. Le barème est suffisant car le produit est déjà acide avec un pH d'environ 2,4. En effet, il est recommandé de procéder à une simple pasteurisation lorsque le pH du produit alimentaire est inférieur à 4. La pasteurisation permet ainsi de détruire les levures et moisissures qui sont thermosensibles et généralement retrouvés dans les boissons de Bissap. Ce traitement thermique est aussi un moyen de stabilisation des boissons de Bissap pendant leur conservation. En effet, certains auteurs recommandent par ailleurs un traitement thermique des extraits de fruits riches en polyphénols pour éliminer le phénomène de dégradation enzymatique par les polyphénols oxydases. Cependant, un traitement thermique non maîtrisé, avec une durée prolongée, peut conduire à une forte dégradation des anthocyanes pendant le procédé de fabrication ou même pendant le stockage des extraits (Cisse et al. 2012).

2.2.7. Conditionnement

Les boissons d'hibiscus sont conditionnées à chaud (environ 70 °C) dans des bouteilles en plastique de 1 litre préalablement nettoyées et désinfectées. Le remplissage est manuel avec utilisation de pots et d'entonnoirs en plastiques. Les bouteilles sont ensuite refroidies dans un bain d'eau dans lequel sont plongés des pains de glace (**Figure 45**).



Figure 45 : Opération de conditionnement des boissons à base de calices de Bissap

Le conditionnement constitue une étape critique car une contamination à ce niveau ne pourrait pas être corrigée dans la suite du procédé de fabrication de la boisson. Le remplissage à chaud des bouteilles permet d'éviter une nouvelle contamination du produit par les manipulateurs ou le matériel : bouteilles, pot, entonnoir, etc. Le refroidissement doit être rapide pour éviter la dégradation des substances bioactives (vitamine C, anthocyanes, etc.) et de préserver la qualité sensorielle du produit. Un refroidissement lent se traduit par un brunissement et une apparition de goût de brûlé (Cisse et al. 2012). La pasteurisation après conditionnement à froid est plus efficace pour garantir la qualité sanitaire des boissons. Cette technique permet à la fois de pasteuriser le produit et l'emballage et d'éviter une nouvelle source de contamination (manipulateurs, environnement, matériel). Pour réaliser ce type de conditionnement, on doit disposer d'un dispositif de chauffage de type bain-marie, un système d'agitation, des emballages résistants à la température, etc. Ces contraintes matérielles et techniques empêchent la réalisation d'un tel procédé pour ces petites industries.

2.2.8. Le stockage

Les boissons ainsi conditionnées sont conservées dans des réfrigérateurs à température positive entre 4 et 10 °C. L'écoulement du produit dans les marchés concernés (supermarché, restaurant, boutiques, etc.) dure quelques jours à plusieurs semaines.

La température de stockage affecte fortement la stabilité de la boisson et en particulier celle des pigments anthocyaniques responsables de la coloration rouge. Les travaux réalisés sur les extraits aqueux des calices montrent une bonne stabilité de la couleur lors d'une conservation à basse température. Les durées de demi-vie de ces extraits sont d'environ trois mois lorsque le produit est stocké à 4 °C (Cisse et al. 2012). Etant donné que le procédé de fabrication des boissons de Bissap est réalisé dans des conditions particulières avec la méthode artisanale, l'étude de la stabilité sera nécessaire pour évaluer la durée de vie de ces produits.

2.3. Caractéristiques physicochimique des boissons et des sirops

2.3.1. pH et acidité titrable

Les boissons analysées révèlent des pH avec une valeur moyenne de 2,4. Cette forte acidité est très appréciée par les consommateurs. Les sirops présentent des valeurs de pH similaires avec une moyenne de 2,3 (Figure 46).

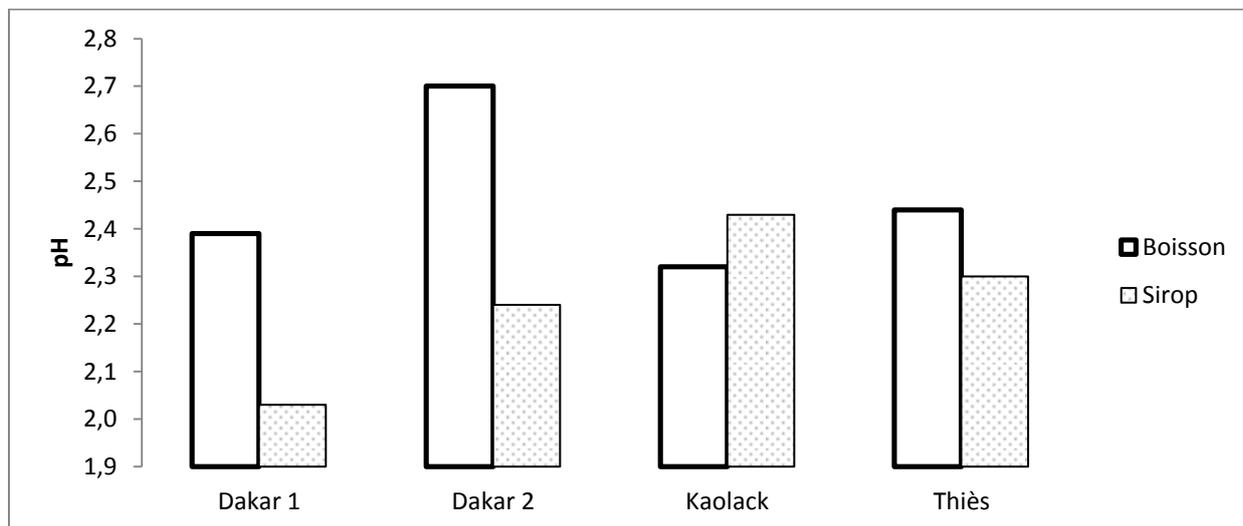


Figure 46 : pH des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

L'acidité titrable varie de 0,34 à 0,59 meq g⁻¹ pour les boissons et de 0,13 à 0,56 meq g⁻¹ au niveau des sirops (**Figure 47**). Ces résultats confirment le caractère acide de ces produits mesuré par pH-métrie.

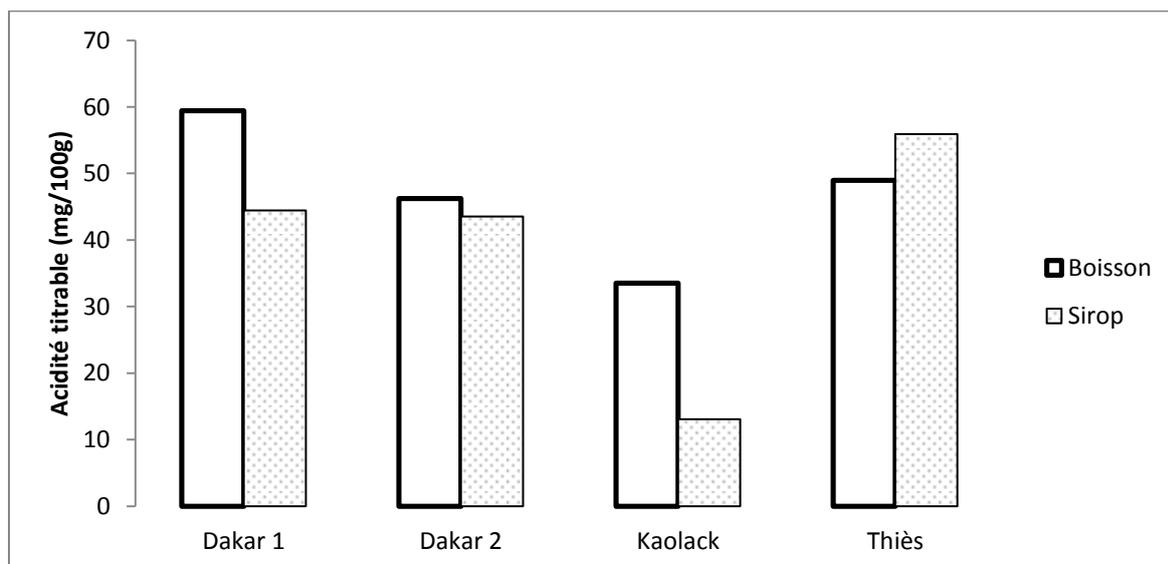


Figure 47 : Acidité titrable des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

2.3.2. Extrait sec soluble des boissons et sirops

La figure ci-dessous montre la variation de la teneur en extrait sec soluble dans les boissons et sirops de Bissap.

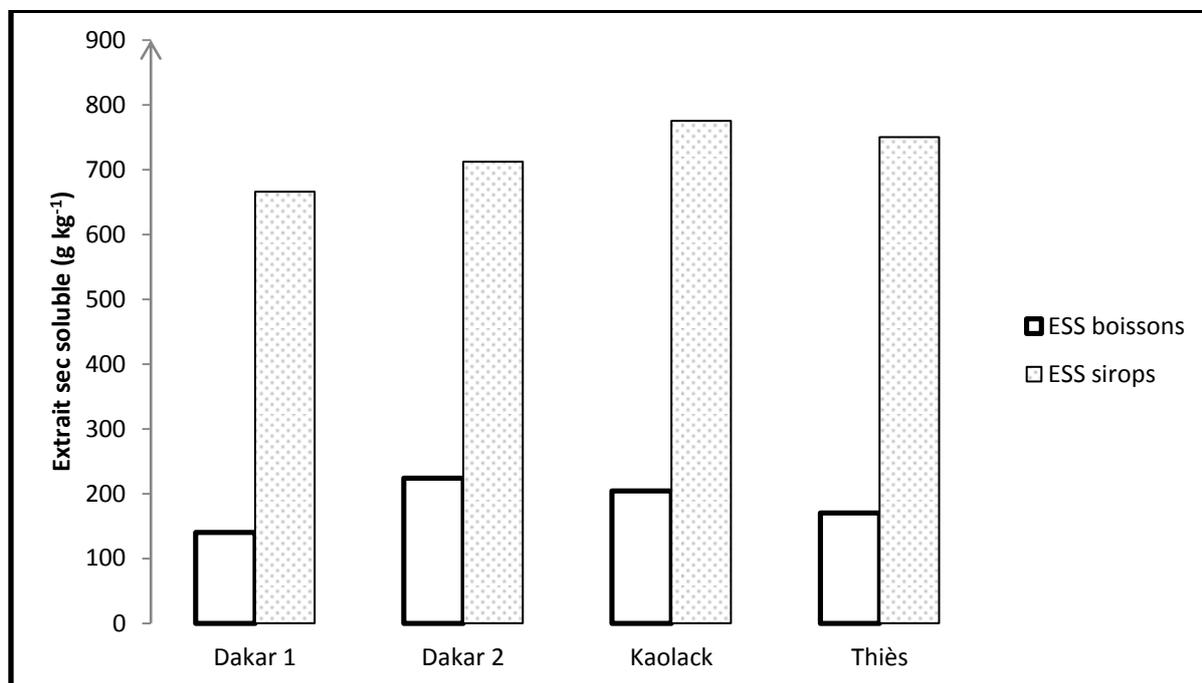


Figure 48 : Teneur en extrait sec soluble (ESS) des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

L'extrait sec soluble des boissons varie de 140 à 224 g kg⁻¹ respectivement avec les entreprises Dakar 1 et Dakar 2. Cette forte variation s'explique par la différence de formulation et notamment par la quantité de sucre ajoutée. En effet, les producteurs adoptent les taux de sucre en fonction de l'appréciation des clients et du marché cible. Cependant, les populations sont de plus en plus conscientes des risques sanitaires liés à la consommation des boissons trop sucrées.

La variation de la teneur en extrait sec soluble est aussi importante dans les sirops de Bissap (**Figure 48**). On note ainsi des valeurs allant de 666 à 775 g kg⁻¹. Cette variabilité est due au taux de sucre ajouté pendant la formulation mais aussi à la durée du traitement thermique. En effet, l'extrait soluble augmente durant l'évaporation de l'eau pendant la production du sirop. Cette étape peut être maîtrisée d'une part par le contrôle au réfractomètre et d'autre part par un refroidissement rapide du sirop produit.

Le sucre est un agent dépressur de l'activité de l'eau. On passe ainsi d'une activité de l'eau (A_w) proche de 1 dans les jus pour atteindre un A_w d'environ 0,8 dans les sirops (Figure 48).

Cette réduction de l'activité de l'eau associée à une forte acidité et au traitement thermique améliore la qualité microbiologique des sirops. En effet, contrairement aux échantillons de boisson, les analyses ont montré l'absence de flore microbienne dans les sirops.

2.3.3. Densité

La figure ci-dessous présente les résultats de la détermination de la densité dans les boissons et sirops de Bissap produits par les industries locales.

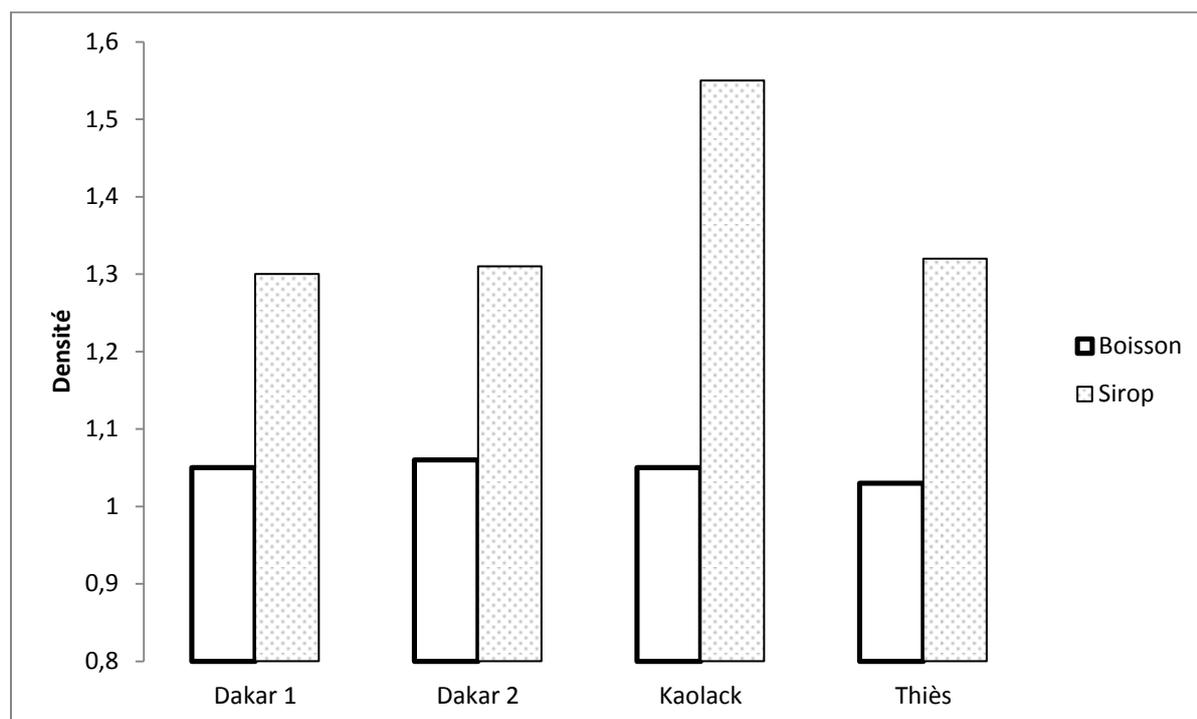


Figure 49 : Densité des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

Les boissons de Bissap présentent des densités voisines de l'eau avec une valeur moyenne de 1,05 à 25 °C. Le processus de fabrication des sirops, avec l'ajout de sucre, favorisent une augmentation de la densité. Les sirops présentent ainsi des densités allant de 1,30 à 1,55 à 25 °C (**Figure 49**). Ces densités sont proches des sirops de saccharose contenant une teneur en extrait soluble de 600 à 650 g kg⁻¹.

2.3.4. Paramètres de couleur

a. Luminosité L^*

Elle caractérise la capacité de l'échantillon à réfléchir plus ou moins de la lumière. La luminosité L^* varie de 20 à 24 dans les boissons de Bissap. Les valeurs de L^* sont plus légèrement plus élevées dans les sirops avec un minimum de 26 et un maximum de 28 (Figure 50).

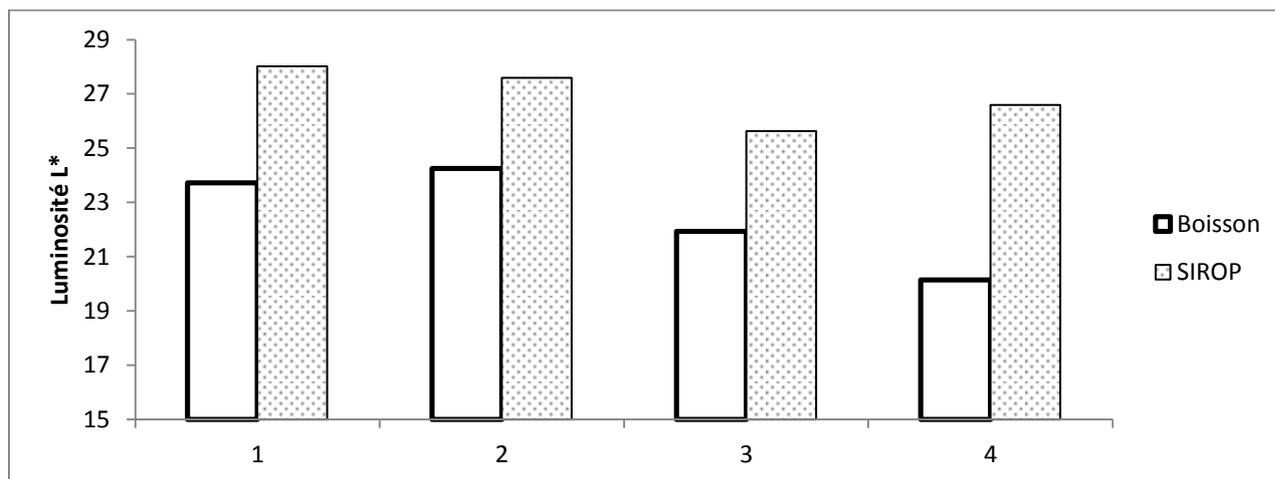


Figure 50 : Luminosité CIE L^* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

b. Indice de couleur a^*

Ce paramètre caractérise la nuance de couleur entre le rouge et le vert. Les extraits aqueux à base de calices de Bissap présentent une coloration rouge intense due à la présence des pigments anthocyaniques. Les sirops présentent une coloration généralement beaucoup plus intense que les boissons. Cela s'explique par le fait que la proportion de calice est plus élevée dans la formulation des sirops. Les valeurs de a^* varient très peu dans les échantillons de boissons avec une moyenne de 10,8 (Figure 51). Par contre, dans les sirops, les valeurs de a^* sont très différents en fonction des entreprises. La variabilité de a^* dans les sirops s'expliquent d'une part par les différences de ratios calice /eau et de traitement thermique dans les procédés de fabrication.

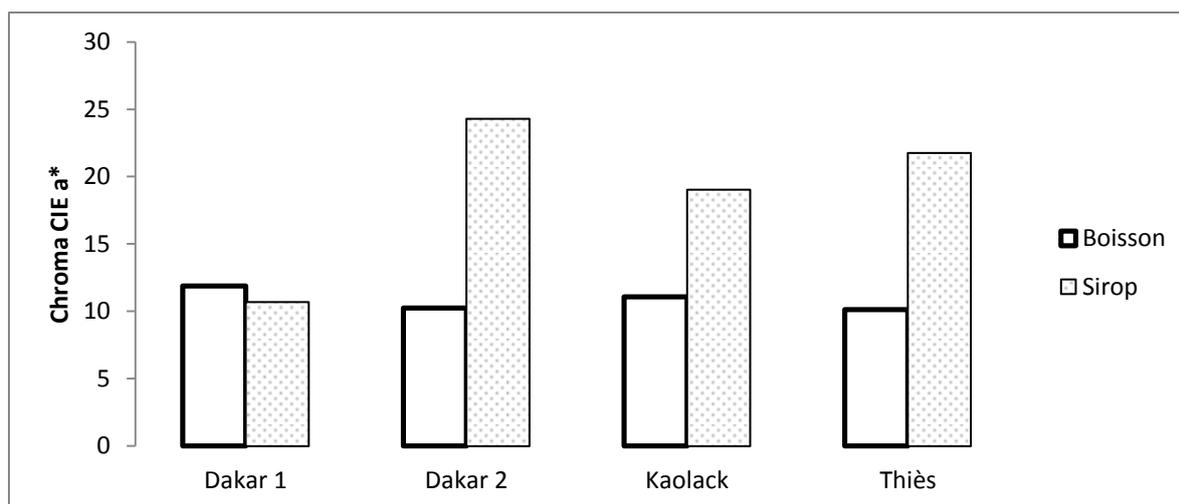


Figure 51 : Indice de couleur CIE a* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

c. Indice de couleur b*

Ce paramètre représente une nuance de couleur entre le bleu et le jaune. Les valeurs de b* sont très faibles dans les boissons avec un maximum de 1,76 (échantillon Dakar1). Par contre les valeurs sont beaucoup plus élevées dans les sirops et varient de 5,3 à 6,8 (**Figure 52**).

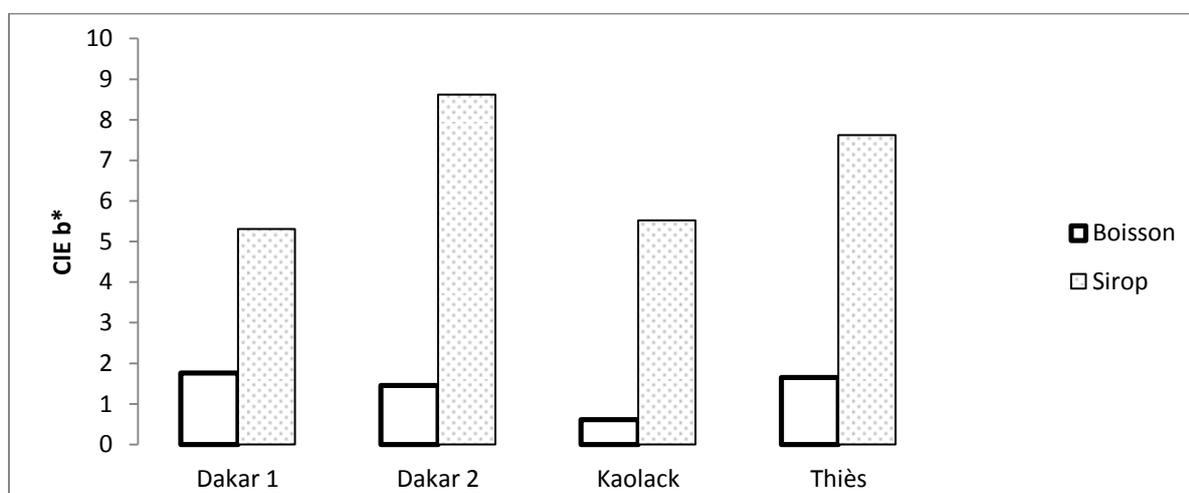


Figure 52 : Indice de couleur CIE b* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

d. Chromaticité C*

On note de faibles variations de C* dans les boissons avec une moyenne de 11. Les valeurs de C* sont plus importantes dans les sirops avec des valeurs allant de 12 à 26 (**Figure 53**). La coloration rouge est beaucoup plus saturée dans les sirops que dans les boissons.

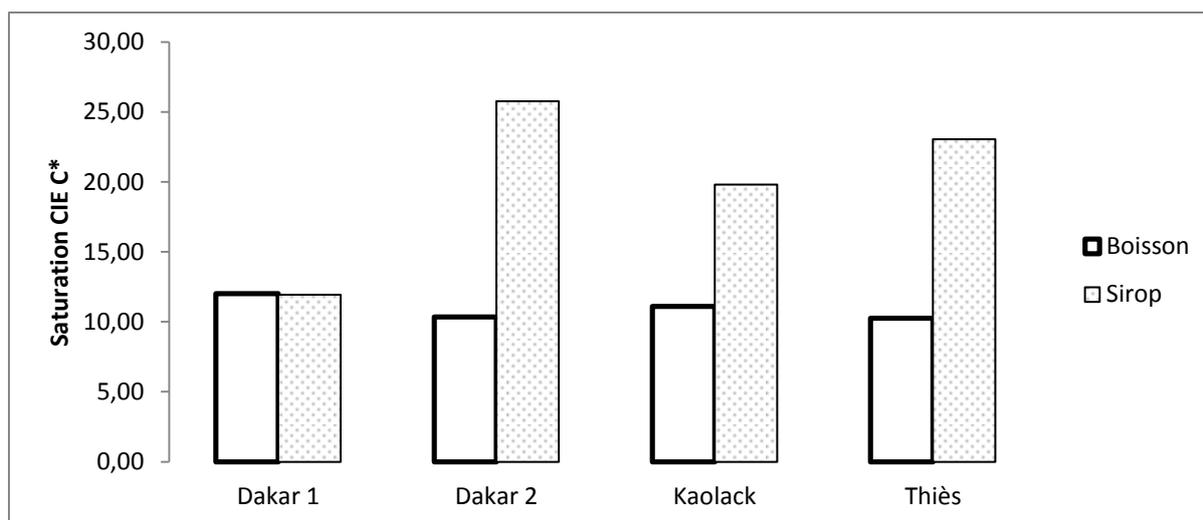


Figure 53 : Saturation de la coloration CIE C* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

e. La tonalité chromatique h*

La teinte h* est globalement très faible dans les échantillons analysés. On note ainsi des moyennes de 1,4 et de 1,2 respectivement dans les boissons et dans les sirops

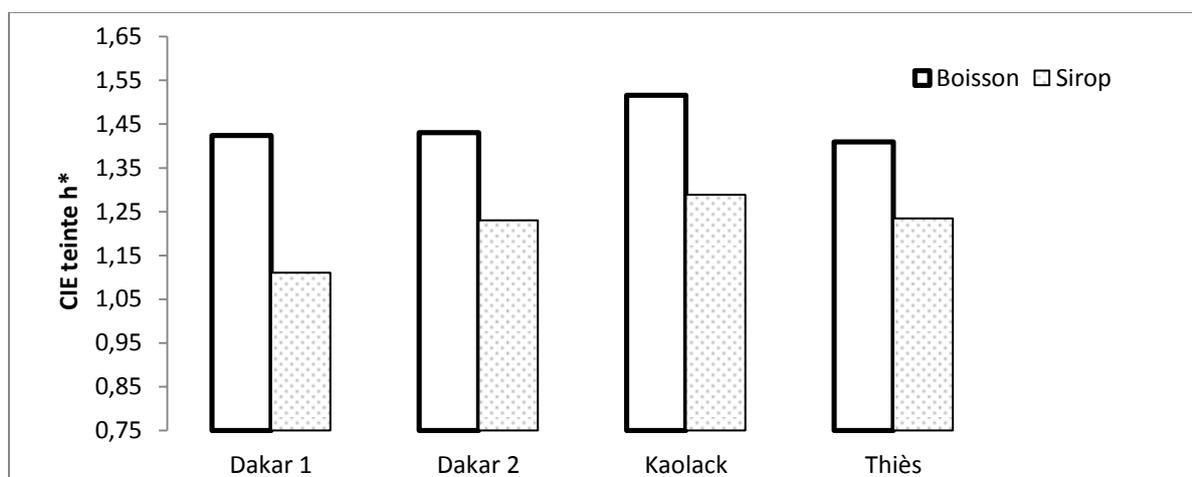


Figure 54 : Tonalité CIE h* des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

2.4. Caractéristiques biochimiques des boissons et sirop d'*Hibiscus sabdariffa* L.

2.4.1. Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux varie de 0,29 à 0,88 g/100g dans les boissons et de 0,15 à 0,26 g/100g dans les sirops d'hibiscus (**Figure 55**). Cette différence s'expliquerait par la teneur en matière sèche soluble qui est plus importante dans les sirops que dans les boissons.

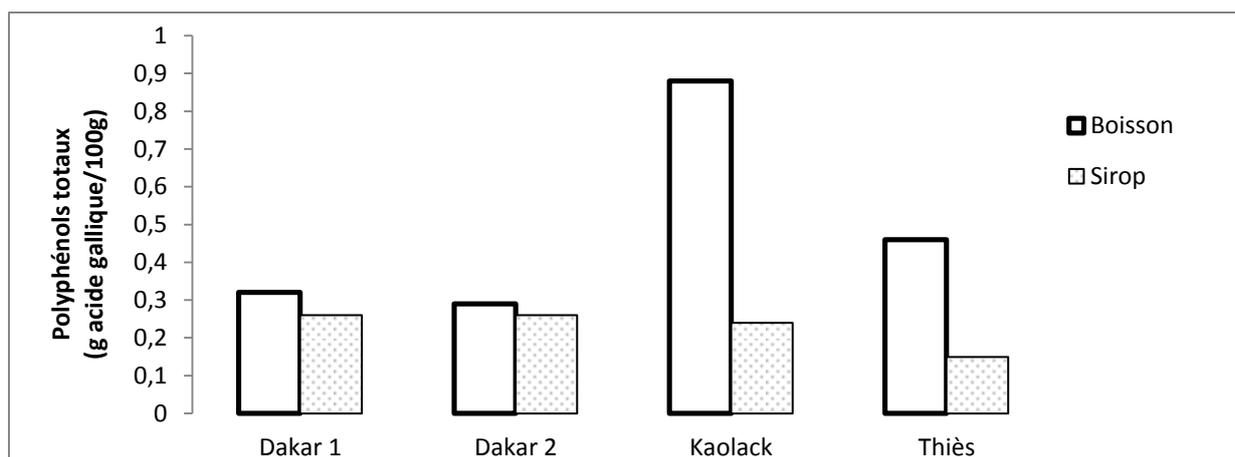


Figure 55 : Teneurs en polyphénols totaux des boissons et sirops d’extraits aqueux de calices rouges de Bissap

2.4.2. Teneur en anthocyanes totaux

La concentration en anthocyanes totaux varie en moyenne de 500 à 1600 mg kg⁻¹ dans les boissons et de 430 à 980 mg kg⁻¹ dans les sirops d’hibiscus (**Figure 56**). Les teneurs en anthocyanes dans les boissons et sirops dépendent des conditions de fabrication. Entre autres, le ratio calice/eau ainsi que la taille des particules sont les principaux facteurs qui influencent les rendements d’extraction des anthocyanes du Bissap (Cissé et al. 2012). Ainsi, le broyage des calices sec favorise une meilleure diffusion des anthocyanes dans l’eau par augmentation de la surface de contact. Les traitements thermiques appliqués pendant la pasteurisation (boissons et sirops) ou la dissolution du sucre (sirop) entraînent une forte dégradation des anthocyanes. En effet, de nombreuses études ont montré la sensibilité des anthocyanes aux traitements thermiques (Aurelio, Edgardo, et Navarro-Galindo 2008; LIU, CAO, et PAN 2011).

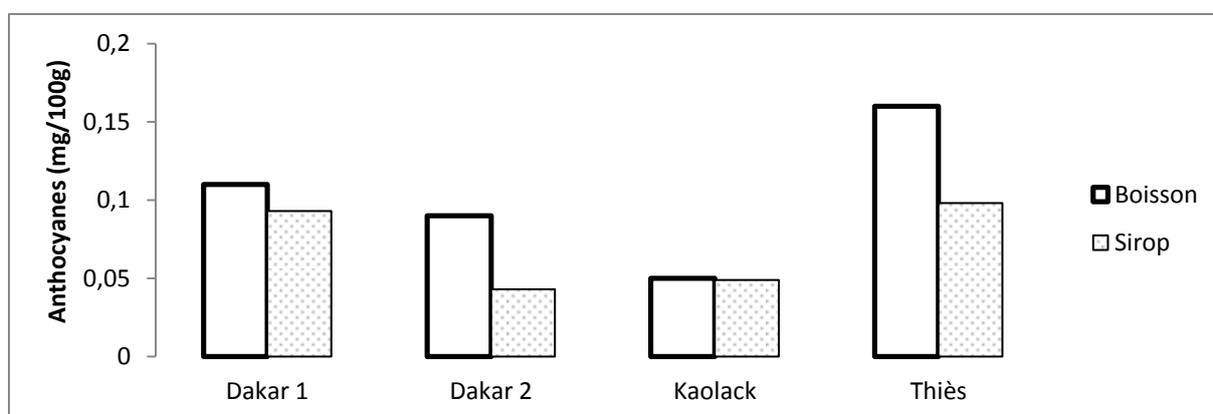


Figure 56 : Teneurs en anthocyanes totaux des boissons et sirops d’extraits aqueux de calices rouges de Bissap

2.4.3. Teneur en vitamine C

La teneur en vitamine C varie en moyenne de 125 à 178,6 mg kg⁻¹ dans les boissons et de 10,3 à 22,5 mg kg⁻¹ dans les sirops (**Figure 57**). Les traitements thermiques appliqués dans les procédés de fabrication de ces sirops ne favorisent pas la préservation de la vitamine C. En effet, plusieurs travaux ont montré la sensibilité thermique de cette vitamine dans les extraits de fruits tels que les tomates (Marfil, Santos, et Telis 2008), les oranges (Manso et al. 2001) et les citrons (Burdurlu, Koca, et Karadeniz 2006).

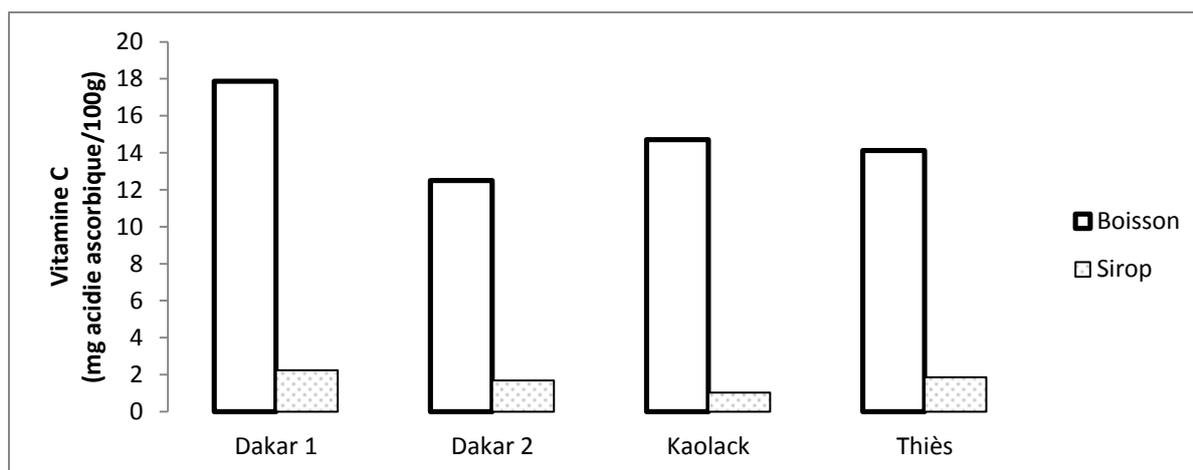


Figure 57 : Teneurs en vitamine C totaux des boissons et sirops d'extraits aqueux de calices rouges de Bissap

A la suite des analyses physicochimiques et sensorielles, nous avons évalué la qualité microbiologique de ces préparations.

2.5. Analyses microbiologiques des boissons et sirop à base de calices de Bissap

Les résultats des analyses microbiologiques réalisées sur les échantillons de boissons et de sirops fabriqués par des entreprises sénégalaises sont présentés dans les **tableaux 25** et **26**.

Les boissons se caractérisent par une excellente qualité microbiologique pour toutes les entreprises. En effet, la flore pathogène recherchée est totalement absente dans tous les échantillons analysés. Les microorganismes acidophiles comme les levures et moisissures et les bactéries lactiques sont retrouvés dans les boissons mais en nombre limité.

Les sirops de Bissap sont de meilleure qualité microbiologique que les boissons à cause de leurs propriétés physicochimiques et du procédé de fabrication. En effet, les fortes teneurs en sucres dans les sirops entraînent une diminution de l'activité de l'eau par conséquent une inhibition du développement des microorganismes. En plus, les températures appliquées dans

le procédé de fabrication des sirops réduisent voir même détruisent totalement la flore microbienne. La faible charge de microorganismes acidophiles observée dans les sirops de l'entreprise de Thiès peut être due à une contamination au cours du conditionnement.

Ces résultats montrent globalement que ces produits présentent une bonne qualité microbiologique. Cependant, pour améliorer la qualité sanitaire, des mesures supplémentaires doivent être élaborées. C'est ainsi que dans le cadre du Projet AFTER, une mise en place de bonnes pratiques de fabrication (BPF) a été proposée aux entreprises locales. Ces dernières, ont été encadrant et formées par une équipe compétente sur l'application de ces procédures.

Tableau 25 : Résultats des analyses microbiologiques sur les boissons Bissap (en UFC/g)

GERMES (UFC/g)	ENTREPRISES			
	DAKAR 1	DAKAR 2	KAOLACK	THIES
Flore mésophile aérobique totale	4 10 ³	355.10 ³	12.10 ³	150
<i>Entérobactéries</i>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus céréus</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> and CPS	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella</i>	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	0
Levures et moisissures	173	2000	1200	540
Bactéries lactiques (LAB)	100	102	150	105

Tableau 26 : Résultats des analyses microbiologiques sur les sirops de Bissap (en UFC/g)

GERMES (UFC/g)	ENTREPRISES			
	DAKAR 1	DAKAR 2	KAOLACK	THIES
Nombre de microorganismes	0	0	0	0
<i>Entérobactéries</i>	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus céréus</i>	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> and CPS	0	0	0	0
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	0	0
<i>Salmonella</i>	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	0	0	0	0
Levures et moisissures	0	0	0	30
Bactéries lactiques	0	0	0	10

2.6. Etude de la stabilité des boissons et sirop à base de calices pendant le stockage

2.6.1. Cinétiques de dégradation

La figure 58 présente l'évolution de la teneur en anthocyanes des extraits au cours du stockage à 4, 20, 30, 37 et 45 °C.

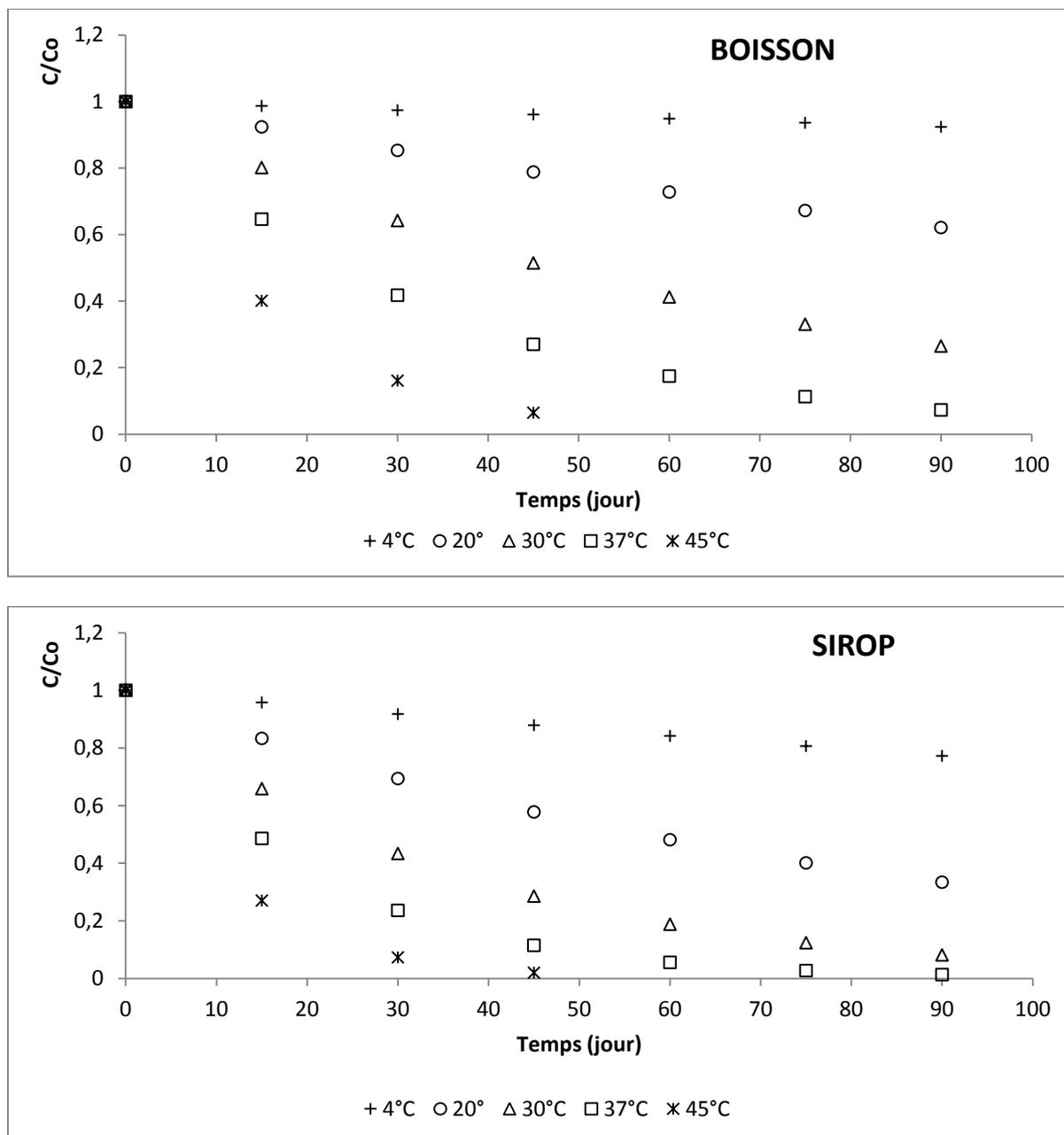


Figure 58 : Evolution de la teneur en anthocyanes dans la boisson et le sirop de Bissap pendant le stockage à différentes températures (4 à 45 °C)

L'allure des courbes montre que les anthocyanes se dégradent selon une cinétique de premier ordre. Nous constatons que l'augmentation de la température de stockage entraîne une dégradation plus importante des anthocyanes dans la boisson et le sirop d'hibiscus. Ainsi,

lorsque cette température passe de 20 °C à 37 °C, la constante de vitesse de dégradation k passe de $6,9 \cdot 10^{-8}$ à $32,3 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans la boisson et de $13,9 \cdot 10^{-8}$ à $54,1 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans le sirop. Ainsi, la conservation à basse température favorise la stabilité des anthocyanes dans ces produits en augmentant leur durée de vie (**Tableau 27**). De ce fait, dans la boisson d'hibiscus, la durée demi-vie des anthocyanes est de mois de 2 mois pour un stockage à 30 °C alors qu'elle est d'environ 4 mois lorsque cette température passe à 20 °C.

Tableau 27 : Constantes de vitesse, durée de demi-vie et durée de destruction décimales des anthocyanes des produits boissons et sirop de Bissap pendant le stockage

Produits	Température (°C)	k Expérimental (10^{-8} s^{-1})	k Modèle (10^{-8} s^{-1})	$t_{1/2}$ Expérimental (jour)	$t_{1/2}$ Modèle (jour)
Boisson	4	0,68 (0,02)	1,02	1181	788
	20	6,93 (0,12)	6,12	116	131
	30	16,15 (0,20)	17,08	50	47
	37	32,32 (0,77)	33,66	25	24
	45	78,99 (1,93)	70,47	10	11
Sirop	4	2,86 (0,21)	3,3	281	241
	20	13,88 (0,36)	14,1	58	57
	30	33,2 (0,72)	32,2	24	25
	37	54,12 (1,38)	55,7	15	14
	45	101,45 (2,79)	101,0	8	8

Les anthocyanes sont plus stables dans la boisson que dans le sirop quelle que soit la température de stockage. Ainsi, pour un stockage à 20 °C, la durée de demi-vie varie des anthocyanes varie d'environ 4 mois dans la boisson à 2 mois dans le sirop. Cette différence de stabilité peut s'expliquer par la variabilité dans les procédés d'élaboration de ces produits. En effet, le traitement thermique appliqué au sirop dans la phase de dissolution du sucre et d'évaporation de l'eau entraîne un début de dégradation des anthocyanes qui se prolongerait pendant le stockage. Des résultats similaires sont trouvés dans la littérature. Nous observons ainsi que les anthocyanes des extraits obtenus pas macération à 30 °C sont plus stables pendant le stockage que ceux obtenus par décoction à 100 °C (Cisse et al. 2012).

Cependant, une bonne stabilité des anthocyanes n'est observée que lorsque la conservation se déroule à très basse température. En effet, les pertes en anthocyanes augmentent fortement

pour toutes les températures de stockage supérieures à 4 °C (**Figure59**). Ces pertes sont seulement de 2,6 % dans la boisson et 8,3 % dans le sirop après un mois de conservation à 4 °C. Par contre, pour la même durée, ces pertes sont supérieures à 15 % dans la boisson et le sirop stockés à 20 °C.

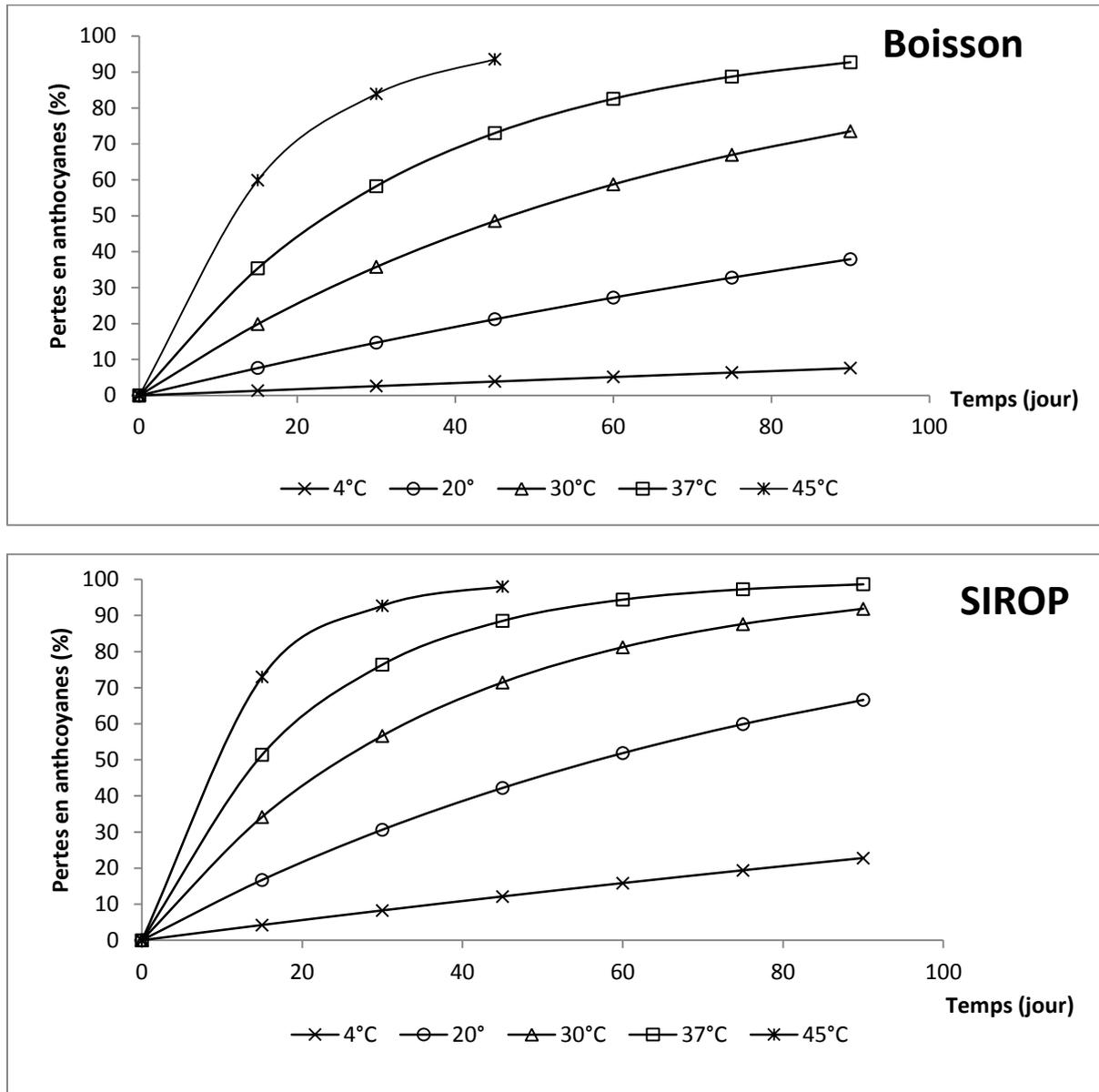


Figure 59 : Evolution des pertes en anthocyanes de la boisson et du sirop de Bissap au cours du stockage à différentes températures (4, 20, 30, 37 et 45 °C)

A la suite de cette analyse de la dégradation des anthocyanes dans ces produits à base de calices de Bissap, une modélisation des cinétiques a été réalisée à partir des modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring.

2.6.2. Modélisation de la dégradation des anthocyanes

Les paramètres cinétiques des trois modèles (Arrhenius, Ball et Eyring) sont présentés dans le **tableau 28**. Nous pouvons observer qu'entre 4 et 45 °C, l'énergie d'activation est presque deux fois plus élevée dans le sirop que dans la boisson. Les anthocyanes des sirops sont ainsi plus sensibles à l'élévation de la température.

Tableau 28 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes de produits à base de calices de Bissap au cours du stockage entre 4 et 45 °C

Produits	Modèle d'Arrhenius		Modèle d'Eyring		Modèle de Ball	
	k_{30} ($10^{-8} s^{-1}$)	Ea (kJ mol ⁻¹)	ΔS^* (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔH^* (kJ mol ⁻¹)	Do (jour)	z (°C)
Boisson	17,08 (0,31)	75,8 (1,7)	-38,6 (5,4)	73,3 (1,7)	160 (3)	23,2 (0,5)
Sirop	32,25 (0,37)	61,1 (0,8)	81,8(2,7)	58,6 (0,8)	85 (1)	27,9 (0,4)

Les trois modèles de prédiction permettent d'estimer avec une bonne précision la dégradation des anthocyanes au cours de la conservation. **La figure 60** montre que les pertes expérimentales et les pertes calculées sont très proches pour toutes les températures de stockage. Les différences sont en moyenne inférieures à 2 %.

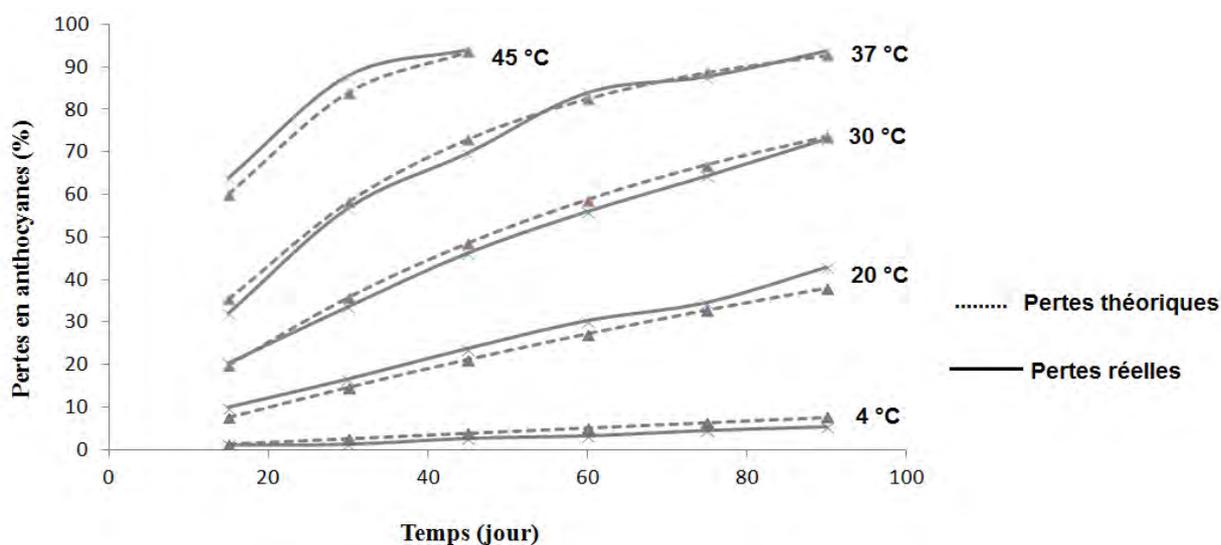


Figure 60 : Pertes en anthocyanes au cours du stockage des boissons *d'Hibiscus sabdariffa* : comparaison entre les valeurs réelles et les valeurs calculées avec le modèle d'Arrhenius

3. ETUDE DE LA PRODUCTION DE CONCENTRES AQUEUX

3.1. Caractéristique physicochimiques des concentrés aqueux d'extraits de calices d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Les extraits aqueux ont été concentrés par évaporation à différentes températures. Des analyses ont permis de caractériser les produits obtenus par ce procédé.

3.1.1. Activité de l'eau (A_w)

L'activité de l'eau est définie comme étant le rapport de la pression de vapeur d'eau dans une solution donnée sur la pression de vapeur de l'eau pure à la même température. Nous observons que l'accroissement de la teneur en extrait sec soluble pendant la concentration s'accompagne d'une réduction considérable de l'activité de l'eau dans les extraits aqueux de Bissap (**Figure 61**). Ainsi, l'activité de l'eau passe d'une valeur de 0,974 dans l'extrait à 8,5 °Brix à 0,864 dans le concentré à 60 °Brix.

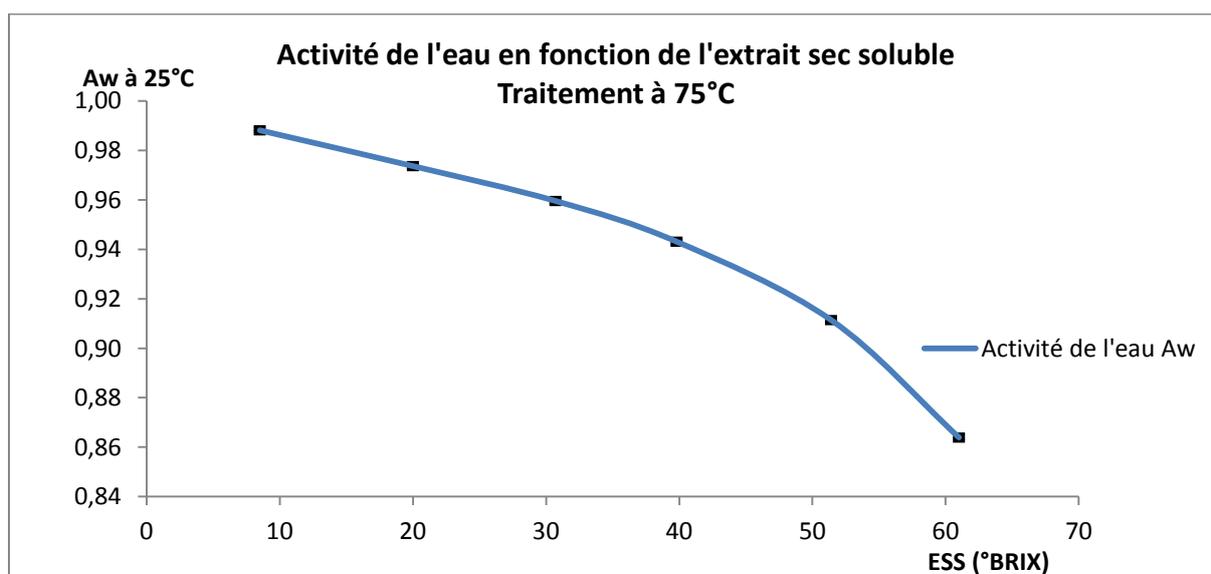


Figure 61 : Variation de l'activité de l'eau en fonction de la teneur en extrait sec soluble des concentrés de Bissap

L'abaissement de l'activité de l'eau a pour conséquence une meilleure stabilité à la dégradation microbienne. En effet, de nombreux travaux ont montré que la croissance des microorganismes, en particulier celle des bactéries, est généralement inhibée pour une activité de l'eau inférieure à 0,9. Nous remarquons ainsi que l'activité de l'eau minimale de croissance est de 0,97 pour le *Clostridium botulinum* E, 0,95 pour *Escherichia coli* et le *Vibrio cholerae*, 0,94 pour le *Stachybotrys atra* et les *Clostridium botulinum* A et B, 0,93 pour *Bacillus cereus* et *Rhizopus nigricans*, et 0,90 (Astoreca et al. 2007; Nummer, Shrestha,

et Smith 2012) pour les *Staphylococcus aureus* anaérobique, *Candida*, *Penicillium spp* et *Aspergillus flavus* (Abellana, Sanchis, et Ramos 2001). Par contre, certaines levures comme le *Saccharomyces bailii* et le *Saccharomyces rouxi* et la plupart des moisissures comme l'*Aspergillus parasiticus* et *Penicillium martensii* peuvent se développer à des activités de l'eau inférieure à 0,9 voir même 0,8 (Fontana 2007).

3.1.2. Viscosité

La viscosité des extraits d'hibiscus augmente progressivement pendant la concentration des extraits aqueux de Bissap (**Figure 62**). Cette viscosité varie de 1,27 à 3,19 mPa.s entre l'extrait non concentré (8°) et le concentré à 40°. Ensuite, elle augmente rapidement pour passer de 20,99 mPa.s dans le concentré à 51° à 88,8 mPa.s dans le concentré final à 60 °Brix. Cette variation de viscosité est similaire à celle des solutions aqueuses de saccharose dans les mêmes conditions de température.

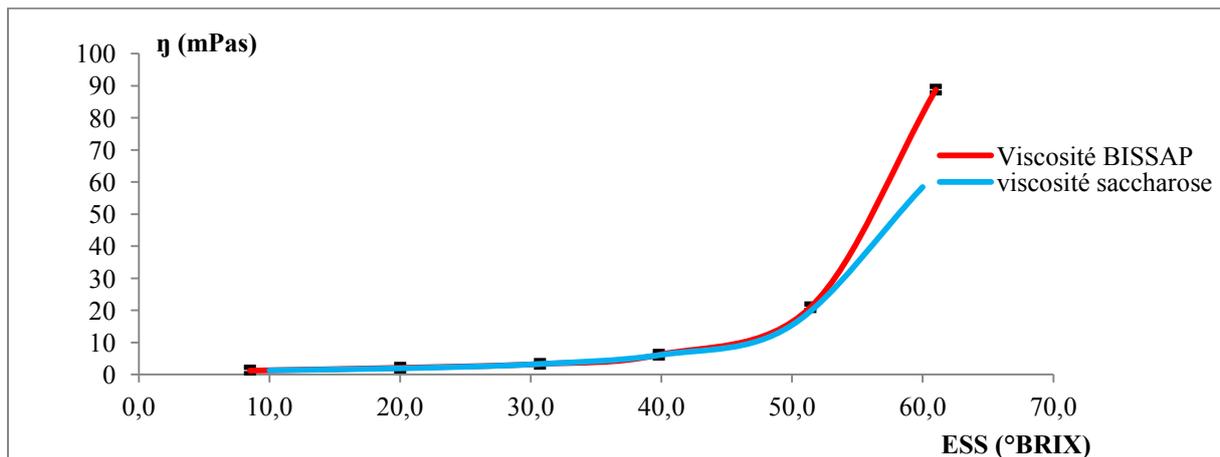


Figure 62 : Viscosité de l'extrait aqueux de Bissap au cours du procédé de concentration sous vide

En ce qui concerne l'extrait d'hibiscus à 60 °Brix, nous pouvons constater que son taux de déformation varie de façon linéaire avec les contraintes de cisaillement. Ce concentré présente ainsi un comportement newtonien. Cela signifie que la viscosité reste constante quelle que soit la valeur de la contrainte appliquée. (**Figure 63**).

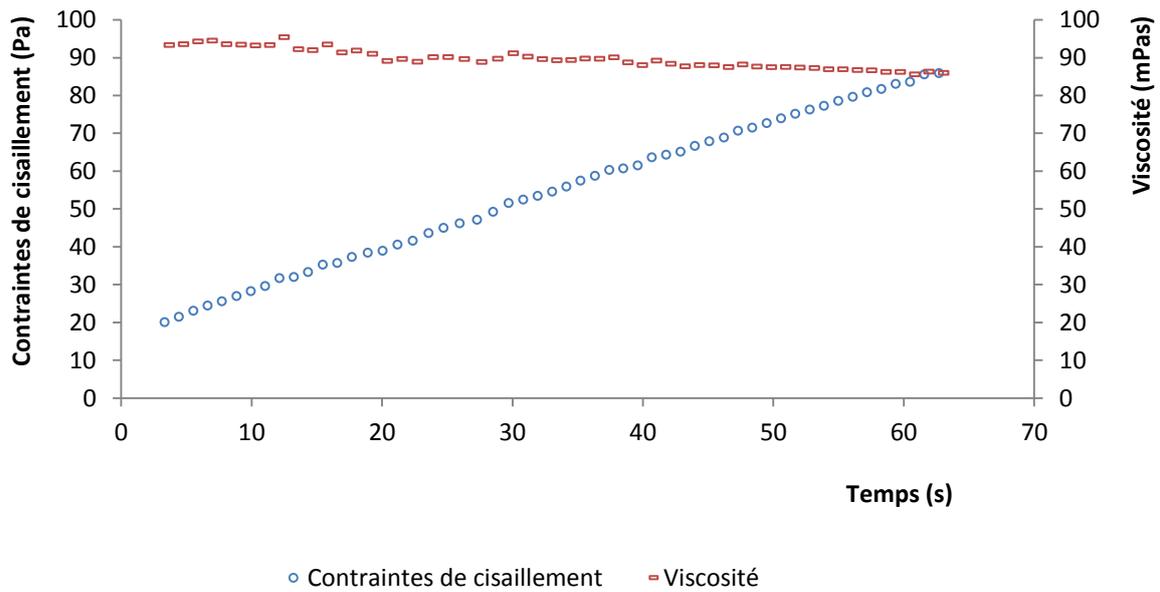


Figure 63 : Viscosité des extraits aqueux de calices de Bissap

3.1.3. pH des extraits aqueux

L'augmentation de la teneur en extrait sec pendant le procédé d'évaporation entraîne un accroissement de l'acidité des extraits aqueux (**Figure 64**). En effet, le pH diminue fortement pour passer de 2,49 dans l'extrait initial à 8,5 °Brix à une valeur de 1,78 dans le concentré à 60 °Brix.

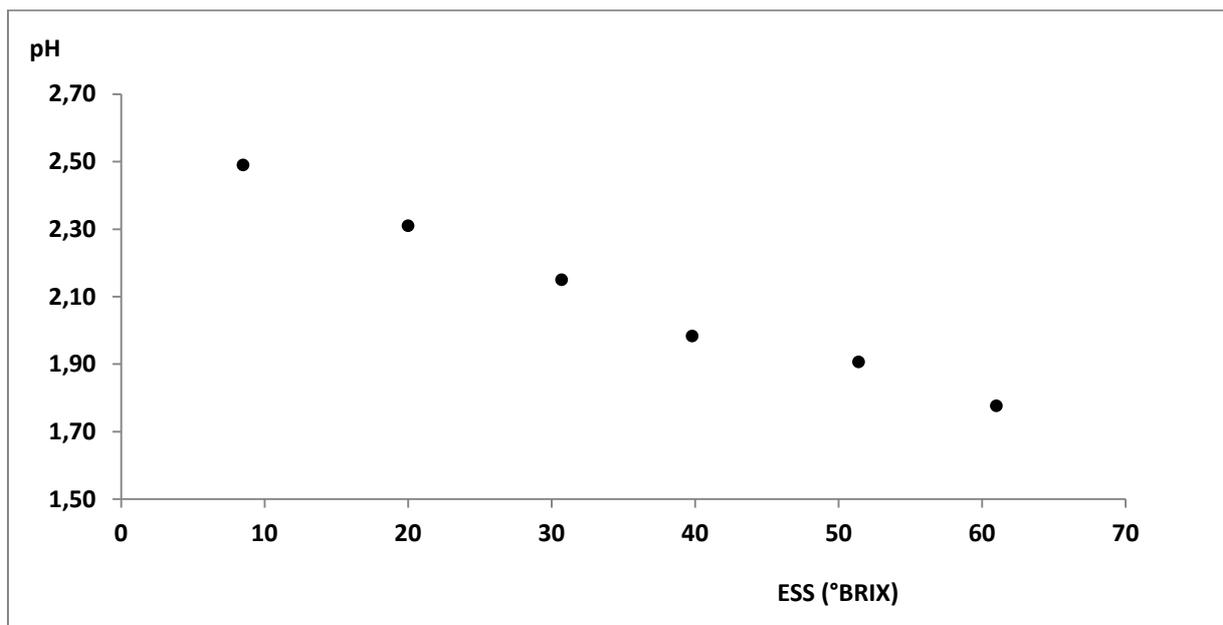


Figure 64 : Variation du pH en fonction de la teneur en extrait sec soluble des extraits aqueux de calices de Bissap

Cette forte acidité conduit à une meilleure stabilité microbiologique des concentrés d'hibiscus. En effet, le développement des microorganismes est inhibé voire même stoppé pour des pH bas. En effet, le pH optimal de croissance est de 6,5 à 7,5 pour les bactéries, de 4,5 à 6,8 pour les moisissures et de 4 à 6,5 pour les levures. Pour des pH plus faible, l'activité enzymatique et les réactions biologiques nécessaires à la croissance sont fortement affectées.

Ainsi, le pH minimal de croissances est en moyenne de 4,5 pour les bactéries et de 1,5 à 3,5 pour les levures et les moisissures. Dans ce cas, seules les bactéries acidophiles, les levures et moisissures peuvent se développer dans les concentrés. Des travaux récents (Ndiaye et al. 2015) ont montré la présence de levures et moisissures dans les jus et sirop d'hibiscus. Pour améliorer la qualité microbiologique, il devient ainsi nécessaire de mettre en place un procédé de stabilisation microbienne. Une pasteurisation est souvent suffisante dans les jus de fruits qui présentent un pH inférieur à 4,5. Cependant, les barèmes de pasteurisation devront tenir compte de la sensibilité thermique des pigments anthocyaniques. Dans certains cas, pour éviter le développement de levures et moisissures, les industries de production de jus font recours aux conservateurs chimiques autorisés. Les benzoates et les sorbates ont montré une bonne efficacité pour inhiber le développement des levures et des moisissures dans les aliments (Davidson, Sofos, et Branen 2005; Karabulut et al. 2005).

3.1.4. Paramètres de couleurs des extraits aqueux de calices

Les résultats de l'analyse des paramètres de couleur sont illustrés par la figure 65

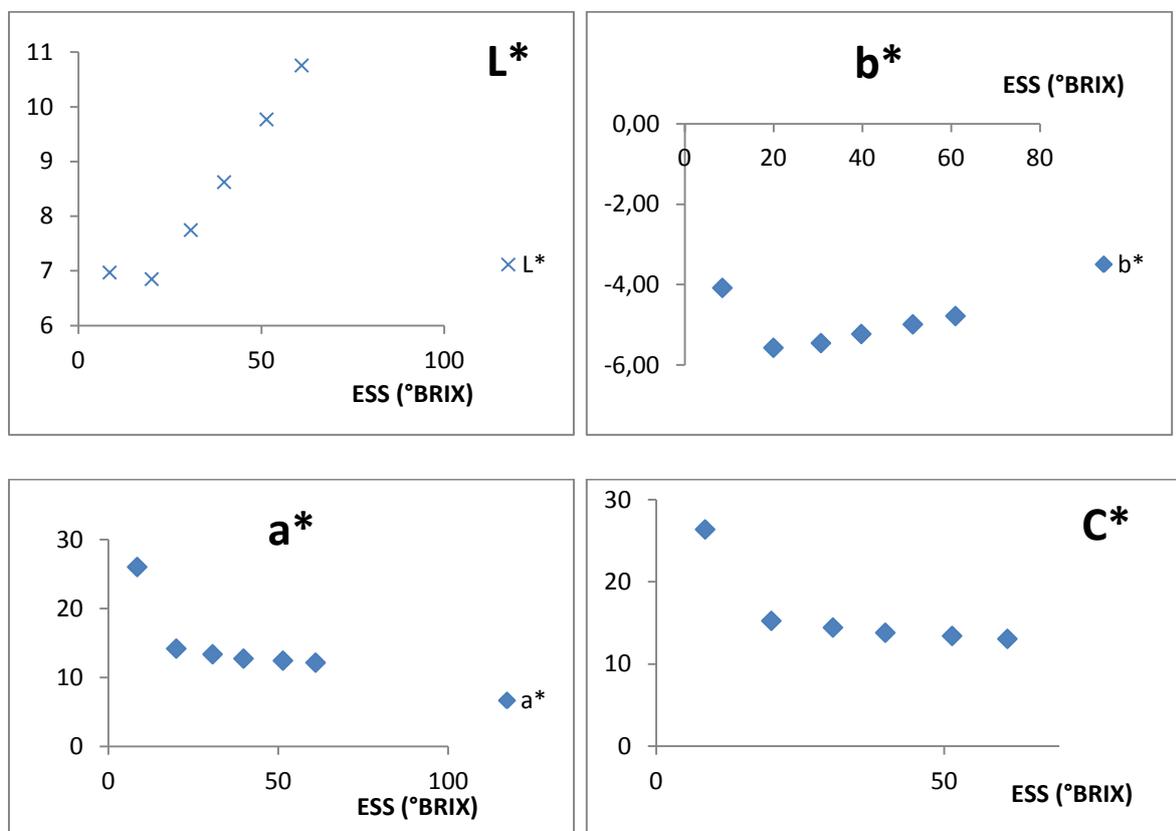


Figure 65 : Evolution des paramètres de couleur au cours du procédé d'évaporation des extraits aqueux de calices de Bissap

L'évaporation entraîne une forte modification de la coloration des extraits aqueux de Bissap. Cela se traduit par une variation des paramètres de couleur avec l'augmentation de la teneur en extrait sec soluble (**Figure 65**).

La clarté du produit augmente avec L^* qui passe de 6,97 dans l'extrait initial à 14,21 dans le concentré (60 °Brix). Le paramètre b^* ne varie que très légèrement de -4,8 dans l'extrait initial à -4,78 dans le concentré à 60 °Brix. Par contre, le paramètre de couleur a^* (coloration rouge) diminue très fortement en début d'évaporation et passe de 26,06 dans l'extrait initial à 14,21 dans l'extrait à 20° Brix. Dans le concentré final (60 °Brix), a^* atteint une valeur de 12,17. Ainsi, la saturation de la coloration devient moins importante avec C^* qui passe de 26,38 dans l'extrait initial à 15,26 dans l'extrait à 20 °Brix, puis à 13,07 dans le concentré final (60 °Brix). Ainsi, la coloration rouge devient plus intense : on passe de la couleur rouge clair dans l'extrait initial à une couleur rouge sombre (ou foncé) dans les concentrés. Ce changement de la couleur est sans doute dû à l'effet du traitement thermique.

La dégradation de la couleur a été observée lors de la concentration des jus de grenade (Maskan 2006) et du traitement des ananas (Chutintrasri et Noomhorm 2007).

3.2. Impact de la température d'évaporation sur la qualité des extraits

Afin d'évaluer l'impact de la température d'évaporation sur les pigments anthocyaniques, une concentration sous vide est effectuée à 50, 60, 75 et 85 °C. Une évaporation est aussi réalisée à la pression atmosphérique à 100 °C. Les concentrés obtenus ont une teneur en extrait sec soluble finale proche de 60 °Brix. En plus, les teneurs en anthocyanes en fin de procédé sont mesurées et comparées à celle de l'extrait initial non concentré afin d'évaluer les pertes.

Les résultats obtenus montrent qu'à basse température, les anthocyanes des extraits aqueux présentent une bonne stabilité. En effet, lorsque l'évaporation est réalisée à 50 °C pendant une durée de 234 min, les pertes en anthocyanes sont seulement de 1 %. Par contre, pour des températures supérieures à 50 °C, le pourcentage de dégradation devient très important. Ainsi, les pertes en anthocyanes sont de 19 % pour une évaporation à 60 °C (160 min), de 21 % à 75 °C (145 min) et de 19 % à 85 °C (95 min). Cette faible différence de taux de dégradation est due à une influence de la durée de traitement. Dans ce cas, une optimisation du flux évaporatoire peut permettre de réduire le temps nécessaire pour concentrer les extraits afin de préserver au mieux les anthocyanes. A la température de 100°C, bien que la durée de l'évaporation soit la plus courte (73 minutes), les pertes en anthocyanes s'élèvent à 43 %.

L'analyse des deux anthocyanes majoritaires identifiés dans les extraits montre qu'ils évoluent dans le même sens que les anthocyanes totaux. La cyanidine sambubioside et la delphinidine sambubioside présentent la même sensibilité au traitement thermique lors de l'évaporation sous vide (**Figure 67**).

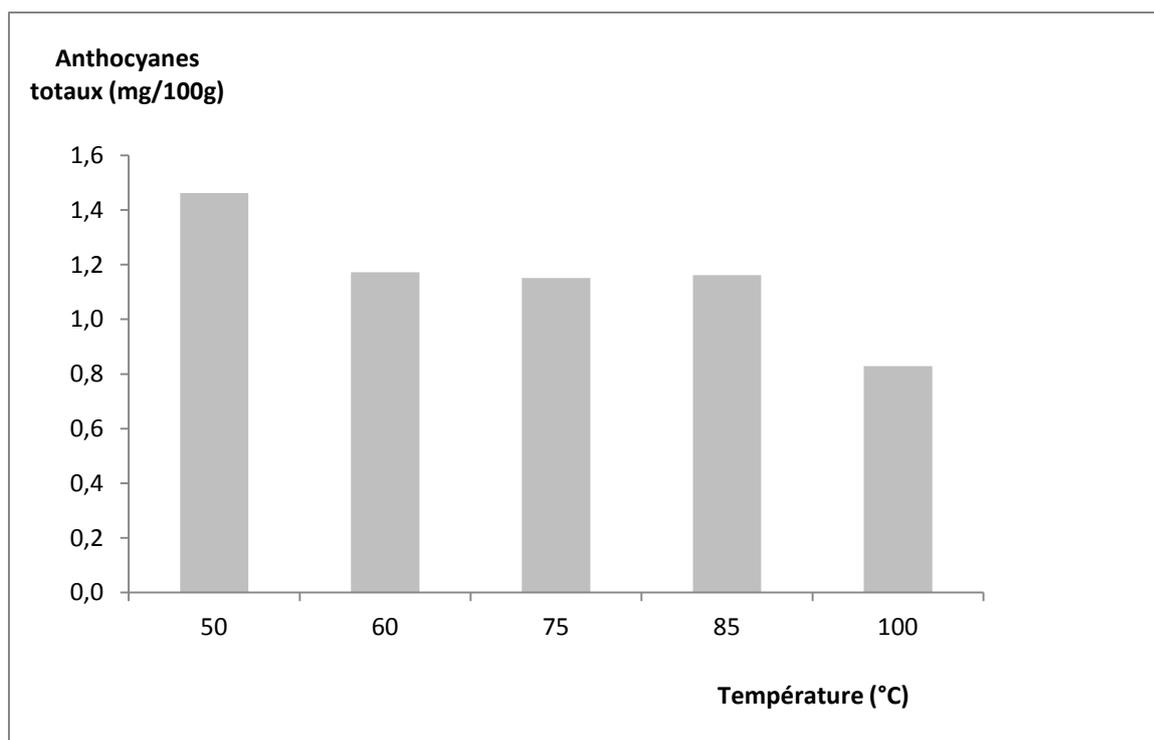


Figure 66 : Teneur en anthocyanes des concentrés d'*Hibiscus sabdariffa* L en fonction de la température d'évaporation

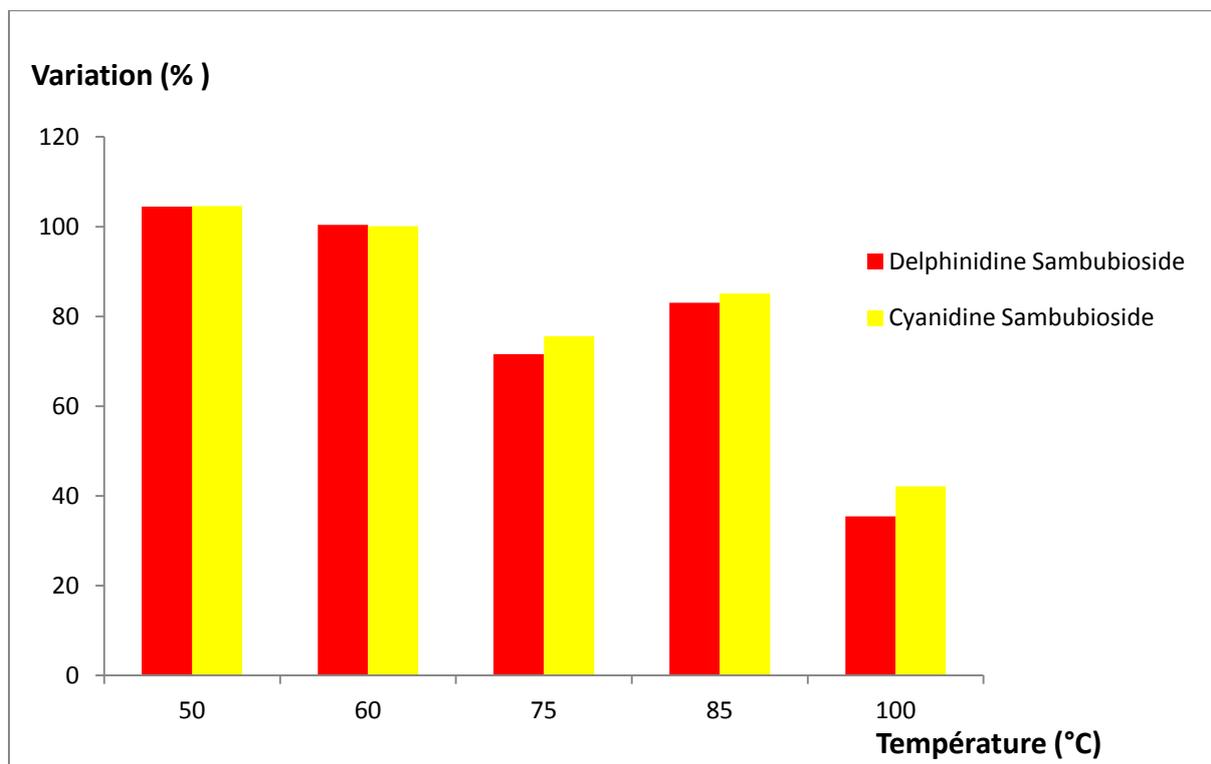


Figure 67 : Evolution de la teneur en anthocyanes majoritaires des concentrés d'extraits aqueux d'*Hibiscus sabdariffa* L en fonction de la température d'évaporation

3.3. Etude de la stabilité des extraits aqueux pendant le stockage

3.3.1. Cinétiques de dégradation des anthocyanes

Dans cette partie, nous avons étudié l'influence de la teneur en extrait sec soluble sur la stabilité des anthocyanes au cours du stockage. Pour cela, un concentré à 60°Brix produit par évaporation sous vide a été dilué afin d'obtenir les extraits à 10, 20, 30, 40 et 50 °Brix. Ces solutions sont ensuite stockées à différentes températures : 4, 20, 30, 37 et 45 °C.

La **figure 68** présente l'évolution de la teneur en anthocyanes des extraits au cours de la conservation. L'allure des courbes de dégradation semble correspondre à une régression linéaire et la cinétique est ainsi supposée d'ordre 1. Plusieurs auteurs ont montré que la dégradation des anthocyanes dans les extraits de fruits comme les oranges rouges (Kirca et Cemeroğlu 2003) et les fraises (Verbeyst et al. 2011) suit une régression d'ordre 1.

La dégradation des anthocyanes des extraits augmente en fonction de la température de stockage (**Tableau 29**). Ainsi, les constantes de vitesse k à 4 °C varient de $1,48.10^{-8}$ à $42,62.10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans l'extrait à 10 °Brix, de $1,49.10^{-8}$ à $44,77.10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans l'extrait à 30° et de $1,07.10^{-8}$ à $50,45.10^{-8} \text{ s}^{-1}$ dans l'extrait à 50 °Brix. Ces résultats sont conformes aux travaux qui ont montré l'influence de la température sur la dégradation des anthocyanes dans les extraits de végétaux tels que les mûres (Jiménez et al. 2010), les jus de carottes noirs et les oranges rouges (Kirca et Cemeroğlu 2003; Kirca, Özkan, et Cemeroğlu 2006).

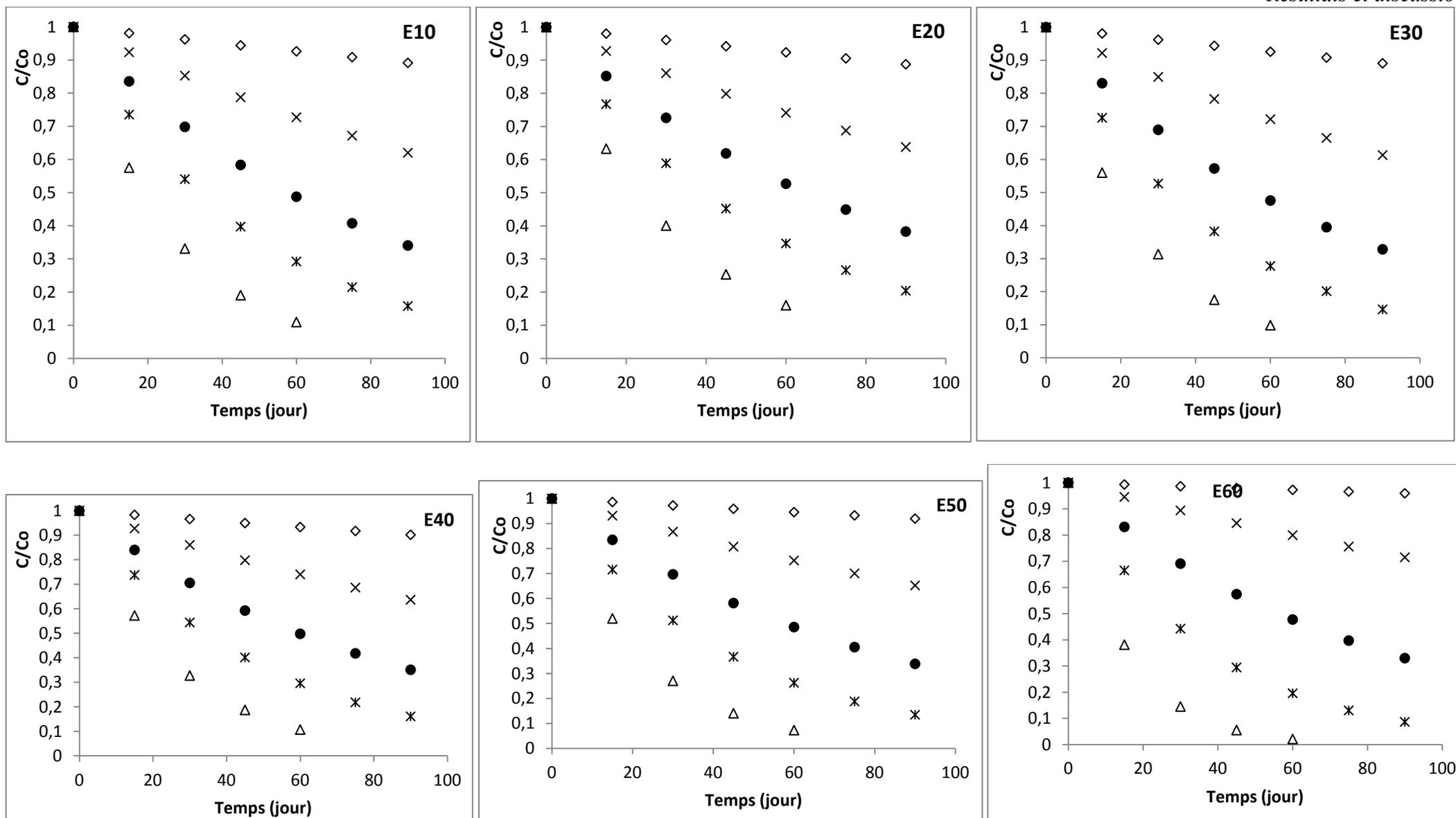


Figure 68 : Evolution de la teneur en anthocyanes des extraits de Bissap pendant le stockage à différentes températures : \diamond , 4 °C ; \times , 20 °C ; \bullet , 30 °C ; $*$, 37 °C ; Δ , 45 °C

Tableau 29 : Constantes de vitesse (k), durée de demi-vie ($t_{1/2}$) et durée de destruction décimales (D) des anthocyanes des extraits de calices de Bissap pendant le stockage (4 à 45°C)

Extraits	Température (°C)	Expérimental		Modélisation	
		k ($10^{-8}s^{-1}$)	$t_{1/2}$ (j)	k ($10^{-8}s^{-1}$)	$t_{1/2}$ (j)
E10	4	2,86 (0,43)	281	1,48	542
	20	6,25 (0,60)	128	6,14	131
	30	12,50 (0,63)	64	13,85	58
	37	21,81 (1,20)	37	23,73	34
	45	52,64 (1,91)	15	42,64	19
E20	4	2,66 (0,15)	302	1,53	525
	20	5,99 (0,48)	134	5,78	139
	30	11,55 (0,61)	69	12,35	65
	37	17,79 (0,88)	45	20,41	39 (2)
	45	43,57 (1,12)	18	35,28	23 (1)
E30	4	3,78 (0,18)	212	1,49	538
	20	6,23 (0,35)	129	6,30	127
	30	12,18 (0,81)	66	14,34	56
	37	23,06 (1,79)	35	24,73	32
	45	59,34 (1,77)	14	44,76	18
E40	4	1,30 (0,13)	619	2,13	377
	20	5,56 (0,13)	144	8,20	98
	30	14,12 (0,43)	57	17,75	45
	37	23,00 (0,04)	35	29,57	27
	45	42,71 (0,69)	19	51,56	16
E50	4	2,87 (0,24)	280	1,08	744
	20	5,54 (0,37)	145	5,50	146
	30	12,89 (0,76)	62	13,94	58
	37	23,27 (1,34)	34	25,81	31
	45	63,69 (1,42)	13	50,46	16
E60	4	1,33 (0,05)	602	0,53	1506
	20	5,64 (0,53)	142	4,32	186
	30	12,05 (1,24)	67	14,26	56
	37	30,75 (2,36)	26	31,45	26
	45	94,75 (4,64)	8	74,41	11

En plus de la température de stockage, nous avons constaté que la dégradation des anthocyanes est fortement influencée par le teneur en extrait sec soluble. L'impact de la teneur en extrait sec soluble sur cette dégradation varie en fonction de la température (**Figure 69**). En effet, lorsque la température est inférieure à 20 °C, les extraits les plus concentrés présentent une meilleure stabilité. Ainsi, à la température de 4 °C, les valeurs de la constante de vitesse k sont $1,48 \cdot 10^{-8}$, $1,07 \cdot 10^{-8}$ et $0,53 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ respectivement dans les extraits à 10, 50 et 60 °Brix. Ce résultat est similaire à ceux de Kirca et al.(2007) qui trouvent des constantes de dégradation de $1,38 \cdot 10^3 \text{ jour}^{-1}$, $1,15 \cdot 10^3 \text{ jour}^{-1}$ et $0,46 \cdot 10^3 \text{ jour}^{-1}$ respectivement dans les extraits de carottes noires à 30, 45 et 64 ° Brix stockés à 4 °C (Kirca, Özkan, et Cemeroglu 2007a). Par contre, lorsque la température est supérieure à 37 °Brix, les extraits les plus concentrés sont plus sensibles à la dégradation thermique. Ainsi, au cours du stockage à 45 °C, les constantes de vitesse k sont de $42,64 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$, $50,45 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ et $74,41 \cdot 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ respectivement dans les extraits à 10, 50 et 60 °Brix. Dans ses travaux sur les cerises acides, Cemeroglu et al. (1994) montrent la même tendance à 50°C avec des constantes de vitesse de $3,99 \cdot 10^3$, $5,1 \cdot 10^3$ et $7,5 \cdot 10^3 \text{ jour}^{-1}$ respectivement dans les jus de cerises à 15, 45 et 71 °Brix (Cemeroglu, Velioglu, et Isik 1994).

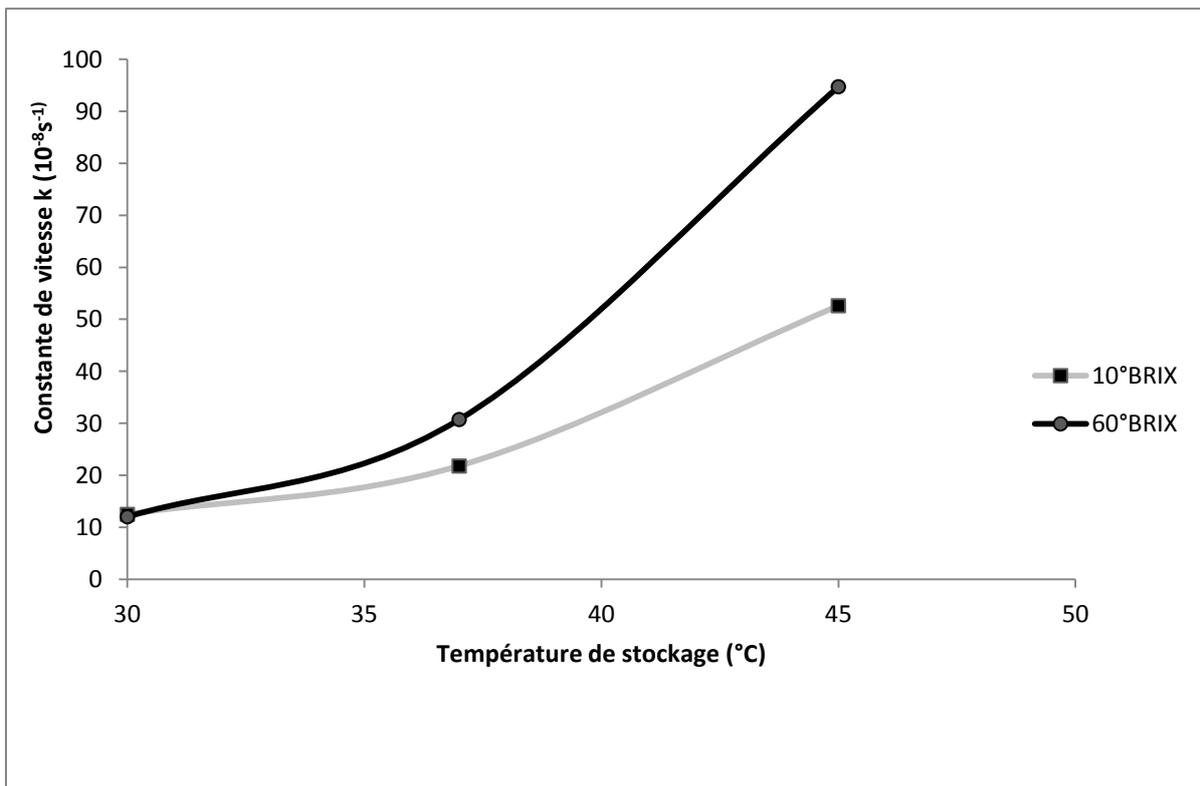
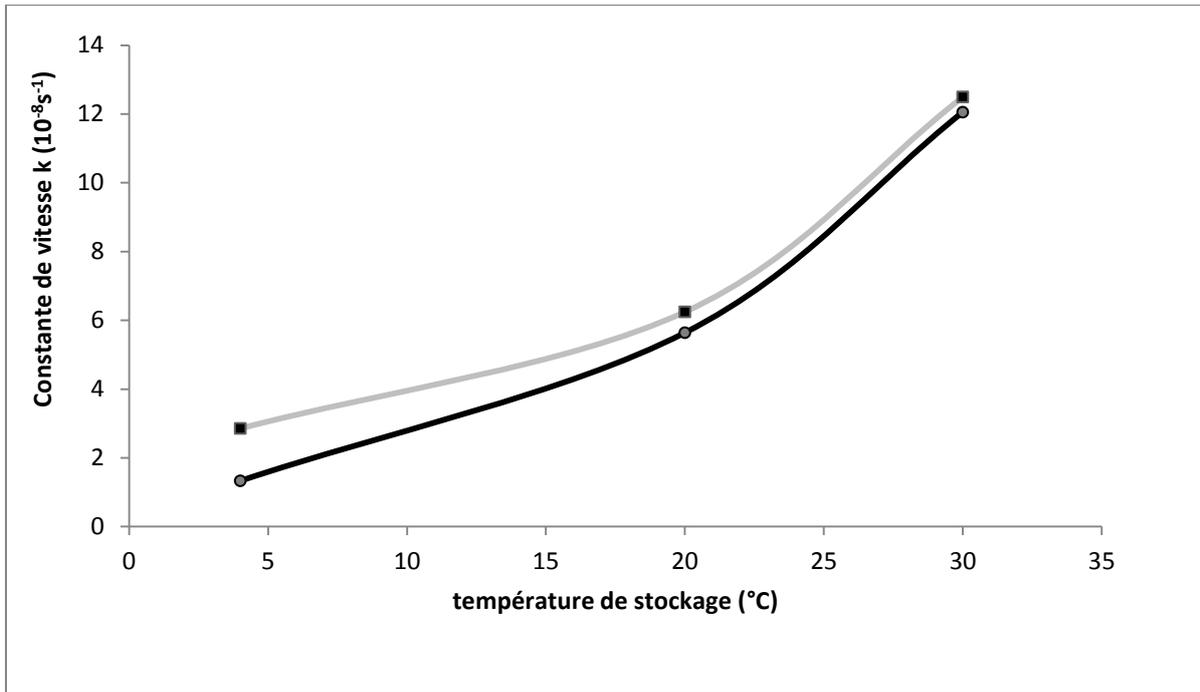


Figure 69 : Influence de la teneur en extrait sec soluble sur la vitesse de dégradation k des anthocyanes des extraits de Bissap.

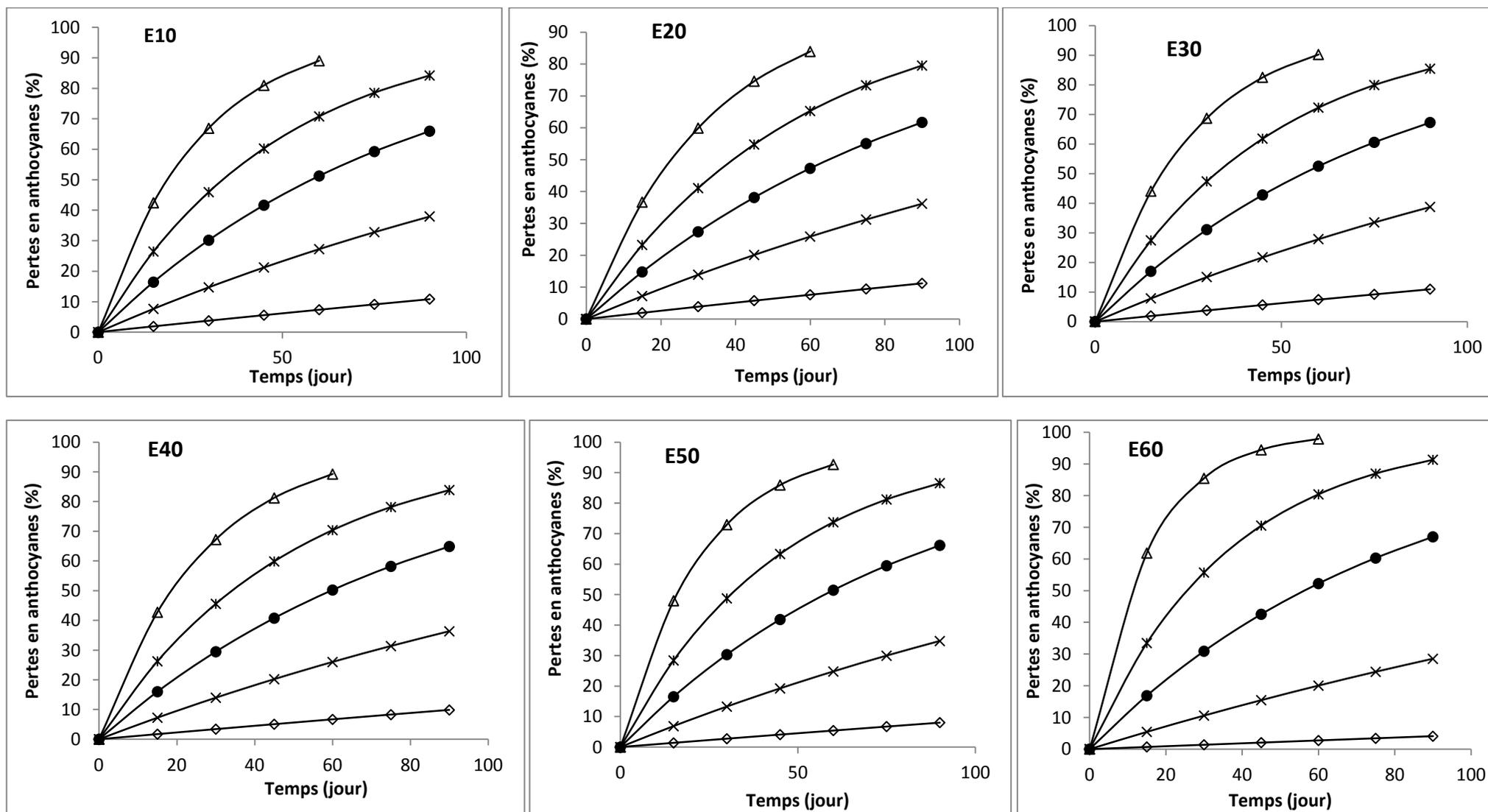


Figure 70 : Evolution des pertes en anthocyanes des extraits aqueux de Bissap en fonction de la température de stockage : ◇, 4 °C ; ×, 20 °C ; ●, 30 °C ; *, 37 °C ; Δ, 45 °C.

3.3.2. Modélisation et prédiction

Les modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring ont été utilisés pour la prédiction de la dégradation des anthocyanes dans les extraits aqueux de calices aux températures de 4, 20, 30, 37 et 45 °C. Nous avons d'abord déterminé les paramètres cinétiques pour chaque modèle (**Tableau 30**). En plus, une évaluation de la qualité des modèles a été réalisée par une comparaison des résultats calculés par rapport aux résultats expérimentaux.

Tableau 30 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes pendant le stockage entre 4 et 45 °C suivants les différents modèles de prédiction (Arrhenius, Ball et Eyring)

Extraits	Modèle d'Arrhenius		Modèle d'Eyring		Modèle de Ball	
	k_{30} ($10^{-8}s^{-1}$)	E_a (kJ mol ⁻¹)	ΔS^* (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔH^* (KJ mol ⁻¹)	D_{30} (jour)	z (°C)
E10	13,85 (0,61)	60,1 (3,6)	-91 (12)	58,0 (3,6)	196 (8)	29,3 (1,6)
E20	12,35 (0,49)	56,2 (3,2)	-105 (11)	54,0 (3,2)	221 (8)	31,3 (1,6)
E30	14,34 (0,77)	60,9 (4,4)	-87 (15)	59,0 (4,5)	189 (9)	29,0 (1,9)
E40	13,46 (0,17)	57,0 (3,4)	-88 (3)	59,0 (1,1)	154 (6)	28,4 (0,6)
E50	13,85 (0,61)	68,8 (4,1)	-64 (13)	66,0 (4,0)	195 (8)	25,9 (1,3)
E60	14,26 (0,79)	88,4 (5,4)	2 (18)	86,0 (5,4)	190 (10)	20,2 (1,1)

Les énergies d'activation déterminées à partir du modèle d'Arrhenius sont présentées dans le tableau 31. Les valeurs sont supérieures à celles de Cissé et al.(2012) qui trouvent une énergie d'activation de 26 kJ mol⁻¹ dans ses travaux sur des extraits de calices de Bissap à 42 g kg⁻¹ dans les même conditions de température (Cisse et al. 2012). Cette différence est sans doute due à l'impact de la teneur en extrait sec soluble. En effet, l'énergie d'activation déterminée entre 4 et 45 °C est en moyenne de 62 kJ mol⁻¹ lorsque la teneur en extrait sec soluble est comprise entre 100 et 500 g kg⁻¹. Cependant, cette énergie d'activation est plus élevée dans l'extrait concentré à 600 g kg⁻¹ avec une valeur de 88 kJ mol⁻¹ (**Figure 71**). Cette forte énergie d'activation montre que l'augmentation de la teneur en extrait sec soluble par le procédé d'évaporation sous vide entraîne une sensibilité à l'élévation de la température.

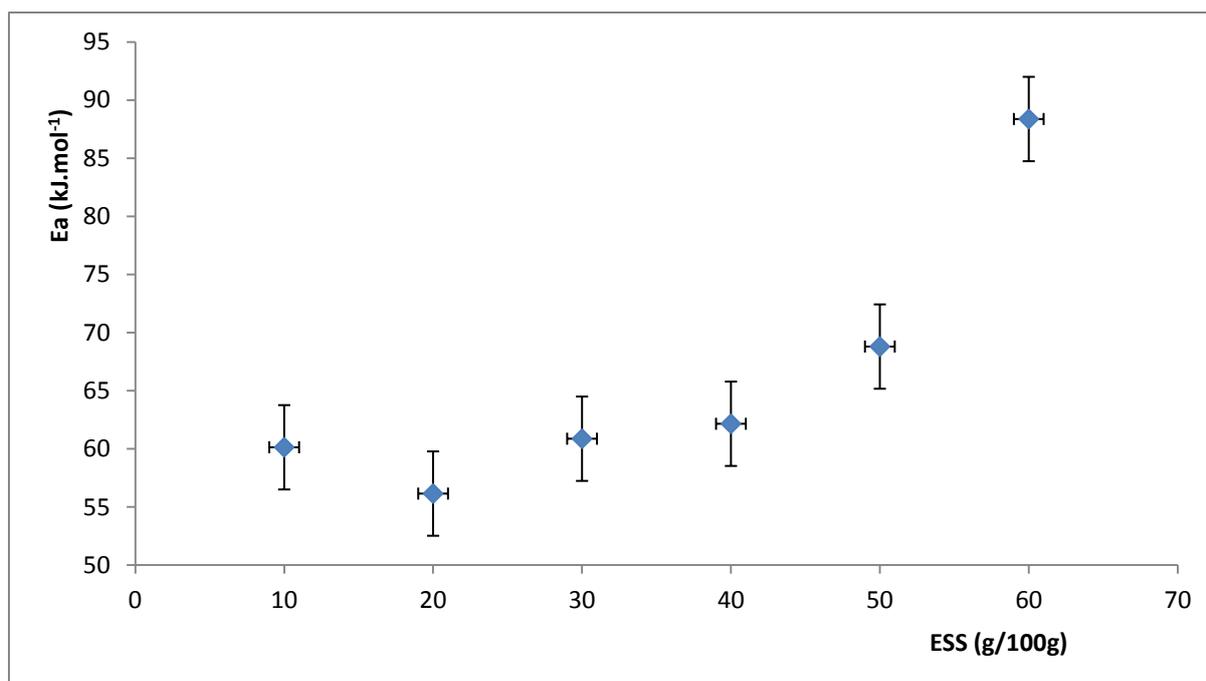


Figure 71 : Variation de l'énergie d'activation des anthocyanes en fonction de la teneur en extrait sec soluble dans les extraits aqueux de calices de Bissap

Ces résultats sont conformes à ceux trouvés par plusieurs auteurs sur la dégradation des anthocyanes dans les jus et concentrés de fruits (A. Garzón et Wrolstad 2002; Kirca, Özkan, et Cemeroglu 2007). C'est ainsi que dans leurs travaux sur la dégradation des anthocyanes d'oranges rouges stockés entre 5 et 37 °C, Kirca et al. (2003) ont trouvé des énergies d'activation de 73,2 et 80,9 kJ mol⁻¹ respectivement dans les extraits à 450 et 690 g kg⁻¹ (Kirca et Cemeroglu 2003). La sensibilité thermique des concentrés s'expliquerait la baisse de l'activité de l'eau. Jimenez et al.(2012) ont mis en évidence que la réduction de l'activité de l'eau favorise la dégradation des anthocyanes des jus de mûre lors du traitement thermique (Jimenez et al. 2012) .

L'augmentation de la vitesse de dégradation des anthocyanes avec la teneur en matières solides au cours du chauffage s'expliquerait par la proximité des molécules qui accélère les réactions (Nielsen, Marcy, et Sadler 1993). Les travaux de Garzón et al (2002) révèlent que dans les fraises, la dégradation des anthocyanes se produit dès qu'elles sont transformées en jus ou en concentrés et se poursuit pendant le stockage ; cette dégradation des anthocyanes est plus élevée dans les concentrés par rapport au de jus de fruits. (A. Garzón et Wrolstad 2002). Des tendances similaires ont été rapportés avec les anthocyanes dans la cerise (Cemeroglu, Velioglu, et Isik 1994). Cependant, ces résultats semblent être en contradiction avec ceux publiés par certains auteurs qui montrent que la baisse l'activité de l'eau aurait un effet positif

sur la stabilité thermique des anthocyanes (Lai, Dolan, et Ng 2009; Gradinaru et al. 2003; Thakur et Arya 1989).

Les résultats de prédiction de la dégradation des anthocyanes dans les extraits sont de très bonne qualité. Les coefficients de corrélation entre les pertes expérimentales et les pertes calculées par le modèle sont en moyenne supérieurs à 0,96. En plus, les points sur la courbe de comparaison sont très proches de la première bissectrice, ce qui confirme la validité du modèle (**Figure 72**). Cependant, à la température de 4 °C, nous observons une sous estimation des pertes par le modèle. Toutefois, les variations de pertes déterminées avec les deux méthodes sont très faibles et ne dépassent pas en moyenne 5 %.

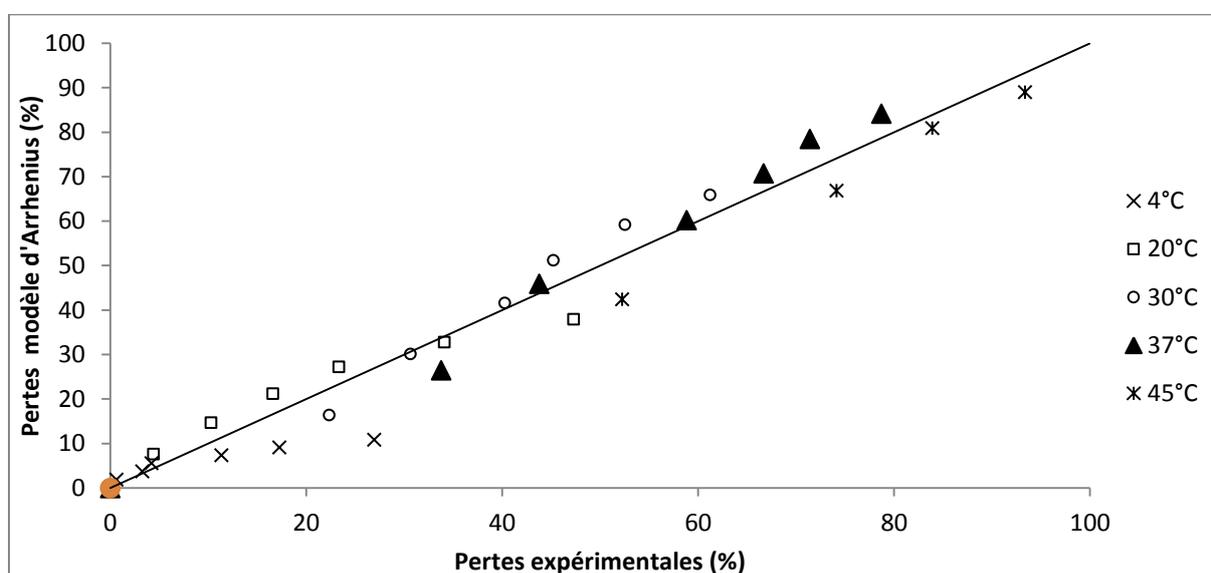


Figure 72 : Corrélation entre les pertes en anthocyanes expérimentales et les pertes calculées selon le modèle d'Arrhenius au cours stockage des calices de Bissap

3.4. Etude de la stabilité au traitement thermique des extraits aqueux

Dans cette partie, nous avons étudié l'influence de la teneur en extrait sec soluble sur la dégradation des anthocyanes au cours du traitement thermique. Les extraits à 10, 40 et 60 °Brix ont été traités au bain-marie aux températures de 70, 80, 90 et 95 °C. La variation de la teneur en anthocyanes totaux ainsi que l'indice brun et l'indice violet ont été mesurés.

3.4.1. Cinétique de dégradation thermique des anthocyanes des extraits

Les allures des courbes de dégradation (**Figure 73**) indiquent que la réaction est du premier ordre. Plusieurs auteurs ont trouvé des résultats similaires lors la dégradation thermique des extraits anthocyaniques (Chisté, Lopes, et De Faria 2010; Cisse, Vaillant, Acosta, Dhuique-Mayer, et al. 2009; Aurelio, Edgardo, et Navarro-Galindo 2008).

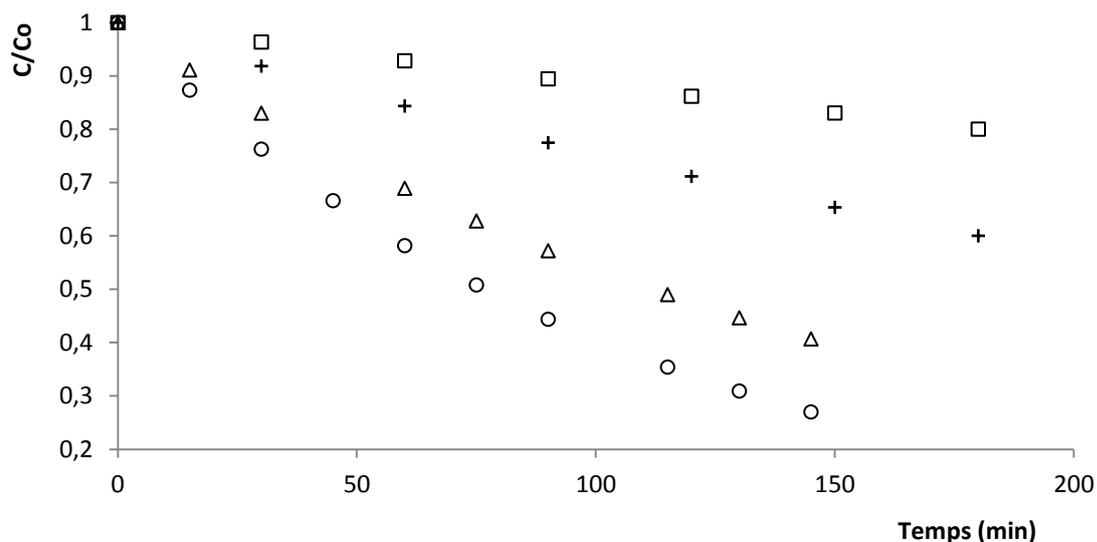


Figure 73 : Dégradation des anthocyanes de l'extrait aqueux de Bissap à 40 °Brix (E40) durant les traitements à différentes températures : ◇, 70 °C ; +, 80 °C ; Δ, 90 °C ; O, 95 °C.

La dégradation des anthocyanes augmente avec la température dans tous les extraits. En effet, la vitesse de dégradation augmente fortement avec la température de traitement. Ainsi, entre 70 et 95 °C cette vitesse passe respectivement de $1,64 \cdot 10^{-3}$ à $5,13 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dans l'extrait à 100 g kg^{-1} , de $1,34 \cdot 10^{-3}$ à $5,17 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dans l'extrait à 400 g kg^{-1} ° Brix et de $1,70 \cdot 10^{-3}$ à $9,53 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dans l'extrait à 60 °Brix (**Tableau 31**). Par conséquent, la stabilité des anthocyanes baisse fortement avec la température de traitement. Nous remarquons qu'entre 70 et 95 °C, les temps de demi-vie varient respectivement de 7,0 à 2,4 h dans l'extrait à 100 g kg^{-1} , de 8,6 à 1,2 h dans l'extrait à 400 g kg^{-1} et de 6,8 à 0,7 h dans l'extrait à 600 g kg^{-1} .

La même tendance est observée pendant les traitements thermiques d'extraits anthocyaniques. Nous observons qu'entre 70 et 90 °C, les temps de demi-vie varient de 11,55 à 3,21 h dans les infusions de Bissap (Aurelio, Edgardo, et Navarro-Galindo 2008) et de 11,6 à 7,5 h dans les anthocyanes de maïs (Yang et al. 2008). Le mécanisme de dégradation des anthocyanes avec la température n'est pas encore bien élucidé. Cependant, il est indiqué que les fortes températures peuvent entraîner une modification de la structure des anthocyanes avec formation des calcones.

Tableau 31 : Effet du traitement thermique sur la constante de vitesse k et le temps de demi-vie $t_{1/2}$, durée de destruction décimale D des anthocyanes et de l'apparition de l'indice brun des extraits aqueux de Bissap.

Extraits	Température (°C)	Anthocyanes			Indice brun		
		k (10^{-3} min)	$t_{1/2}$ (h)	D (h)	$-k$ (10^{-3} min)	$t_{1/2}$ (h)	D (h)
E10	70 °C	1,64 (0,08)	7,0	23,3	0,59 (0,02)	19,4	64,4
	80 °C	1,96 (0,10)	5,9	19,6	0,66 (0,07)	17,5	58,1
	90 °C	3,90 (0,25)	3,0	10,0	2,65 (0,92)	4,4	14,6
	95 °C	4,80 (0,13)	2,4	8,0	5,49 (0,37)	2,1	7,0
E40	70 °C	1,34 (0,05)	8,6	28,6	1,03 (0,07)	11,2	37,2
	80 °C	2,86 (0,57)	4,0	13,3	2,58 (1,04)	4,5	14,9
	90 °C	5,17 (0,62)	2,2	7,3	4,61 (0,43)	2,5	8,3
	95 °C	9,46 (0,21)	1,2	4,0	5,49 (0,37)	2,1	7,0
E60	70 °C	1,70 (0,05)	6,8	22,6	1,72 (0,18)	6,7	22,3
	80 °C	3,30 (0,16)	3,5	11,6	2,66 (1,90)	4,3	14,3
	90 °C	9,53 (0,20)	1,2	4,0	6,15 (0,47)	1,9	6,3
	95 °C	17,04 (0,68)	0,7	2,3	6,80 (0,31)	1,7	5,6

La dégradation des anthocyanes est aussi largement influencée par la teneur en extrait sec soluble. En effet, la vitesse de dégradation est d'autant plus forte que la teneur en extrait sec soluble est grande. Par exemple, pendant le traitement à 80 °C, la constante k varie de $1,96 \cdot 10^{-3}$, $2,86 \cdot 10^{-3}$ et $3,30 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ respectivement dans les extraits à 100, 400 et 600 g kg⁻¹. Cet effet est beaucoup plus marqué lorsque la température est plus élevée. Ainsi, pendant le traitement à 95 °C, la vitesse de dégradation varie de $4,8 \cdot 10^{-3}$, $9,46 \cdot 10^{-3}$ et $17,04 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ respectivement dans les extraits à 100, 400 et 600 g kg⁻¹ (**Tableau 33**). Ces résultats confirment ceux trouvés dans plusieurs travaux montrant l'influence de la teneur en extrait sec soluble sur la stabilité des anthocyanes lors des traitements thermiques. Par exemple, les vitesses de dégradation des anthocyanes sont de $33,97 \cdot 10^{-3}$, $57,19 \cdot 10^{-3}$ et $97,14 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ respectivement pour des extraits de cerises à 150, 450 et 710 g kg⁻¹ traités à 80 °C

(Cemeroglu, Velioglu, et Isik 1994). De même dans les extraits de carottes noires traitées à 80 °C, les vitesses de dégradation des anthocyanes sont de $2,30.10^{-3}$, $2,57.10^{-3}$, $3,57.10^{-3}$ et $4,98.10^{-3} \text{ min}^{-1}$ respectivement dans des extraits à 110, 300, 450 et 600 g kg⁻¹ (Kırca, Özkan, et Cemeroglu 2007b).

3.4.2. Modélisation et prédiction

Les paramètres cinétiques obtenus à partir des modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring sont représentés dans le **tableau 32**. Nous remarquons que l'augmentation de la teneur en extrait sec soluble entraîne un accroissement de la sensibilité à l'élévation de la température de traitement. Ainsi, l'énergie d'activation augmente deux fois plus importante dans l'extrait à 600 g kg⁻¹ que dans l'extrait à 100g kg⁻¹. L'augmentation de la vitesse de dégradation des anthocyanes avec la teneur en matières solides au cours du chauffage s'expliquerait par la proximité des molécules qui accélère les réactions (Nielsen, Marcy, et Sadler 1993).

Tableau 32 : Paramètres des cinétiques de dégradation des anthocyanes des extraits aqueux de Bissap pendant le traitement thermique entre 70 et 95 °C suivant les différents modèles de prédiction

Extraits	Modèle d'Arrhenius		Modèle d'Eyring		Modèle de Ball	
	k ₈₀ (10 ⁻³ min ⁻¹)	E _a (kJ mol ⁻¹)	ΔS* (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	ΔH* (kJ mol ⁻¹)	D ₈₀ (10 ³ min)	z (°C)
E10	3,72 (0,15)	52,0 (4,3)	-161 (12)	48,0 (4,3)	1,58 (0,13)	46,9 (3,8)
E40	2,83 (0,09)	83,5 (2,8)	-63 (8)	82,0 (2,8)	1,81 (0,09)	29,1 (0,9)
E60	2,40 (0,12)	104,9 (3,8)	-1 (10)	103,0 (3,8)	1,71 (0,11)	23,1 (0,8)

Les trois modèles de prédiction (Arrhenius, Ball et Eyring) permettent de faire une bonne estimation de la dégradation des anthocyanes au cours du traitement thermique. En effet, les paramètres cinétiques calculés à partir de ces modèles sont proches des valeurs expérimentales. Ainsi, ces modèles permettent de faire de bonnes prédictions des pertes en anthocyanes au cours du traitement thermique. Ces résultats sont illustrés dans le **tableau 33**.

Tableau 33 : Pertes expérimentales en anthocyanes et pertes estimées avec les modèles d'Arrhenius, de Ball et d'Eyring pour l'extrait à E60 durant le traitement thermique à 90 °C

Temps (min)	Pertes en anthocyanes (%)			
	Expérimentale	Modèle d'Arrhenius	Modèle Ball	Modèle d'Eyring
0	0,0	0,0	0,0	0,0
15	12,8	13,9	13,7	13,9
30	21,5	25,8	25,6	25,8
45	33,7	36,1	35,8	36,1
60	48,0	44,9	44,6	44,9
75	52,1	52,6	52,3	52,6
90	57,3	59,1	58,8	59,2
115	65,5	68,1	67,8	68,1
130	70,4	72,5	72,2	72,6
145	75,0	76,3	76,1	76,4

Afin de mettre en évidence l'effet du traitement thermique sur les extraits aqueux de Bissap, nous avons mesuré l'évolution des spectres d'absorption.

3.4.3. Evolution du spectre d'absorption durant les traitements thermiques

Nous avons observé une variation continue du spectre d'absorption mesurée entre 400 et 800 nm pendant les traitements thermiques des extraits (**Figure 74**). A ce niveau, nous remarquons que la dégradation des anthocyanes des extraits s'accompagne d'une baisse de l'absorbance à 520 nm. Ainsi, pendant le traitement à 70 °C entre 30 et 120 min, la densité optique à 520 varie de 1,05 à 0,99 dans l'extrait à 100 g kg⁻¹ et de 0,91 à 0,71 pour l'extrait à 600 g kg⁻¹. Cette baisse de l'absorbance, à la longueur d'onde maximale des anthocyanes, observée dans de nombreux travaux (Cisse et al. 2012), confirme la sensibilité des anthocyanes aux traitements thermiques.

A partir de 90 °C, nous constatons une forte augmentation de l'absorbance entre 400 et 450 nm en particulier pour l'extrait à 600 g kg⁻¹. Ainsi, dans cet extrait (E60), entre 30 et 130 min de traitement, la densité optique à 430 nm passe de 0,54 à 0,67 et de 0,55 à 0,76 respectivement pour les traitements à 90 et 95 °C. L'augmentation des absorbances à 430 nm est sans doute liée à l'apparition de composés résultant du brunissement lors de la dégradation des anthocyanes des extraits aqueux. Pour confirmer cette hypothèse, l'analyse de l'évolution de l'indice de brunissement a été réalisée.

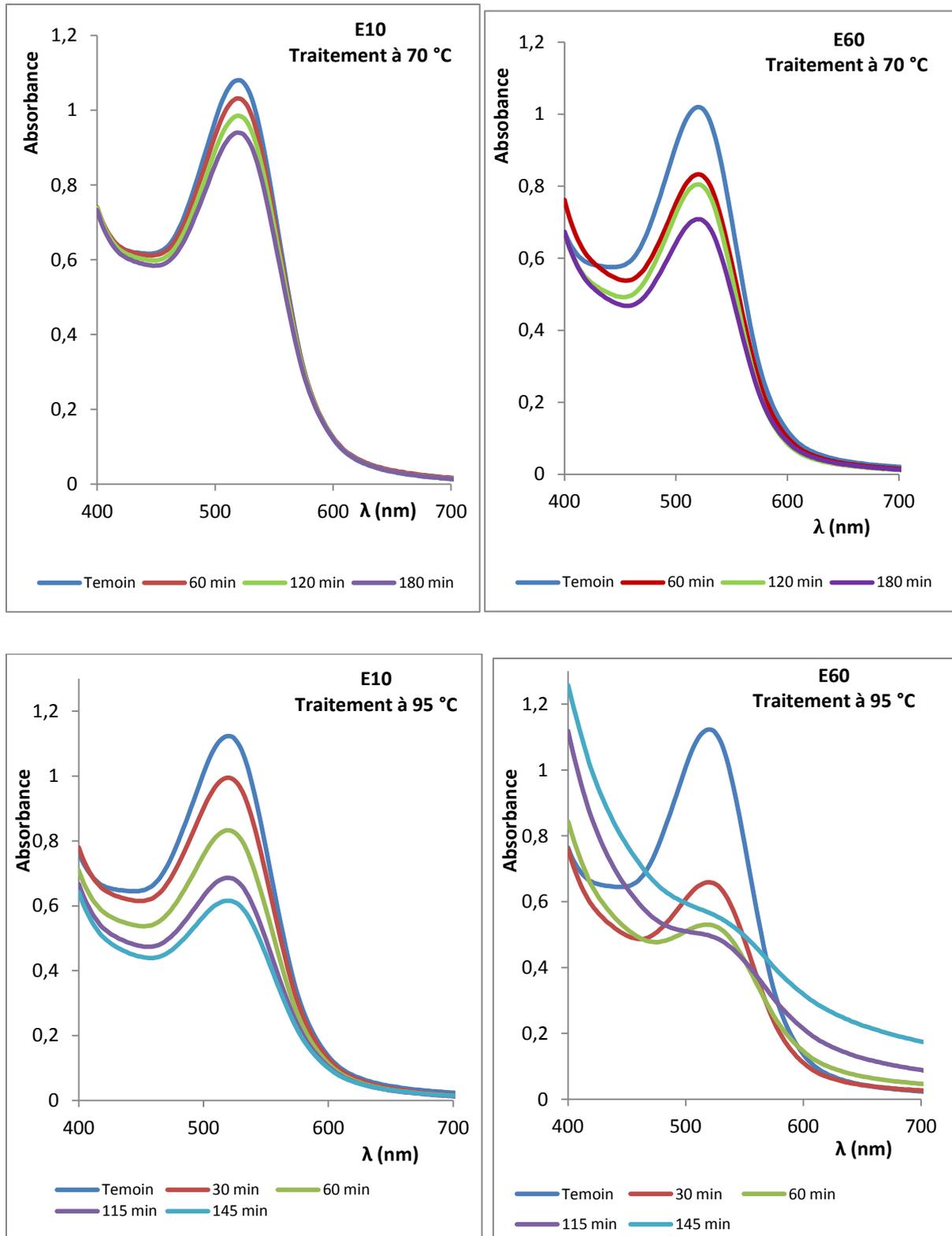


Figure 74 : Variation du spectre d'absorption des extraits aqueux de calices de Bissap en fonction de la température et de la teneur en extrait sec soluble.

3.4.4. Cinétique de dégradation de la couleur des extraits

Dans cette partie, nous avons déterminé la variation de l'indice brun au cours du traitement thermique. Nous pouvons observer sur les courbes (**Figure 75**) une augmentation de l'indice brun selon une cinétique de réaction d'ordre 1.

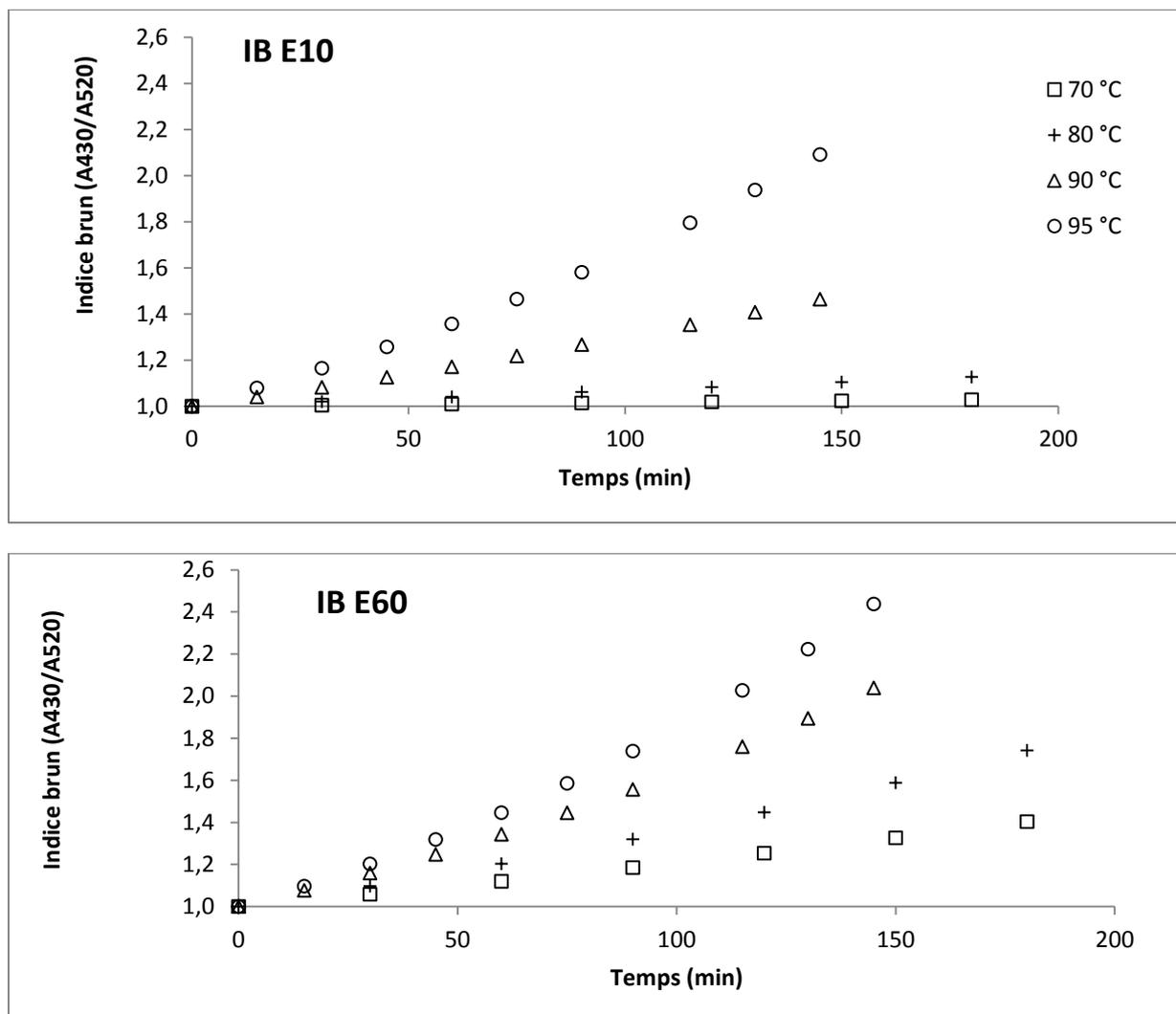


Figure 75 : Augmentation de l'indice brun (IB) des extraits aqueux de calices de Bissap au cours des traitements thermiques à différentes températures : ◊, 70 °C ; +, 80 °C ; Δ, 90 °C ; O, 95 °C.

Les résultats obtenus montrent que le traitement thermique entraîne le brunissement des extraits aqueux de Bissap. L'indice brun augmente avec la température et la teneur en extrait sec soluble. Nous observons Ainsi qu'entre 70 et 95 °C, la constante de vitesse varie de $0,59 \cdot 10^{-3}$ à $2,65 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dans l'extrait à 10 °Brix, de $1,03 \cdot 10^{-3}$ à $4,61 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dans l'extrait à 400 g kg⁻¹ et de $1,72 \cdot 10^{-3}$ à $6,15 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ dans l'extrait à 600 g kg⁻¹. Ces résultats

montrent ainsi que la dégradation des anthocyanes des extraits a pour conséquence la formation de composés bruns.

Les paramètres cinétiques des modèles de prédiction d'Arrhenius, d'Eyring et de Ball sont déterminés et présentés dans le tableau suivant.

Tableau 34 : Paramètres cinétiques de l'indice brun selon les modèles de prédiction (Arrhenius, Eyring et Ball) lors des traitements thermiques entre 70 et 95 °C des extraits aqueux de Bissap.

EXTRAITS	Modèles et paramètres					
	Modèle d'Arrhenius		Modèle d'Eyring		Modèle de Ball	
	$k_{30^{\circ}\text{C}}$ (10^{-3} min^{-1})	E_a (kJ mol^{-1})	ΔS^* ($\text{J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$)	ΔH^* (kJ mol^{-1})	D_{80} (10^3 min)	z ($^{\circ}\text{C}$)
E10	0,66 (0,13)	146,0 (14,7)	135 (42)	156,7 (14,8)	12,6 (0,1)	17,3 (0,8)
E40	2,41 (0,15)	56,3 (5,3)	-128 (14)	59,5 (5,3)	1,6 (0,2)	43,9 (4,1)
E60	3,08 (0,24)	49,7 (6,5)	-167 (17)	45,0 (6,3)	1,1 (0,2)	49,8 (6,5)

L'énergie d'activation de la réaction de brunissement augmente avec la teneur en extrait sec soluble. Cette énergie est ainsi cinq fois plus importante lorsqu'on passe d'un extrait à 100 g kg⁻¹ à un extrait à 600 g kg⁻¹ (**Tableau 34**). Ces résultats confirment que l'augmentation de la teneur en extrait sec soluble accroît la sensibilité des anthocyanes à la dégradation thermique. Ainsi, la concentration des extraits entraîne une sensibilité à une élévation de la température.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet de recherche, l'objectif principal était d'étudier les voies de valorisation des calices rouge *d'Hibiscus sabdariffa* L. C'est ainsi que la caractérisation des principales variétés de calices cultivées au Sénégal a été effectuée. Cette étape est suivie d'un diagnostic des procédés traditionnels de transformation de ces calices en boisson et en sirop par des entreprises locales. Enfin, la production d'un concentré anthocyanique à base de calices d'hibiscus par évaporation sous vide a été réalisée.

Les résultats expérimentaux révèlent que ces calices montrent des caractéristiques physicochimiques et biochimiques très distinctes. En effet, les variétés Vimto et CLT92 sont plus riches en anthocyanes et en polyphénols totaux ; la variété Koor se distingue par un faible pH et la variété Thaï par une forte teneur en lipides. L'analyse de la variance (ANOVA) montre que ces quatre variétés de calices présentaient des compositions significativement différentes. Les paramètres caractéristiques de chaque variété de calice ont été identifiés par l'analyse par composantes principales (ACP). Une combinaison de variables non corrélées et simples à mesurer a ensuite permis de réaliser une bonne discrimination des variétés de calices (AFD) et d'aboutir à leur classification avec un taux de réussite de 100 %. Ainsi, ces résultats mettent en évidence que les variétés de calices peuvent être identifiées à partir de leur composition physicochimique.

L'analyse des extraits en HPLC-MS a montré que les quatre variétés de calices analysés présentaient les mêmes profils polyphénoliques. Les composés identifiés sont constitués de quatre acides phénoliques (les isomères 3, 4 et 5 de l'acide cafféoyl-quinique, et l'acide cafféoyl-shikimique), deux anthocyanes (la delphinidine sambubioside et la cyanidine sambubioside) et sept flavonols (la myricétine sambubioside, la myricétine hexoside, la quercétine rutinoside pentoside, la quercétine sambubioside, la quercétine hexoside et le kaempferol rutinoside). Cette composition en polyphénols met clairement en évidence les intéressantes propriétés sensorielles et thérapeutiques de ces calices. Une bonne stabilité des anthocyanes est constatée dans les calices lorsqu'ils sont stockés à des températures inférieures à 30 °C. C'est ainsi que ces produits sont retrouvés sur le marché pendant toute l'année.

Le diagnostic des procédés traditionnels de transformation des calices a été réalisé en collaboration avec de petites entreprises locales qui comptent moins d'une dizaine d'employés pour la plupart. Les étapes successives dans les diagrammes de production des boissons et sirops sont pratiquement les mêmes pour toutes ces unités. Cependant, des différences significatives sont notées en particulier dans la formulation (taux de sucre) et de traitement thermique. Quelques étapes critiques ont fait l'objet d'améliorations dans le cadre de ce projet. Le broyage des calices a permis d'augmenter les rendements d'extraction aqueuse. L'utilisation des poches filtrantes en polystyrène de 25 µm de diamètre, réutilisables pendant plus de 6 mois, a permis d'aboutir à des filtrats de meilleures qualités et d'améliorer la rentabilité. La maîtrise du traitement thermique permet de préserver les qualités sensorielle, nutritionnel et microbiologique des boissons et sirops de Bissap. La mise en place des barèmes de pasteurisation et le contrôle des températures par des thermomètres manuels facilitent considérablement cette étape. Une meilleure stabilité des boissons par rapport au sirop a été observée pendant le stockage. La technique de dissolution du sucre à froid lors de la formulation des sirops permettrait de réduire la consommation d'énergie et de préserver la qualité nutritionnelle (anthocyanes, vitamine) de ce produit. La modernisation des outils de production et le respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF) permettra de rendre plus compétitives nos entreprises locales.

La production de concentrés aqueuse est une nouvelle opportunité de valorisation de ces calices de Bissap. Le procédé d'évaporation sous vide a permis de développer des concentrés anthocyaniques de très grandes qualités sensorielles et nutritionnelles. Les tests sensoriels réalisés ont montré que les boissons produites à partir de ces concentrés sont très appréciées par les consommateurs africains et européens. Cependant, les conditions opératoires, et particulièrement la température d'évaporation, sont des facteurs à maîtriser pour garantir la bonne qualité de ce produit. En effet, seule une évaporation à basse température (50 °C) a permis d'aboutir à un concentré à 600 g kg⁻¹ sans dégradation notable des anthocyanes. L'évaporation osmotique, réalisée à des températures inférieures à 40 °C, présente ainsi comme une bonne alternative pour garantir la qualité des concentrés. Ces travaux ont aussi mis en évidence l'influence de la teneur en extrait sec soluble sur la stabilité des anthocyanes. Cette dégradation augmente avec la température et correspond à une cinétique de réaction d'ordre 1. Ainsi, la température doit être bien contrôlée dans les procédés de transformation tels que la production des concentrés, des sirops et des confitures de Bissap. De même, à défaut d'utiliser les conservateurs alimentaires, les barèmes de pasteurisation doivent être

optimisés afin de préserver la qualité sensorielle et nutritionnelle de ces produits. Les résultats montrent aussi que la stabilité des anthocyanes diminue avec l'accroissement de la teneur en extrait soluble. En effet, les pertes en anthocyanes et le brunissement des extraits sont plus importantes dans le concentré à 600g kg^{-1} . Par conséquent, pour assurer la qualité de la production et la stabilité des anthocyanes des concentrés de Bissap, le recours à des procédés de traitement à basse température s'impose.

PERSPECTIVES

En plus de la vulgarisation des résultats de ce projet dans le cadre des communications scientifiques, des campagnes de sensibilisation et de formation peuvent être entreprises. Les populations devraient être informées sur l'intérêt de la consommation des produits à base de calices de Bissap. L'exemple du projet AFTER doit être pris dans la formation des transformateurs locaux de ces calices.

Ce travail de recherche peut être amélioré et approfondi par quelques études supplémentaires.

1. Etude de la production des concentrés d'hibiscus par évaporation osmotique
 - ✓ Optimisation des conditions opératoires,
 - ✓ Etude de l'impact du procédé sur la qualité nutritionnelle et la stabilité du concentré,
2. Etude de l'impact des conditions de séchage sur la teneur en anthocyane et la qualité des calices :
 - ✓ Etude du séchage solaire au sol ou sur claie, caractérisation des conditions de traitement traditionnelles et définition d'une humidité résiduelle.
 - ✓ Etude du séchage à l'air chaud avec une température et humidité relative contrôlées.
3. Etude de la stabilité de la couleur dans diverses matrices colorées à partir du concentré à 600g kg^{-1} d'extrait sec soluble.
 - ✓ Utilisation du concentré pour colorer une matrice laitière type yaourt.
 - ✓ Utilisation du concentré pour colorer une matrice boisson type jus et/ou soda.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abellana, M, V Sanchis, et A. J Ramos. 2001. « Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue ». *International Journal of Food Microbiology* 71 (2–3): 151-57.
- Abu-Tarboush, Hamza M., Saif Aldin B. Ahmed, et Hassan A. Al-Kahtani. 1997. « Some nutritional and functional properties of karkade (*Hibiscus sabdariffa*) seed products ». <http://scholar.google.com/scholar?cluster=14399811506228360586&hl=en&oi=scholar>.
- AFNOR. 1982. « Produits dérivés des fruits et légumes ». AFNOR. Paris, France.
- Ahmed, J., U. S. Shivhare, et G. S. V. Raghavan. 2004. « Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanin and Visual Colour of Plum Puree ». *European Food Research and Technology* 218 (6): 525-28.
- Al-Farsi, Mohamed, Cesarettin Alasalvar, Anne Morris, Mark Baron, et Fereidoon Shahidi. 2005. « Comparison of Antioxidant Activity, Anthocyanins, Carotenoids, and Phenolics of Three Native Fresh and Sun-Dried Date (*Phoenix dactylifera* L.) Varieties Grown in Oman ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (19): 7592-99.
- Alighourchi, Hamidreza, et Mohsen Barzegar. 2009. « Some physicochemical characteristics and degradation kinetic of anthocyanin of reconstituted pomegranate juice during storage ». *Journal of Food Engineering* 90 (2): 179-85.
- Andersen, O.M., et M Jordheim. 2006. « Anthocyanins ». In *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor and Francis, 451-552. Boca Raton, FL, USA: O.M. Andersen and K.R. Markahan.
- Andriambelason, Emile, Céline Magnier, Gisèle Haan-Archipoff, Annelise Lobstein, Robert Anton, Alain Beretz, Jean Claude Stoclet, et Ramaroson Andriantsitohaina. 1998. « Natural Dietary Polyphenolic Compounds Cause Endothelium-Dependent Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta ». *The Journal of Nutrition* 128 (12): 2324-33.
- Arts, Ilja C. W., Betty van de Putte, et Peter C. H. Hollman. 2000. « Catechin Contents of Foods Commonly Consumed in The Netherlands. 2. Tea, Wine, Fruit Juices, and Chocolate Milk ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (5): 1752-1757.
- Astoreca, Andrea, Carina Magnoli, María L. Ramirez, Mariana Combina, et Ana Dalcerro. 2007. « Water activity and temperature effects on growth of *Aspergillus niger*, *A. awamori* and *A. carbonarius* isolated from different substrates in Argentina ». *International Journal of Food Microbiology* 119 (3): 314-318.
- Aurelio, Domínguez-López, Remondetto Gabriel Edgardo, et Salvador Navarro-Galindo. 2008. « Thermal Kinetic Degradation of Anthocyanins in a Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L. Cv. 'Criollo') Infusion ». *International Journal of Food Science & Technology* 43 (2): 322-325.

- Babalola, S. O. 1 Babalola. 2001a. « Compositional Attributes of the Calyces of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) ». *The Journal of Food Technology in Africa* 6 (4): 133-34.
- Babalola, S. O. 1 Babalola. 2001b. « Compositional Attributes of the Calyces of Roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) ». *The Journal of Food Technology in Africa*.
- Bahemuka, T. E, et E. B Mubofu. 1999. « Heavy metals in edible green vegetables grown along the sites of the Sinza and Msimbazi rivers in Dar es Salaam, Tanzania ». *Food Chemistry* 66 (1): 63-66.
- Bąkowska, Anna, Alicja Z. Kucharska, et Jan Oszmiański. 2003. « The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex ». *Food Chemistry* 81 (3): 349-55.
- Barros, Lillian, Montserrat Dueñas, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira, et Celestino Santos-Buelga. 2012. « Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal ». *Food and Chemical Toxicology* 50 (5): 1576-82.
- Bechoff, Aurélie, Mady Cissé, Geneviève Fliedel, Anne-Laure Declémy, Nicolas Ayessou, Noel Akissoe, Cheikh Touré, et al. 2014. « Relationships between anthocyanins and other compounds and sensory acceptability of Hibiscus drinks ». *Food Chemistry* 148 (avril): 112-19.
- Boulton, Roger. 2001. « The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review ». *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (2): 67-87.
- Brouillard, R. 1982. « Chemical Structure of Anthocyanins ». In *Anthocyanins as Foods Colors*, Academic Press, 1-40. New York: P. Markakis.
- Brouillard, Raymond. 1988. « Flavonoids and Flower Colour ». In *The Flavonoids*, édité par J. B. Harborne, 525-38.
- Burdurlu, Hande Selen, Nuray Koca, et Feryal Karadeniz. 2006. « Degradation of vitamin C in citrus juice concentrates during storage ». *Journal of Food Engineering* 74 (2): 211-16.
- Cacace, J. E., et G. Mazza. 2002. « Extraction of Anthocyanins and Other Phenolics from Black Currants with Sulfured Water ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (21): 5939-46.
- Castañeda-Ovando, Araceli, Ma. de Lourdes Pacheco-Hernández, Ma. Elena Páez-Hernández, José A. Rodríguez, et Carlos Andrés Galán-Vidal. 2009. « Chemical studies of anthocyanins: A review ». *Food Chemistry* 113 (4): 859-71.
- Cemeroglu, B., S. Velioglu, et S. Isik. 1994. « Degradation Kinetics of Anthocyanins in Sour Cherry Juice and Concentrate ». *Journal of Food Science* 59 (6): 1216-18.
- Chang, Xiu-Lian, Dong Wang, Bi-Yun Chen, Yong-Mei Feng, Shao-Hong Wen, et Peng-Yuan Zhan. 2012. « Adsorption and Desorption Properties of Macroporous Resins for Anthocyanins from

- the Calyx Extract of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (9): 2368-76.
- Charlotte, Radt. 1974. « Kerharo J. & Adam J. G. — La Pharmacopée sénégalaise traditionnelle. Plantes médicinales et toxiques ». *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée* 21 (1): 76-77.
- Chisté, Renan C., Alessandra S. Lopes, et Lênio J. G. De Faria. 2010. « Thermal and Light Degradation Kinetics of Anthocyanin Extracts from Mangosteen Peel (*Garcinia Mangostana* L.) ». *International Journal of Food Science & Technology* 45 (9): 1902-8.
- Cho, Mi Jin, Luke R Howard, Ronald L Prior, et John R Clark. 2004. « Flavonoid Glycosides and Antioxidant Capacity of Various Blackberry, Blueberry and Red Grape Genotypes Determined by High-Performance Liquid Chromatography/mass Spectrometry ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (13): 1771-82.
- Chun, Ock Kyoung, Dae-Ok Kim, et Chang Yong Lee. 2003. « Superoxide Radical Scavenging Activity of the Major Polyphenols in Fresh Plums ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (27): 8067-72.
- Chutintrasri, Benjar, et Athapol Noomhorm. 2007. « Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing ». *LWT - Food Science and Technology* 40 (2): 300-306.
- Cissé, Mady, Philippe Bohuon, Falillou Sambe, Cheikhou Kane, Mama Sakho, et Manuel Dornier. 2012. « Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling ». *Journal of Food Engineering* 109 (1): 16-21.
- Cissé, Mady, Manuel Dornier, Mama Sakho, Codou Mar Diop, Max Reynes, et Oumar Sock. 2009. « La production du Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) au Sénégal ». *Fruits*, sect. 64.
- Cisse, Mady, Manuel Dornier, Mama Sakho, Codou Mar Diop, Max Reynes, et Oumar Sock. 2009. « Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) production in Senegal. » *Fruits* 64 (2): 111-24.
- Cissé, Mady, Manuel Dornier, Mama Sakho, Augustin Ndiaye, Max Reynes, et Sock Oumar. 2009. « Le Bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : Composition et principales utilisations ». *Fruits*.
- Cisse, Mady, Manuel Dornier, Mama Sakho, Augustin Ndiaye, Max Reynes, et Oumar Sock. 2009. « The bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.): composition and principal uses. » *Fruits* 64 (3): 179-93.
- Cisse, Mady, Fabrice Vaillant, Oscar Acosta, Claudie Dhuique-Mayer, et Manuel Dornier. 2009. « Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins from Blood Orange, Blackberry, and Roselle Using the Arrhenius, Eyring, and Ball Models ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (14): 6285-91.

- Cisse, Mady, Fabrice Vaillant, Ale Kane, Oumoule Ndiaye, et Manuel Dornier. 2012. « Impact of the Extraction Procedure on the Kinetics of Anthocyanin and Colour Degradation of Roselle Extracts during Storage ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (6): 1214-21.
- Clifford, Michael N. 2000. « Anthocyanins – Nature, Occurrence and Dietary Burden ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (7): 1063-72.
- Clifford, Michael N., Kelly L. Johnston, Susan Knight, et Nikolai Kuhnert. 2003. « Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (10): 2900-2911.
- Coly, E.V., P.A. Seck, et A. A. Mbaye. 2005. « Les productions horticoles ». In *Bilan de la recherche agricole et agroalimentaire au Sénégal 1964-2004*. Sénégal: ISRA-ITA-CIRAD.
- Da-Costa-Rocha, Inês, Bernd Bonnlaender, Hartwig Sievers, Ivo Pischel, et Michael Heinrich. 2014. « Hibiscus sabdariffa L. – A phytochemical and pharmacological review ». *Food Chemistry* 165 (décembre): 424-43.
- Dangles, Olivier. 2006. « Propriétés chimiques des polyphénols ». In *Les polyphénols en agroalimentaire*, TEC et DOC, 29-50. Sciences et techniques agroalimentaires. Paris.
- Davidson, P. Michael, John N. Sofos, et A. Larry Branen. 2005. *Antimicrobials in Food, Third Edition*. CRC Press.
- Davies, A. J., et G. Mazza. 1993. « Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (5): 716-20.
- de la Parra, Columba, Sergio O. Serna Saldivar, et Rui Hai Liu. 2007. « Effect of Processing on the Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of Corn for Production of Masa, Tortillas, and Tortilla Chips ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (10): 4177-83.
- Demrow, Heather S., Peter R. Slane, et John D. Folts. 1995. « Administration of Wine and Grape Juice Inhibits In Vivo Platelet Activity and Thrombosis in Stenosed Canine Coronary Arteries ». *Circulation* 91 (4): 1182-88.
- de Pascual-Teresa, S., C. Santos-Buelga, et J. C. Rivas-Gonzalo. 2000. « Quantitative Analysis of Flavan-3-Ols in Spanish Foodstuffs and Beverages ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5331-37.
- D'Heureux-Calix, Faye, et Neela Badrie. 2004. « Consumer Acceptance and Physicochemical Quality of Processed Red Sorrel/roselle (Hibiscus Sabdariffa L.) Sauces from Enzymatic Extracted Calyces ». *Food Service Technology* 4 (4): 141-48.
- Ding, Chang-Kui, Kazuo Chachin, Yoshinori Ueda, Yoshihiro Imahori, et Chien Y. Wang. 2001. « Metabolism of Phenolic Compounds during Loquat Fruit Development ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (6): 2883-88.

- Dragovic-Uzelac, Verica, Jasna Pospišil, Branka Levaj, et Karmela Delonga. 2005. « The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity ». *Food Chemistry* 91 (2): 373-83.
- Duan, Xuewu, Yueming Jiang, Xinguo Su, Zhaoqi Zhang, et John Shi. 2007. « Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning ». *Food Chemistry* 101 (4): 1365-71.
- Ehala, Sille, Merike Vaher, et Mihkel Kaljurand. 2005. « Characterization of Phenolic Profiles of Northern European Berries by Capillary Electrophoresis and Determination of their Antioxidant Activity ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (16): 6484-90.
- Eiro, Maarit J., et Marina Heinonen. 2002. « Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (25): 7461-66.
- El-Adawy, Tarek A., et Ali H. Khalil. 1994. « Characteristics of roselle seeds as a new source of protein and lipid ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42 (9): 1896-1900.
- Erlandson, J. A., et R. E. Wrolstad. 1972. « Degradation of Anthocyanins at Limited Water Concentration ». *Journal of Food Science* 37 (4): 592-95.
- Esselen, Melanie, Ute Boettler, Nicole Teller, Simone Bächler, Melanie Hutter, Corinna E. Rüfer, Susanne Skrbek, et Doris Marko. 2011. « Anthocyanin-Rich Blackberry Extract Suppresses the DNA-Damaging Properties of Topoisomerase I and II Poisons in Colon Carcinoma Cells ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (13): 6966-73.
- Fang, Zhongxiang, Min Zhang, Weihua Du, et Jingcai Sun. 2007. « Effect of Fining and Filtration on the Haze Formation in Bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) Juice ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (1): 113-19.
- Feng, Rentian, Shioh Y. Wang, Ying-Hong Shi, Jia Fan, et Xiao-Ming Yin. 2010. « Delphinidin Induces Necrosis in Hepatocellular Carcinoma Cells in the Presence of 3-Methyladenine, an Autophagy Inhibitor† ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (7): 3957-64.
- Fernández-Arroyo, Salvador, Inmaculada C. Rodríguez-Medina, Raúl Beltrán-Debón, Federica Pasini, Jorge Joven, Vicente Micol, Antonio Segura-Carretero, et Alberto Fernández-Gutiérrez. 2011. « Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract ». *Food Research International* 44 (5): 1490-95.
- Fontana, Anthony J. 2007. « Appendix D: Minimum Water Activity Limits for Growth of Microorganisms ». In *Water Activity in Foods*, édité par Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Anthony J. Fontana Jr, Shelly J. Schmidt, et Theodore P. Labuza, 405-405.

- Gao, L., et G. Mazza. 1996. « Extraction of Anthocyanin Pigments from Purple Sunflower Hulls ». *Journal of Food Science* 61 (3): 600-603.
- García-Viguera, Cristina, et Peter Bridle. 1999. « Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid ». *Food Chemistry* 64 (1): 21-26.
- García-Viguera, Cristina, Pilar Zafrilla, et Francisco A Tomás-Barberán. 1997. « Determination of Authenticity of Fruit Jams by HPLC Analysis of Anthocyanins ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 73 (2): 207-13.
- Garzón, A., et R. Wrolstad. 2002. « Comparison of the Stability of Pelargonidin-Based Anthocyanins in Strawberry Juice and Concentrate ». *Journal of Food Science* 67 (4): 1288-99.
- Garzón, G.A., et R.E. Wrolstad. 2001. « The stability of pelargonidin-based anthocyanins at varying water activity ». *Food Chemistry* 75 (2): 185-96.
- Gavrilova, Verka, Marina Kajdžanoska, Viktor Gjamovski, et Marina Stefova. 2011. « Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberries and Red and Black Currants by HPLC–DAD–ESI–MSn ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (8): 4009-18.
- George, Stephane, Pierre Brat, Pascaline Alter, et Marie J. Amiot. 2005. « Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (5): 1370-73.
- Giusti, M. Mónica, et Ronald E. Wrolstad. 2003. « Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems ». *Biochemical Engineering Journal, Advance in Plant Anthocyanin Research and Development*, 14 (3): 217-25.
- Glew, Robert H., Dorothy J. Vanderjagt, Cassius Lockett, Louis E. Grivetti, Garrett C. Smith, Andrzej Pastuszyn, et Mark Millson. 1997. « Amino Acid, Fatty Acid, and Mineral Composition of 24 Indigenous Plants of Burkina Faso ». *Journal of Food Composition and Analysis* 10 (3): 205-17.
- Gradinaru, G., C.G. Biliaderis, S. Kallithraka, P. Kefalas, et C. Garcia-Viguera. 2003. « Thermal stability of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins in solution and in solid state: effects of copigmentation and glass transition ». *Food Chemistry* 83 (3): 423-36.
- Grubben, G. J. H. 2004. *Vegetables*. PROTA.
- Gu, Liwei, Suzanne E. House, Xianli Wu, Boxin Ou, et Ronald L. Prior. 2006. « Procyanidin and Catechin Contents and Antioxidant Capacity of Cocoa and Chocolate Products ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (11): 4057-61.

- Hadjal, Thiziri, Claudie Dhuique-Mayer, Khodir Madani, Manuel Dornier, et Nawel Achir. 2013. « Thermal degradation kinetics of xanthophylls from blood orange in model and real food systems ». *Food Chemistry* 138 (4): 2442-50.
- Hale, Kerry L., Steve P. McGrath, et Stephen M. Stack. 2001. « Molybdenum Sequestration in BrassicaSpecies. A Role for Anthocyanins? » *Plant Physiology*.
- Hang, Y. D. 1988. « Recovery of Food Ingredients from Grape Pomace ». *Process Biochemistry*.
- Harborne, J. B. 1989. « General procedures and measurement of total phenolics ». In *Methods in plant biochemistry*, Academic Press, 1:1-28. London.
- Harbourne, Niamh, Jean Christophe Jacquier, Desmond J. Morgan, et James G. Lyng. 2008. « Determination of the degradation kinetics of anthocyanins in a model juice system using isothermal and non-isothermal methods ». *Food Chemistry* 111 (1): 204-8.
- Hou, De-Xing, Xuhui Tong, Norihiko Terahara, Dong Luo, et Makoto Fujii. 2005. « Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440 (1): 101-9.
- Idham, Zuhaili, Ida Idayu Muhamad, et Mohd Roji Sarmidi. 2012a. « Degradation Kinetics and Color Stability of Spray-Dried Encapsulated Anthocyanins from Hibiscus Sabdariffa L. » *Journal of Food Process Engineering* 35 (4): 522-42.
- Idham, Zuhaili, Ida Idayu Muhamad, et Mohd Roji Sarmidi. 2012b. « Degradation Kinetics and Color Stability of Spray-Dried Encapsulated Anthocyanins from Hibiscus Sabdariffa L. » *Journal of Food Process Engineering* 35 (4): 522-42.
- Jackman, Robert L., Rickey Y. Yada, et Marvin A. Tung. 1987. « A Review: Separation and Chemical Properties of Anthocyanins Used for Their Qualitative and Quantitative Analysis ». *Journal of Food Biochemistry* 11 (4): 279-308.
- Jiménez, Nadiarid, Philippe Bohuon, Manuel Dornier, Catherine Bonazzi, Ana Mercedes Pérez, et Fabrice Vaillant. 2012. « Effect of water activity on anthocyanin degradation and browning kinetics at high temperatures (100–140 °C) ». *Food Research International* 47 (1): 106-15.
- Jiménez, Nadiarid, Philippe Bohuon, Janice Lima, Manuel Dornier, Fabrice Vaillant, et Ana Mercedes Pérez. 2010. « Kinetics of Anthocyanin Degradation and Browning in Reconstituted Blackberry Juice Treated at High Temperatures (100–180 °C) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (4): 2314-22.
- Jirovetz, Leopold., Walter. Jaeger, Gerd. Remberg, Jaime. Espinosa-Gonzalez, Rodolfo. Morales, Alexander. Woidich, et Alexej. Nikiforov. 1992. « Analysis of the volatiles in the seed oil of

- Hibiscus sabdariffa (Malvaceae) by means of GC-MS and GC-FTIR ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40 (7): 1186-87.
- Justesen, U., P. Knuthsen, et T. Leth. 1998. « Quantitative Analysis of Flavonols, Flavones, and Flavanones in Fruits, Vegetables and Beverages by High-Performance Liquid Chromatography with Photo-Diode Array and Mass Spectrometric Detection ». *Journal of Chromatography. A* 799 (1-2): 101-10.
- Kamei, Hideo, Takasi Kojima, Makoto Hasegawa, Taturou Koide, Tessei Umeda, Takao Yukawa, et Keisuke Terabe. 1995. « Suppression of Tumor Cell Growth by Anthocyanins In Vitro ». *Cancer Investigation* 13 (6): 590-94.
- Kang, Tong Ho, Jin Young Hur, Hyun Bok Kim, Jong Hoon Ryu, et Sun Yeou Kim. 2006. « Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O- β -d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia ». *Neuroscience Letters* 391 (3): 122-26.
- Karabulut, Ozgur Akgun, Gianfranco Romanazzi, Joseph L. Smilanick, et Amnon Lichter. 2005. « Postharvest ethanol and potassium sorbate treatments of table grapes to control gray mold ». *Postharvest Biology and Technology* 37 (2): 129-34.
- Karadeniz, Feryal, Robert W. Durst, et Ronald E. Wrolstad. 2000. « Polyphenolic Composition of Raisins ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5343-50.
- Kara, Şelale, et Emine Alben Erçelebi. 2013. « Thermal degradation kinetics of anthocyanins and visual colour of Urmu mulberry (*Morus nigra* L.) ». *Journal of Food Engineering* 116 (2): 541-47.
- Kato, Hiromichi, Takeo Ohta, Takashi Tsugita, et Yukio Hosaka. 1983. « Effect of parboiling on texture and flavor components of cooked rice ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31 (4): 818-23.
- Katsube, Naomi, Keiko Iwashita, Tojiro Tsushida, Koji Yamaki, et Masuko Kobori. 2003. « Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (1): 68-75.
- Kirca, Ayşegül, Mehmet Özkan, et Bekir Cemeroğlu. 2007. « Storage Stability of Strawberry Jam Color Enhanced with Black Carrot Juice Concentrate ». *Journal of Food Processing and Preservation* 31 (5): 531-45.
- Kirca, Ayşegül, et Bekir Cemeroğlu. 2003. « Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate ». *Food Chemistry* 81 (4): 583-87.
- Kirca, Ayşegül, Mehmet Özkan, et Bekir Cemeroğlu. 2006. « Stability of black carrot anthocyanins in various fruit juices and nectars ». *Food Chemistry* 97 (4): 598-605.

- Kirca, Ayşegül, Mehmet Özkan, et Bekir Cemeroğlu. 2007a. « Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins ». *Food Chemistry* 101 (1): 212-18.
- Kirca, Ayşegül, Mehmet Özkan, et Bekir Cemeroğlu. 2007b. « Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins ». *Food Chemistry* 101 (1): 212-18.
- Kuo, Chih-Yi, Erl-Shyh Kao, Kuei-Chuan Chan, Huei-Jane Lee, Tsai-Feng Huang, et Chau-Jong Wang. 2012. « Hibiscus sabdariffa L. extracts reduce serum uric acid levels in oxonate-induced rats ». *Journal of Functional Foods* 4 (1): 375-81.
- Lai, K.p.k., K.d. Dolan, et P.k.w. Ng. 2009. « Inverse Method to Estimate Kinetic Degradation Parameters of Grape Anthocyanins in Wheat Flour Under Simultaneously Changing Temperature and Moisture ». *Journal of Food Science* 74 (5): E241-49.
- Lee, J, RW Durst, et R.E Wrolstad. 2005. « Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colourants, and wines by the pH differential method: collaborative study ». *J AOAC Int*, sect. 88.
- Li, Chunyang, Jin Feng, Wu-Yang Huang, et Xiao-Ting An. 2013. « Composition of Polyphenols and Antioxidant Activity of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (3): 523-31.
- Lin, Hui-Hsuan, Kuei-Chuan Chan, Jenn-Yuan Sheu, Shu-Wen Hsuan, Chau-Jong Wang, et Jing-Hsien Chen. 2012. « Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo ». *Food Chemistry* 132 (2): 880-91.
- LIU, Liang, Shao-qian CAO, et Si-yi PAN. 2011. « Thermal Degradation Kinetics of Three Kinds of Representative Anthocyanins Obtained from Blood Orange ». *Agricultural Sciences in China* 10 (4): 642-49.
- Lorenzo, D., L. Atti-Serafini, A. C. Santos, C. D. Frizzo, N. Paroul, D. Paz, E. Dellacassa, et P. Moyna. 2000. « Achyrocline satureioides Essential Oils from Southern Brazil and Uruguay ». *Planta Medica* 66 (5): 476-77.
- Lugasi, A., et J. Hovari. 2002. « Flavonoid Aglycons in Foods of Plant Origin II. Fresh and Dried Fruits ». *Acta Alimentaria Hungary*.
- Määttä-Riihinen, Kaisu R., Afaf Kamal-Eldin, et A. Riitta Törrönen. 2004. « Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (20): 6178-87.
- Maiga, Ababacar, Drissa Diallo, Ragnar Bye, et Berit Smestad Paulsen. 2005. « Determination of Some Toxic and Essential Metal Ions in Medicinal and Edible Plants from Mali ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6): 2316-21.

- Manso, Maria C., Fernanda A.R. Oliveira, Jorge C. Oliveira, et Jesús M. Frías. 2001. « Modelling Ascorbic Acid Thermal Degradation and Browning in Orange Juice under Aerobic Conditions ». *International Journal of Food Science & Technology* 36 (3): 303-12.
- Março, Paulo Henrique, Ronei Jesus Poppi, Ieda Spacino Scarminio, et Romà Tauler. 2011. « Investigation of the pH effect and UV radiation on kinetic degradation of anthocyanin mixtures extracted from Hibiscus acetosella ». *Food Chemistry* 125 (3): 1020-27.
- Marfil, P. H. M., E. M. Santos, et V. R. N. Telis. 2008. « Ascorbic acid degradation kinetics in tomatoes at different drying conditions ». *LWT - Food Science and Technology* 41 (9): 1642-47.
- Markaris, Pericles, Gideon E. Livingston, et Carl R. Fellers. 1957. « QUANTITATIVE ASPECTS OF STRAWBERRY PIGMENT DEGRADATION A,b », *Journal of Food Science* 22 (2): 117-30.
- Marks, Serena C, William Mullen, et Alan Crozier. 2007. « Flavonoid and Chlorogenic Acid Profiles of English Cider Apples ». *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87 (4): 719-28.
- Maskan, Medeni. 2006. « Production of pomegranate (*Punica granatum* L.) juice concentrate by various heating methods: colour degradation and kinetics ». *Journal of Food Engineering* 72 (3): 218-24.
- Mateus, Nuno, Artur M. S. Silva, Joseph Vercauteren, et Victor de Freitas. 2001. « Occurrence of Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wines ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (10)
- Matsufuji, Hiroshi, Takashi Otsuki, Toshiyuki Takeda, Makoto Chino, et Mitsuharu Takeda. 2003. « Identification of Reaction Products of Acylated Anthocyanins from Red Radish with Peroxyl Radicals ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (10): 3157-61.
- Matsumoto, Hitoshi, Yuko Nakamura, Shuji Tachibanaki, Satoru Kawamura, et Masao Hirayama. 2003. « Stimulatory Effect of Cyanidin 3-Glycosides on the Regeneration of Rhodopsin ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (12): 3560-63.
- Mattila, Pirjo, Jouni Astola, et Jorma Kumpulainen. 2000. « Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (12): 5834-41.
- Mazza, G., et R. Brouillard. 1987. « Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products ». *Food Chemistry* 25 (3): 207-25.
- Mazza, G., et R. Brouillard. 1990. « The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions ». *Phytochemistry* 29 (4): 1097-1102.
- Mazza, G., Juan E. Cacace, et Colin D. Kay. 2004. « Methods of Analysis for Anthocyanins in Plants and Biological Fluids ». *Journal of AOAC International* 87 (1): 129-45.

- Mazza, Giuseppe J, et D. Kay Colin. 2008. « Bioactivity, Absorption, and Metabolism of Anthocyanins ». In *Recent Advances in Polyphenol Research*, Wiley-Blackwell, 1:228-62. United Kingdom: Fouad Daayf And Vincenzo Lattanzio.
- Mazza, G., et E. Miniati. 1993. « Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains. », 362 pp.
- Méndez, Candelaria del Mar Verde, Markus Paul Forster, Miguel Ángel Rodríguez-Delgado, Elena María Rodríguez-Rodríguez, et Carlos Díaz Romero. 2003. « Content of Free Phenolic Compounds in Bananas from Tenerife (Canary Islands) and Ecuador ». *European Food Research and Technology* 217 (4): 287-90.
- Mercier, A., G. Perdriel, J. Rozier, et J. Chevaleraud. 1965. « [Note concerning the action of anthocyanin glycosides on the human electroretinogram] ». *Bulletin Des Sociétés D'ophtalmologie De France* 65 (12): 1049-53.
- Minolta Corporation. 1994. *Precise Color Communication: Color Control from Feeling to Instrumentation*. Osaka, Japan: Minolta.
- Mohamed, R., J. Fernández, M. Pineda, et M. Aguilar. 2007. « Roselle (Hibiscus Sabdariffa) Seed Oil Is a Rich Source of γ -Tocopherol ». *Journal of Food Science* 72 (3): S207-11.
- Mohd-Esa, Norhaizan, Fong Shin Hern, Amin Ismail, et Chew Lye Yee. 2010. « Antioxidant activity in different parts of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extracts and potential exploitation of the seeds ». *Food Chemistry* 122 (4): 1055-60.
- Moldovan, Bianca, Luminița David, Cristian Chișbora, et Claudia Cimpoiu. 2012. « Degradation Kinetics of Anthocyanins from European Cranberrybush (Viburnum opulus L.) Fruit Extracts. Effects of Temperature, pH and Storage Solvent ». *Molecules* 17 (12): 11655-66.
- Möller, Birgit, et Karl Herrmann. 1983. « Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruit ». *Phytochemistry* 22 (2): 477-81.
- Morazzoni, P., et M. J. Magistretti. 1990. « Activity of Myrtocyan, an Anthocyanoside Complex from Vaccinium Myrtillus (VMA), on Platelet Aggregation and Adhesiveness. » *Fitoterapia* 61 (1): 13-21.
- Morton, Julia Frances. 1987. In *Fruits of Warm Climates*, Dowling C.F., 281-86. Greensborough, USA.
- Nakatani, Nobuji, Shin-ichi Kayano, Hiroe Kikuzaki, Keiko Sumino, Kiyoshi Katagiri, et Takahiko Mitani. 2000. « Identification, Quantitative Determination, and Antioxidative Activities of Chlorogenic Acid Isomers in Prune (Prunus domestica L.) ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (11): 5512-16.
- Narváez-Cuenca, Carlos-Eduardo, Jean-Paul Vincken, et Harry Gruppen. 2012. « Identification and quantification of (dihydro) hydroxycinnamic acids and their conjugates in potato by UHPLC–DAD–ESI–MSn ». *Food Chemistry* 130 (3): 730-38.

- Ndiaye, Ndèye Adiara, Modou Dieng, Alé Kane, Mady Cisse, Didier Monté, et Ndèye Coumba Touré. 2015. « Diagnostic et caractérisation microbiologique des procédés artisanaux de fabrication de boissons et de concentrés d'Hibiscus sabdariffa L au Sénégal ». *Afrique Sciences*, sect. 11-13.
- Nielsen, S.S, J.E Marcy, et G.D Sadler. 1993. « Chemistry of Aseptically Processed Foods ». In *Principles of Aseptic Processing and Packaging*, PURDUE, 87-114. 2. Washington, USA.
- Nummer, B. A., S. Shrestha, et J. V. Smith. 2012. « Survival of Salmonella in a high sugar, low water-activity, peanut butter flavored candy fondant ». *Food Control* 27 (1): 184-87.
- Peñalvo, José L., Kati M. Haajanen, Nigel Botting, et Herman Adlercreutz. 2005. « Quantification of Lignans in Food Using Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (24): 9342-47.
- Peng, Chiung-Huei, Charng-Cherng Chyau, Kuei-Chuan Chan, Tsung-Hsien Chan, Chau-Jong Wang, et Chien-Ning Huang. 2011. « Hibiscus sabdariffa Polyphenolic Extract Inhibits Hyperglycemia, Hyperlipidemia, and Glycation-Oxidative Stress while Improving Insulin Resistance ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (18): 9901-9.
- Poublanc, Christophe, Simon Gomis, et Patrice Nugawela. 2006. « Support for accelerated growth and increased competitiveness. Bissap Value Chain - Sénégal. » SAGIC IQC No. 685-I-01-06-00005-00. International Resources Group. USA: USAID.
- Price, K. R, T Prosser, A. M. F Richetin, et M. J. C Rhodes. 1999. « A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples; distribution within the fruit and effect of juicing ». *Food Chemistry* 66 (4): 489-94.
- Rein, Maarit. 2005. « Copigmentation reaction and color stability of berry anthocyanins ». Academic dissertation, University of Helsinki.
- Rein, Maarit J., Velimatti Ollilainen, Mikko Vahermo, Jari Yli-Kauhaluoma, et Marina Heinonen. 2005. « Identification of Novel Pyranoanthocyanins in Berry Juices ». *European Food Research and Technology* 220 (3-4): 239-44.
- Renaud, S., et M. de Lorgeril. 1992. « Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease ». *The Lancet*, Originally published as Volume 1, Issue 8808, 339 (8808): 1523-26.
- Sarni-Manchado, Pascale, et Véronique Cheynier. 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*. TEC&DOC, Lavoisier. Paris: Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.
- Serrano-Cruz, Marlem Rubí, Adriana Villanueva-Carvajal, Edgar Jesús Morales Rosales, José Francisco Ramírez Dávila, et Aurelio Dominguez-Lopez. 2013. « Controlled release and antioxidant activity of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extract encapsulated in mixtures of carboxymethyl cellulose, whey protein, and pectin ». *LWT - Food Science and Technology* 50 (2): 554-61.

- Simirgiotis, M.J., et G. Schmeda-Hirschmann. 2010. « Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry ». *Journal of Chromatography A* 1217 (4): 443-49.
- Skrede, G., R.e. Wrolstad, et R.w. Durst. 2000. « Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium Corymbosum* L.) ». *Journal of Food Science* 65 (2): 357-64.
- Starr, M. S., et F. J. Francis. 1973. « Effect of Metallic Ions on Color and Pigment Content of Cranberry Juice Cocktail ». *Journal of Food Science* 38 (6): 1043-46.
- Suliman, Abdallah M.A. 2011. « A comparative study on red and white karkade (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyces, extracts and their products. ». *Pakistan Journal of Nutrition* 10 (7): 680-83.
- Thakur, B. R., et S. S. Arya. 1989. « Studies on Stability of Blue Grape Anthocyanins ». *International Journal of Food Science & Technology* 24 (3): 321-26.
- Verbeyst, Lise, Kim Van Crombruggen, Iesel Van der Plancken, Marc Hendrickx, et Ann Van Loey. 2011. « Anthocyanin degradation kinetics during thermal and high pressure treatments of raspberries ». *Journal of Food Engineering* 105 (3): 513-21.
- Wang, Haibo, Muraleedharan G. Nair, Amy F. Iezzoni, Gale M. Strasburg, Alden M. Booren, et J. Ian Gray. 1997. « Quantification and Characterization of Anthocyanins in Balaton Tart Cherries ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (7): 2556-60.
- Wang, Shioh Y., Wei Zheng, et Gene J. Galletta. 2002. « Cultural System Affects Fruit Quality and Antioxidant Capacity in Strawberries ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (22): 6534-42.
- Wei, Yun, M. Razwan Sardar, Ian A. Sutherland, et Derek Fisher. 2011. « Separation of Delphinidin-3-O-Sambubioside, Cyanidin-3-O-Sambubioside and P-Coumaric Acid from Cranberry by CCC Followed by Prep-HPLC Using Robotic CCC Solvent System Selection ». *Chromatographia* 74 (5-6): 367-73.
- Wong, P.K., Salmah Yusof, H.M. Ghazali, et Y.B. Che Man. 2002. « Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) ». *Nutrition & Food Science* 32 (2): 68-73.
- Woot - Tsuen Wu Leung. 1968. *Food composition table for use in Africa*. Nutrition information documents series / FAO;no. 3. Bethesda [etc.]: [s.n.].
- Wrolstad, R.E. 2000. « Anthocyanins ». In , Marcel Dekker, 237-52. New York, USA: G.J. Laura & F.J. Francis.

- Yang, Zhendong, Yonbin Han, Zhenxin Gu, Gongjian Fan, et Zhigang Chen. 2008. « Thermal degradation kinetics of aqueous anthocyanins and visual color of purple corn (*Zea mays* L.) cob ». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9 (3): 341-47.
- Zhang, Qing-Feng, Yu-Xian Guo, Guodong Zheng, et Wen-Jun Wang. 2013. « Chemical constituents comparison between *Rhizoma Smilacis Glabrae* and *Rhizoma Smilacis Chinae* by HPLC-DAD-MS/MS ». *Natural Product Research* 27 (3): 277-81.