

## Couplage de technologies membranaires pour la production d'extraits stables de bissap (*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae)

Adje Anoh Félix, Niamke Bobélé Florence, Adima Amissa Augustin, Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny, Yamoussoukro, Côte d'Ivoire, E-mail : felix\_adj@yaho.fr  
Lozano Yves François, CIRAD, Montpellier, France  
Biego Godi Henri, Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody-Abidjan, Abidjan, Côte d'Ivoire

### Résumé

Des nectars d'*Hibiscus sabdariffa* L. (bissap) sont fabriqués par infusion ou décoction des calices de cette plante dans l'eau. Le développement d'un procédé d'éco-extraction, incluant des technologies couplées (MicroFiltration Tangentielle : MFT et Osmose Inverse : OI) a permis de fabriquer à l'échelle pilote des extraits concentrés d'une plus grande sûreté (qualité et hygiène).

L'objet de ce travail était d'évaluer la stabilité de ces extraits concentrés. Des membranes industrielles en céramique pour la MFT et en polymère organique pour l'OI, ont été utilisées respectivement pour la clarification et la concentration des extraits polyphénoliques. Les calices séchés ont été extraits dans de grands volumes d'eau (50-250 l) suivant un ratio optimisé  $R = 1/100$  ( $R = \text{masse du végétal en kg/volume d'eau en l}$ ). Le macérât (0,3-0,4°Brix) préfiltré à l'aide de tissu en nylon, est d'abord clarifié par MFT avec une membrane industrielle multicanale (P19-60, 0,2  $\mu\text{m}$  de diamètre de pore,  $S = 0,304 \text{ m}^2$  surface filtrante), puis concentré par OI avec une membrane industrielle (SW-30, 0,1 nm de diamètre de pore,  $S = 2\text{m}^2$ ). Les concentrés finaux titrent à 10-20°Brix avec des taux moyens de matières sèches de l'ordre de 16%. Ces concentrés exposés en atmosphère ambiante dans un conditionnement limitant la pénétration des rayons solaires, restent stables et bactériologiquement sains pendant au moins 8 mois (durée de l'expérience) comparativement aux extraits préparés de façon traditionnelle qui présentent une charge microbienne importante (GAM, levures, moisissures) limitant par conséquent leur stabilité.

### Membrane technologies coupling for stable bissap (*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae) extracts production

The calyx of *Hibiscus sabdariffa* were used to prepare at home level a famous beverage commonly called *bissap* in the west part of Africa. Traditionally, this bright red extracts were prepared by infusion or decoction. A pilot plant process, Coupled Membrane Separation Technology (CMST), including Cross Flow Microfiltration (CFM) and Reverse Osmosis (RO), was used to scale up clarification and concentration of the polyphenolic compounds extracted from this part of the plant in cold conditions. This process allowed getting safety and bioactive final concentrated products. Although this kind of process leads to more stability of such beverages, no paper has been reported on their shelf-life.

The aim of this work was to evaluate the stability of the final concentrated product, obtained from CMST. For this purpose, a multi-step process with large volumes of water (50-250 l) was used. Based on an optimized ratio 1/100 (w/v), dried calyx were soaked in water media, to allow soluble biomolecules to diffuse. The crude extracts obtained (0.3-0.4°Brix) were filtered through a nylon cloth before submitted to CFM membrane (P19-60-Membralox, 0.2  $\mu\text{m}$  pore size,  $S = 0.304 \text{ m}^2$  filtration surface) (Pall-Exekia, Tarbes, France). The CFM extracts (0.3-0.4°Brix) were concentrated by RO (TMP = 40b, T = 25-30 °C, 5 batches) using a SW30 membrane (0.1 nm pore size,  $S = 2 \text{ m}^2$ ). The final concentrates have 10-20°Brix. The mean of dry matters range from 16%. The final concentrates were conserved for 8 months without any microbial load (Aerobic Mesophile Germs, yeast, moulds), compared to the traditional products.

## 1. Introduction

*Hibiscus sabdariffa* L. (*bissap*, *karkadé* ou *roselle*) est un arbuste tropical annuel ou bisannuel, herbacé, buissonnant à port de sous-abrisseau, pouvant atteindre de 1 à 5 mètres selon les variétés et le mode de culture. Il serait originaire d'Amérique centrale et serait ensuite introduit dans diverses régions tropicales notamment, en Inde, aux Antilles et en Afrique. Mais c'est vraisemblablement en Afrique occidentale qu'on retrouve la plus grande diversité de plantes d'*Hibiscus* spontanées et subspontanées (Bricage, 1980). Les calices rouges sont riches en acides organiques et en anthocyanes, composés conférant aux extraits aqueux des activités antioxydantes et des fonctionnalités colorantes (Pi-Jen et al., 2002) qui sont utilisées dans la confection de produits de santé pour l'alimentaire, pour la médecine et la cosmétique (Mourtzinou et al., 2008; Cissé et al., 2009). Les extraits aqueux d'*Hibiscus* renferment 2 anthocyanes majeures : la delphinidine sambubioside et la cyanidine sambubioside. Ils contiennent aussi d'autres polyphénols présentant des caractéristiques antioxydantes.

Cependant, la pasteurisation nécessitée par la présence d'une charge microbienne généralement élevée dans les calices séchés et d'autres contaminants de diverses origines : sable, terre, etc., dégradent notablement la plupart de ces molécules reconnues pour leur thermosensibilité. Ces extraits sont traditionnellement obtenus en Afrique par infusion des calices séchés. Un ajout de sirop de sucre à cet extrait et une pasteurisation sont nécessaires pour fabriquer localement en petites quantités (5-20 l) une boisson correspondant au goût africain, généralement revendue dans de brefs délais par les fabricants dans de petites échoppes ou sur les marchés locaux.

Le procédé artisanal habituellement mis en œuvre n'est pas optimal tant du point de vue de la préservation des qualités des extraits que de leur conservation. Ce procédé inclut obligatoirement une opération de chauffage, altérant sans nul doute la qualité de l'extrait qui est généralement trouble et dont la conservation en température ambiante n'excède pas une semaine. Le recours à des équipements frigorifiques est alors nécessaire alors qu'il est onéreux et peu accessible à un grand nombre. Une alternative de conservation moins onéreuse, exploitable en milieu villageois serait judicieuse. En d'autres termes, comment obtenir des extraits stables conservés de façon durable sans recours à un dispositif frigorifique? C'est une question qui lance un défi technologique.

Les éléments pour relever le défi mentionné existent. Le procédé d'extraction-concentration – basé sur des principes physiques de séparation des solutés extraits de la matrice végétale, inclut des Techniques Séparatives Membranaires (TSM) par couplage de deux unités pilotes de microfiltration (MFT) et d'osmose inverse (OI) équipés de membranes industrielles – a été au cœur d'une application innovante pour la valorisation de plantes peu utilisées de la biodiversité tropicale. Cette application permet de fabriquer des extraits concentrés (10-20°Brix), avec une charge bactérienne réduite voire inexistante, permettant en conséquence d'envisager leur consommation et leur conservation longue durée, avec une capacité de production bien supérieure aux techniques artisanales actuelles (Chemat, 2011). Les travaux de Cissé (Cissé et al., 2011) ont en effet révélé que la microfiltration élimine les bactéries et que ces extraits clarifiés (MFT) restent stables dans un délai de 3 mois. Il est permis de penser que cette stabilité peut être renforcée par le couplage de la concentration par Osmose Inverse au procédé de microfiltration. Mais cela n'a pas été vérifié à notre connaissance.

La présente étude vise à combler la lacune identifiée en vue de mettre sur le marché des extraits concentrés d'actifs hydrosolubles de *bissap* avec plus de sûreté en termes de qualité et d'hygiène.

## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Matériel biologique

Les calices d'*Hibiscus sabdariffa* L. (variété Vimto) ont été récoltés dans la période de décembre 2008 à mars 2009, dans le village d'Houphouët-Djekro à Yamoussoukro (Côte d'Ivoire). Les calices frais sont collectés sur site, pré-séchés à l'ombre à température ambiante, puis rapidement acheminés au laboratoire de Chimie de l'eau et des Substances naturelles (INP-HB). Ils y subissent un tri pour l'élimination des débris et pédoncules floraux. Les échantillons sont ensuite séchés pendant 48 h à l'étuve (40 °C). Le matériel végétal sec a été conditionné sous vide dans des sacs en plastique puis acheminé au CIRAD (Montpellier/France) où il a été conservé à 4 °C en chambre froide, jusqu'à son utilisation au pilote de séparation membranaire ou au laboratoire pour la préparation du nectar<sup>1</sup>. Ainsi, trois co-produits (extraits brut (PFT), clarifié (MFT), concentré (OI)) issus du procédé de séparation membranaire sont échantillonnés pour les analyses, contre un seul issu du procédé traditionnel de préparation mis en œuvre au laboratoire (ETL).

### 2.2. Préparation du nectar de bissap

Deux voies de préparation sont exploitées : la voie traditionnelle dite à chaud et la voie dite à froid.

#### 2.2.1. Méthode à chaud (traditionnelle)

Dans le procédé traditionnel (Figure 1), les calices séchés de bissap sont mis à tremper dans de l'eau bouillante. Ce procédé a été mené dans les conditions suivantes : ratio 1/100<sup>2</sup> (masse de calices non broyés en kg/volume d'eau en l) pendant 3 h (temps optimal d'extraction). L'extrait rouge obtenu est filtré à l'aide d'un tissu en nylon ( $\sigma = 25 \mu\text{m}$ ), conditionné de façon aseptisée dans des bouteilles préservant du rayonnement lumineux, puis placées en atmosphère ambiante, à 4 °C et à 20 °C en présence de lumière (bouteille claire).

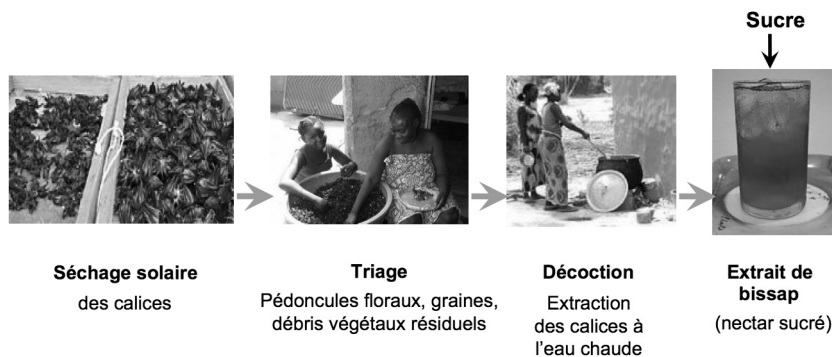


Figure 1. Procédé traditionnel de fabrication de nectar de bissap.

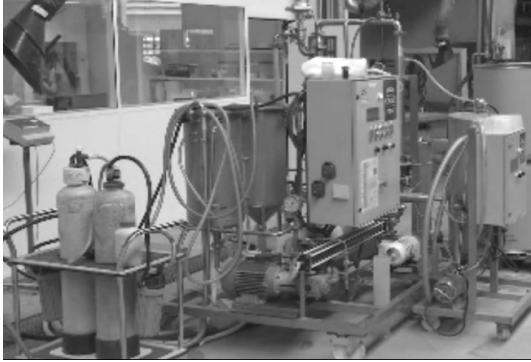
#### 2.2.2. Méthode à froid

Le procédé mis en œuvre dans cette partie est un procédé tri-étapes intégrant les Techniques Séparatives Membranaires (TSM) (TIA, Bollène, France) : 1. Macération, 2. Microfiltration Tangentielle, 3. Osmose Inverse (Adjé, 2009). Le procédé couplé de séparation membranaire

<sup>1</sup> sans sucre ajouté.

<sup>2</sup> ratio obtenu d'après les essais préalables d'optimisation à l'échelle laboratoire.

est assemblé sur un même skid comprenant une unité de microfiltration tangentielle (MFT) et une unité d'osmose inverse (OI) (Figure 2). L'ensemble est placé dans une halle propre et désinfectée ; le sol de l'aire occupée par l'unité, le circuit de production, les récipients utilisés sont convenablement désinfectés avant toute manipulation selon les procédures du laboratoire.



**Figure 2.** Échelle pilote de Technologie Membranaire.

### Étape 1 : Macération

Les extraits aqueux de bissap sont obtenus par macération des calices secs non broyés (2,5 kg) pendant 18 h à température ambiante (20 °C) dans 250 litres d'eau.

### Étape 2 : Clarification par MicroFiltration Tangentielle (MFT)

Avant et après chaque essai de microfiltration, les circuits de l'installation pilote et sa membrane sont lavés suivant un protocole appliqué au niveau industriel. Le lavage séquentiel est : **1.** lavage avec 20 l de lessive de soude 10 g/l à 70 °C, pendant 45 min à  $\Delta P = 0,4$  bar ; **2.** refroidissement, vidange et rinçage à l'eau microfiltrée jusqu'à pH neutre ; **3.** lavage à l'acide nitrique 5 g/l, sans chauffage, pendant 15 min, à  $\Delta P = 0,6$  bar ; **4.** vidange et rinçage à l'eau jusqu'à pH neutre et sans percolation de l'eau à travers la membrane ; **5.** vidange du pilote et remplissage avec de l'eau déionisée ou microfiltrée ; **6.** mise en route de la microfiltration en circuit fermé (filtrat redirigé vers l'alimentation) à  $\Delta P = 0,4$  bar et à  $T = 20^\circ\text{C}$ . Le flux de perméat est mesuré. Le nettoyage est estimé correct quand la perméabilité s'établit entre 1 000 et 1 500 l/h.m<sup>2</sup>.b. Le conditionnement du pilote de MFT pour des arrêts inférieurs à 24 h, est réalisé avec de l'eau javellisée à 100 ppm de chlore libre. L'unité est laissée pleine d'eau conditionnée sous javel. Avant tout essai de clarification, un prélèvement d'eau de conditionnement est analysé pour vérifier la qualité de la désinfection du circuit du module sollicité.

Le macérât obtenu est préalablement filtré à l'aide d'un tissu en nylon ( $\sigma = 25 \mu\text{m}$ ) avant d'être soumis à une clarification via un module de microfiltration tangentielle (TIA, Bollène, France) équipé d'une membrane industrielle (Membralox, Pall-Exekia, Tarbes, France) en céramique multicanaux P19-60, profilée hexagonal de 19 canaux (60 mm de diamètre  $\times$  80 cm long) (Surface filtrante  $S = 0,304 \text{ m}^2$ ). La taille des pores de  $0,2 \mu\text{m}$  permet d'éliminer la charge bactérienne apportée éventuellement par le matériel végétal, l'eau et le récipient, sans dégrader les anthocyanes et autres composés actifs originels. Les débits  $J_{\text{MFT}}$  de microfiltration sont mesurés au cours de l'essai par pesées continues du filtrat récupéré pour l'étape de concentration. La cinétique de variation de ce débit est donc visualisable sur un graphe  $J = f(t)$  qui est une courbe décroissante en début de cinétique avec atteinte rapide d'un plateau horizontal indiquant une stabilisation du débit de filtrat pendant l'opération de clarification. L'extrait est donc clarifié contre une pression transmembranaire (PTM) de 0,6 bar, pendant 7,8 h à flux stabilisé autour de 100 l/h.m<sup>2</sup> à 20 °C. Le facteur de réduction volumique est de l'ordre de 22.

### Étape 3 : Concentration par Osmose Inverse (OI)

L'osmose inverse (OI) permet la concentration à froid du microfiltrat de MFT par élimination de l'eau au travers d'une membrane industrielle polymère composite spirale, de type SW 30-2540 (Filmtec), de surface filtrante 2 m<sup>2</sup> et de diamètre de pore 0,1 nm. Le pilote d'OI (TIA, Bollène, France) est équipé également d'un échangeur de température et d'un thermomètre placés sur le circuit de la boucle de filtration permettant de maintenir constante la température du produit en cours d'essai (25-30 °C).

Avant et après chaque opération, l'unité est lavée en séquence comme suit : **1.** rinçage complet à l'eau ; **2.** lavage basique (eau + lessive de soude jusqu'à pH = 10) à 25-30 °C, osmose inverse en fonctionnement 20 min sous ΔP = 10 bar ; **3.** rinçage complet avec de l'eau déionisée jusqu'à pH neutre ; **4.** lavage acide (eau + acide nitrique jusqu'à pH = 3) à 25-30 °C, osmose inverse en fonctionnement 20 min sous ΔP = 10 bar ; **5.** rinçage complet avec de l'eau déionisée jusqu'à pH neutre. Pour un arrêt prolongé (> 1 semaine), le pilote est conditionné avec une solution de métabisulfite de Na (1-2,5 g/l). Le pilote est mis en fonctionnement 10 min à une ΔP = 10 bar. La sortie du perméat est aussi maintenue immergée dans la même solution de métabisulfite de Na. Le démarrage des essais est conditionné par l'innocuité de ce module d'osmose inverse.

Au cours de la concentration, la pression transmembranaire est généralement imposée à 40 bar. Le volume nominal d'alimentation de l'unité de MFT est de 50 l. Les débits J d'OI sont mesurés au cours de l'essai par pesées continues du filtrat obtenu (eau pure recyclable). La cinétique de variation de ce débit est donc visualisable sur un graphe  $J = f(t)$  qui est une courbe décroissante en début de cinétique avec atteinte rapide d'un plateau horizontal indiquant une stabilisation du débit de filtrat pendant l'OI à 20 l/h.m<sup>2</sup> (Figure 3). L'opération de concentration par perméation de l'eau dure 5,2 h environ. Le volume total de perméat d'OI sert à calculer le facteur de réduction volumique à tout instant t (FRV<sub>t</sub>) de l'extrait microfiltré en cours de concentration, selon la formule :

$$FRV_t = \frac{V_i}{V_c} = \frac{V_i}{(V_i - V_w)} \quad (1)$$

avec  $V_i$  = volume initial de perméat de MFT utilisé  
 $V_w$  = volume de perméat d'OI au temps t  
 $V_c = V_i - V_w$  = volume calculé d'extrait concentré au temps t.

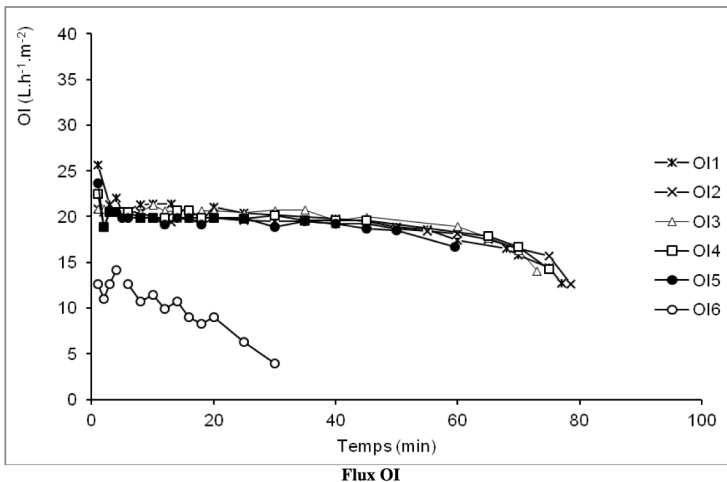


Figure 3. Flux OI des fabrications de concentrés de bissap.

Le co-produit concentré rouge foncé de bissap (obtenu d'une réduction de volume d'environ 60) est conditionné soit dans des bouteilles vertes teintées, soit dans des bouteilles claires (sans teinte) de 30 cl puis désaéré. Au cours de cette opération de désaération, l'oxygène inclus dans les bouteilles, est éliminé par injection d'azote (5 g par bouteille, sous pression de 7,5 mbar) via un fritté stérile plongé jusqu'au fond de la bouteille. Cette opération précède la fermeture hermétique des bouteilles qui subissent des tests d'étanchéité avant d'être disposées en conditions ambiantes. Les tests d'étanchéité sont effectués en plaçant les bouteilles fermées pendant 3 min dans un bain bouillant, ensuite en les noyant dans une bassine d'eau à température ambiante, puis en recouvrant de mousse savonneuse le couvercle des bouteilles pour vérifier la présence de bulles. La production de bulles indique la présence d'une fuite.

## 2.3. Caractéristiques physico-chimiques des co-produits

Les extraits de bissap sont caractérisés par leur couleur rouge foncée. Le pH, le taux de matières sèches sont les paramètres qui ont été déterminés sur les différents échantillons.

### 2.3.1. pH

Un pH-mètre Testo 230 type 4 (Testo, France) est utilisé pour les mesures de pH.

### 2.3.2. Taux de matières sèches

Le taux de matières sèches (% MS) est déterminé en triple suivant la norme AFNOR NF V18-109 version 71/47. On pèse avec précision ( $m_0$ ) 2 ml d'extrait que l'on met à sécher à l'étuve à 105 °C pendant 24 h jusqu'à poids constant ( $m_1$ ). Le % MS est donné par la formule :

$$\% \text{ MS} = \frac{100 (m_0 - m_1)}{m_0} \quad (2)$$

### 2.3.3. Polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux est déterminée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, décrite par Singleton (Singleton, Rossi, 1965) et modifiée par Jacqueline (Wood et al., 2002). 2,5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1/10) sont ajoutés à 30 µl d'extrait. Le mélange est maintenu pendant 2 minutes à l'obscurité à température ambiante puis 2 ml de solution de carbonate de sodium (75 g/l) y sont ajoutés. Le mélange est placé dans un bain-marie maintenu à 50 °C pendant 15 minutes, puis refroidi rapidement. L'absorbance est mesurée à 760 nm, avec comme solution à blanc, l'eau. Trois déterminations sont effectuées par analyses. La teneur en polyphénols totaux est exprimée en micromoles équivalent acide gallique par gramme de poids sec (µmol/g GAE).

## 2.4. Étude de la stabilité au cours de la conservation

La stabilité des extraits de bissap a été évaluée en deux temps pendant 1 mois puis 8 mois et a porté sur les critères physico-chimiques et microbiologiques.

### 2.4.1. Stabilité physico-chimique

Des aliquotes des co-produits préparés sont d'abord conservées pendant 28 jours à la lumière générée par une lampe UV-visible (MAZDA, 400 W E8, germination phylotron) dans un germoir thermostatée (Nüve – Growth chamber GC 400, Turquie) allumée 7 h/jour, à l'obscurité à 20 °C et au réfrigérateur (Electrolux, France) à 4 °C. L'évolution de l'indice de dégradation a été suivie sur cette durée (Figure 4) pour évaluer l'impact des différents procédés sur la stabilité de la couleur des produits obtenus. L'expérience a été conduite pendant plusieurs mois sur les extraits les plus stables. L'indice de dégradation de la couleur a été suivi.

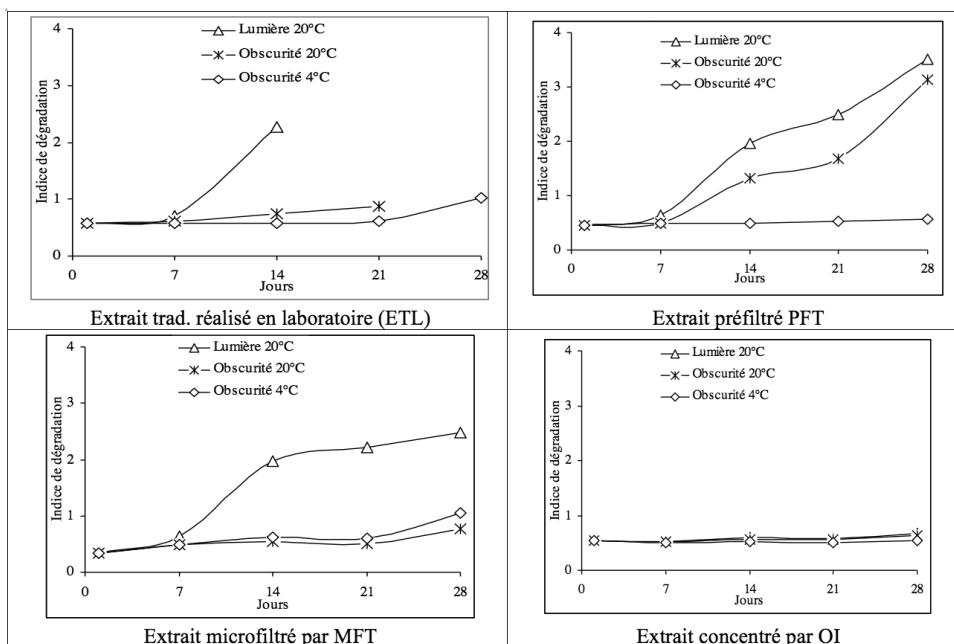


Figure 4. Stabilité de la couleur (IDC).

### Indice de dégradation de la couleur

L'indice de dégradation de la couleur se détermine par le rapport des absorbances à 420 nm et à  $\lambda_{\max} = 520$  nm (Wrolstad, 1976; Cevallos-Casals, Cisneros-Zevallos, 2004). C'est un indicateur de la stabilité de l'extrait pendant sa conservation dans des conditions déterminées. La DO des échantillons, préalablement filtrés à 0,45  $\mu\text{m}$ , est mesurée respectivement à 420 nm et à 520 nm. L'indice de dégradation de la couleur (IDC) est calculé comme suit :

$$\text{IDC} = \frac{A_{420 \text{ nm}}}{A_{520 \text{ nm}}} \quad (3)$$

On note :  $A_{420\text{nm}}$  = absorbance à 420 nm ;  $A_{520\text{nm}}$  = absorbance à 520 nm

#### 2.4.2. Stabilité microbiologique

L'étude de la stabilité des extraits vis-à-vis des développements microbiens a été conduite sur des échantillons des différents co-produits préparés (ETL, PFT, MFT, OI) prélevés de façon aseptique (NF V 08-408, AFNOR 1997) et analysés sous hotte à flux laminaire. Les germes recherchés étaient les Germes Aérobie Mésophile (GAM), et les levures-moisissures. Les analyses microbiologiques ont été réalisées à intervalles de temps variables à raison d'un prélèvement hebdomadaire au cours du premier mois puis à partir du deuxième mois et ce jusqu'au huitième mois, un prélèvement mensuel. Les géloses PCA et Sabouraud au Chloramphénicol ont été utilisées respectivement pour le dénombrement des GAM et des levures et moisissures totales. Ensuite, 0,1 ml de chaque solution mère et de ces dilutions ont été ensemencés en surface sur chaque milieu préalablement coulés en boîte de Petri. Ces boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 h pour les GAM et à 25 °C pendant 72 h pour les levures et moisissures totales. L'estimation de la population (N) est calculée selon la norme ISO (NF ISO 7218/A1) (AFNOR, 2013).

$$\text{Avec } N = \Sigma C / [V \times (n_1 + 0,1n_2) \times d]$$

ΣC est somme des colonies comptées sur les boîtes à la dilution retenue pour le comptage ;

n<sub>1</sub> = nombre de boîtes retenues dans la première dilution ;

n<sub>2</sub> = nombre de boîtes retenues dans la deuxième ;

V = volume de l'inoculum dans chaque boîte ;

d = facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue.

### 3. Résultats et Discussion

#### 3.1. Caractéristiques physico-chimiques des extraits

Le tableau 1 montre que les extraits de bissap sont acides (pH≈2,7) et naturellement rouges colorés. De tels extraits renferment en moyenne 16-23 % de composés polyphénoliques à fonctionnalité colorante constitués par les anthocyanes (Francis, 1989; Ali et al., 2005; Castañeda-Ovando et al., 2009). Leur stabilité est un déterminant de la qualité des préparations du bissap : une telle relation oriente le choix d'évaluer la stabilité de l'extrait à partir de la couleur. L'application des Techniques Séparatives Membranaires (TSM) induit une augmentation notable de 36 fois le taux de matières sèches dans le co-produit final (concentré) par rapport à la préparation traditionnelle (15,8 contre 0,35 %).

**Tableau 1.** Caractéristiques physico-chimiques des extraits de bissap.

Méthode de préparation	Extraits	pH	T(°C)	Couleur	MS (%)
Traditionnelle	ETLdécoction	2,69	47	rouge	0,47
	ETLinfusion	2,68	27	rouge	0,42
TSM	PFT	2,66	24	rouge	0,38
	MFT	2,76	26	rouge clair	0,35
	OI	2,58	27	rouge très foncé	15,8

#### 3.2. Stabilité des préparations

Des extraits obtenus suivant les deux voies de préparation ont été soumis dans un premier temps à diverses conditions de conservation : lumière, atmosphère ambiante (obscurité) et à 4°C. L'indice de dégradation a été mesuré sur 28 jours.

##### 3.2.1. Extraits brut (PFT) et traditionnel (ETL)

Il a été observé visuellement que tous les extraits bruts exposés à la lumière se dégradent (Tableau 2). Cette dégradation est perceptible à partir de 7 jours de conservation. Ces extraits perdent totalement leur couleur rouge initiale après 14 jours, l'indice de dégradation est alors supérieur ou égal à 2 (Figure 4) ; il se forme alors des moisissures et des précipités.

**Tableau 2.** Taux de dégradation des polyphénols d'extraits traditionnels de bissap (ETL).

Temps d'exposition (j)	Dégradation (%)		
	4°C	20°C - Obscurité	20°C - Lumière
1	0	0	0
7	0	9	23
14	2	30	298
21	7	53	-
28	79	-	-

(-) détérioration complète.



Les extraits conservés à l'obscurité en atmosphère ambiante (20 °C) ne subissent pas de modification notable, la dégradation de la couleur rouge n'est observée qu'après 14 jours pour le PFT et 21 jours pour l'extrait traditionnel de laboratoire (ETL). Cette dégradation relativement rapide du PFT par rapport à l'ETL pourrait être expliquée essentiellement par l'activité des enzymes et/ou des micro-organismes encore présents dans cet extrait. Selon les travaux rapportés par Markakis (1982), les enzymes de dégradation des anthocyanes (glycosides, phénolases) pourraient être inactivées par chauffage, du fait de leur thermosensibilité. Les glycosidases des organes végétaux libèrent les anthocyanes de leurs sucres et l'aglycone ainsi formée se déstabilise et se dégrade en un produit décoloré. Quant aux phénolases (phénoloxydases, polyphénoloxydases), elles favorisent la production de *o*-benzoquinones, capables d'oxyder puis décolorer les anthocyanes. En l'absence de traitement thermique, les micro-organismes (levures, moisissures, bactéries lactiques et acétiques) se développent en exploitant le potentiel nutritif des extraits comme substrat de croissance. Ils libèrent par conséquent dans le milieu des métabolites indésirables tels que les enzymes et les produits de scission divers (Ngom, 2001).

À l'obscurité à 4 °C, la dégradation de la couleur des extraits ETL est très faiblement perceptible sur la durée de l'étude (IDC  $\approx$  1).

### **3.2.2. Extraits fabriqués au pilote de TSM : MFT et OI**

Les concentrés d'OI restent très stables, quelles que soient les conditions de conservation (IDC  $\approx$  0,6). Tous les extraits de bissap sont relativement stables pendant 7 jours, quelles que soient les conditions de conservation. L'obscurité et les basses températures permettent d'accroître la persistance de la couleur rouge initiale de l'extrait pendant plus de 15 jours. La MFT prolonge le délai de persistance de la couleur lors de la conservation des extraits à l'obscurité. Toutefois, une fois exposés à la lumière, ces extraits se dégradent. Ces résultats corroborent ceux de Kjell (Kjell, Oyvind, 2005) sur l'effet de la lumière dans le processus de dégradation des anthocyanes.

L'état de concentrés (OI) contribue à accroître la durée de stabilité de la couleur, quelles que soient les conditions d'exposition (Figure 4).

On note en définitive que les conditions de conservation influencent notablement la stabilité des extraits bruts (ETL et PFT) de bissap. Les basses températures et l'abri de la lumière sont des facteurs de stabilité des extraits; ces résultats corroborent ceux de Tsai et Asm (1996). La dégradation dans la plupart des cas est précédée par une précipitation de composés organiques tels que les pectines, les mucilages qui en se dépolymérisant vont accroître cette altérabilité (Markakis, 1982). Le bissap renfermant environ 12% de sucres libres (Guinle, 2000), leur dégradation par les micro-organismes pourrait contribuer également à la détérioration de la qualité de cette préparation (Durhard et al., 1997). L'opération unitaire complémentaire de la clarification n'a stabilisé que la couleur des extraits placés à l'abri de la lumière sur plus de 20 jours. L'altération de la couleur après 7 jours d'exposition à la lumière pourrait être expliquée par la dégradation de l'acide ascorbique et des anthocyanes qui vont conduire à la formation de furfural responsable de la modification de la structure du cation flavylum (Ngom, 2001). La stabilité des extraits obtenus par couplage MFT/OI quelles que soient les conditions serait due à des phénomènes de complexation (Ngom, 2001) par condensation des anthocyanes avec des tanins catéchiques (obtenus après une dépolymérisation suffisante durant les 31 h (18 h + 7,8 h + 5,2 h) de processus) pour former des complexes T-A plus stables. Le procédé couplé proposé (Macération + MFT + OI) serait donc une alternative judicieuse au renforcement de la stabilité de la couleur des extraits. Une clarification préalable par microfiltration tangentielle (MFT) des extraits bruts permettrait une élimination des bactéries, des matières en suspension, des complexes polymérisés responsables de la dégradation des extraits finaux, ce qui pourrait conférer une plus-value aux extraits finaux.

### 3.3. Qualité microbiologique

La qualité microbiologique des différents extraits a été évaluée au cours des essais de conservation (1 mois et 8 mois). Les tableaux 3 et 4 présentent l'évolution du nombre de germes durant le premier mois de l'expérimentation sur les extraits bruts. Quant aux tableaux 5 et 6, ils présentent l'évolution du nombre de germes durant les 8 autres mois qu'ont duré les essais de conservation des co-produits obtenus au pilote de TSM (MFT+OI). Les germes qui ont été ciblés sont les GAM et les levures-moisissures.

**Tableau 3.** Évolution des germes dans l'extrait traditionnel ETL.

ETL	Nombre d'échantillons testés	GAM (× 10 <sup>3</sup> UFC/ml)	Levures et Moisissures (× 10 <sup>3</sup> UFC/ml)
1*	2	1,87	0,70
7	2	2,43	1,15
14	2	4,11	3,48
21	2	5,60	4,56
28	2	7,50	5,32

(<sup>\*)</sup> : prélèvement avant conditionnement.

**Tableau 4.** Évolution des germes dans l'extrait préfiltré PFT.

PFT	Nombre d'échantillons testés	GAM (× 10 <sup>3</sup> UFC/ml)	Levures et Moisissures (× 10 <sup>3</sup> UFC/ml)
1*	2	0,18	0,03
7	2	37,5	3,01
14	2	122	55
21	2	6320	406
28	2	741 000	6540

(\*) : prélèvement avant conditionnement.

#### 3.3.1. Extraits ETL et PFT

L'évolution du taux de germes aérobies mésophiles (GAM) dans les extraits bruts préparés suivant les recettes traditionnelles et la voie de préparation à froid a été étudiée durant 28 jours. Les tableaux 3 et 4 montrent que le nombre de germes aérobies mésophiles augmente avec le temps de conservation des co-produits (ETL, PFT). On constate que la charge microbienne (GAM) des extraits ETL et PFT est très élevée à raison de 7,5.10<sup>3</sup> UFC/ml et 741 000.10<sup>3</sup> UFC/ml respectivement après 28 jours d'essais. Les extraits PFT présentent un développement microbien notable par rapport aux extraits ETL : GAM - 741 000.10<sup>3</sup> contre 7,5.10<sup>3</sup> UFC/ml et Levures-moisissures - 6540.10<sup>3</sup> contre 5,32.10<sup>3</sup> UFC/ml respectivement. Cela pourrait s'expliquer par la nature du procédé exploité ; l'extrait PFT est obtenu au cours du procédé à froid tandis que l'ETL provient du procédé traditionnel (à chaud). Le traitement thermique appliqué contribue à réduire la charge microbienne.

#### 3.3.2. Extraits MFT et OI

La MFT et l'OI sont les deux procédés couplés lors de l'extraction à froid. Du fait de la relative stabilité des extraits MFT et OI, des essais y ont été conduits durant 8 mois. Dans chaque cas, les GAM et levures-moisissures (Tableaux 5 et 6) ont été dénombrés.

**Tableau 5.** Analyse microbiologique des extraits MFT.

MFT	Nombre d'échantillons testés	GAM (UFC/ml)	Levures et Moisissures (UFC/ml)
1*	3	< 01	< 01
2	3	< 01	< 01
3	3	< 01	< 01
4	3	< 01	< 01
5	3	< 01	< 01
6	3	< 01	< 01
7	3	< 01	< 01
8	3	< 01	< 01

< 01 : aucune colonie dénombrée – (\*) : prélèvement avant conditionnement.

**Tableau 6.** Analyse microbiologique des extraits OI.

OI	Nombre d'échantillons testés	GAM (UFC/ml)	Levures et Moisissures (UFC/ml)
1*	3	< 01	< 01
2	3	< 01	< 01
3	3	< 01	< 01
4	3	< 01	< 01
5	3	< 01	< 01
6	3	< 01	< 01
7	3	< 01	< 01
8	3	< 01	< 01

< 01 : aucune colonie dénombrée – (\*) : prélèvement avant conditionnement.

Aucun développement microbien n'a été observé, ni dans les extraits MFT comme l'ont observé Cissé et al. (2011), ni dans les extraits concentrés OI (Tableau 6). Cette observation révèle que la clarification (diamètre de pore de membrane : 0,2  $\mu\text{m}$ ) a été suffisante et efficace pour éliminer tous les micro-organismes de l'extrait brut et que les étapes ultérieures se sont déroulées dans des conditions aseptiques et qu'il n'y a eu aucune contamination ultérieure. L'extrait concentré final exposé en conditions ambiantes reste stable pendant plusieurs mois (8); et cela est confirmé après contre-analyse réalisée dans un laboratoire certifié de Côte d'Ivoire. Ces résultats intéressants laissent entrevoir de réels enjeux à l'exploitation de la technologie membranaire pour l'extraction dans l'eau de nombreux substrats locaux fortement périssables.

### 3.4. Des résultats à l'origine d'une appropriation effective

L'intérêt suscité par les productions réalisées lors des travaux de 2009 a été à l'origine d'un partenariat avec des opérateurs économiques ayant permis de vérifier la faisabilité de l'appropriation de l'avancée technologique en milieu réel. Un tel partenariat a bénéficié du financement de l'ambassade de France en Côte d'Ivoire pour le transfert de cette technologie (unité pilote semi-industrielle) sur site à l'INP-HB de Yamoussoukro (Côte d'Ivoire), dans le cadre d'un projet FSD (Fonds Social et de Développement). Le partenariat a associé les coopératives des femmes de Tenikro (Commune de Yamoussoukro), l'ONG OVDL, la confédération des tradipraticiens de la région du Centre, certaines PME du pays telles que BIO-GARDEN Abidjan et l'unité de laboratoire de Chimie de l'Eau et des Substances Naturelles (UCESNA/LAPISEN).

Le partenariat s'est manifesté dans la conduite de formations de groupes de femmes, de tradipraticiens à la fabrication sur le pilote à membranes d'extraits concentrés de végétaux

notamment le bissap, à la conservation et au dosage des préparations. Grâce à l'effort de diffusion de l'ONG OVDL, les coopératives des femmes ont acheté ou produit ces trois dernières années, des concentrés de bissap pour le marché local, tandis que les tradipraticiens ont été assistés dans la production de concentrés de plantes médicinales (*Carapa procera*, *Cola nitida*, *Moringa oleifera*, *Justicia secunda*, etc.).

Le partenariat commercial avec l'entreprise BIO-GARDEN a permis de mettre sur le marché de nouvelles boissons fabriquées à base d'ingrédients de bissap et d'autres substrats concentrés. Les ventes de bissap réalisées par la plate-forme depuis 2010, indiquant une nette croissance d'une année à l'autre (Figure 6) témoignent de la réalité d'une demande locale et de la compétitivité des produits finaux proposés.

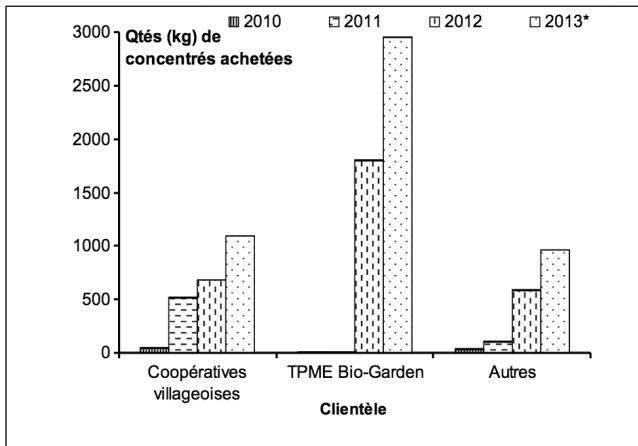


Figure 6. Flux de concentrés et clientèle. \* : cumul sur les 4 premiers mois de l'année 2013.

#### 4. Conclusion

Les techniques séparatives membranaires ont permis de fabriquer, à l'échelle (semi-) industrielle, des concentrés de bissap de qualité. La nature de concentré induit une réduction des volumes de matière première et d'extraits, avec une incidence favorable sur le coût de transport.

La fabrication de ces concentrés préparés à froid confère une plus-value à la plante d'*Hibiscus sabdariffa* et aux extraits obtenus. L'usage d'un tel procédé permet non seulement de faciliter les préparations de boissons en termes de rapidité et de dosage, mais aussi de disposer en toute saison d'un extrait stable d'*Hibiscus*. Après 8 mois de conservation en atmosphère ambiante à l'abri du soleil, le concentré final conserve ses qualités originelles (microbiologique et chimique) et peut être utilisé comme base/ingrédient pour la fabrication de produits de santé divers (boissons, colorant naturel, ingrédient actif antioxydant).

Le procédé mis au point n'est pas pénalisé par un coût plus élevé de production que le procédé traditionnel car il ne nécessite pas une opération de pasteurisation de grands volumes d'extrait dilué. Au gain énergétique découlant de l'affranchissement d'une phase de pasteurisation, vient s'ajouter le gain de qualité sensoriel du produit final pour accroître l'attractivité du procédé mis au point.

L'application industrielle du procédé mis au point, par simple changement d'échelle, a été vérifiée dans le cadre d'un partenariat avec des opérateurs économiques locaux. Ce partenariat a montré que les technologies séparatives membranaires sont transférables dans un

environnement de faible technicité, pour développer les activités des acteurs déjà impliqués dans la valorisation des extraits végétaux, avec création d'emplois en zone rurale.

## Bibliographie

- Adjé A.F., 2009. *Production par procédés membranaires couplés d'extraits polyphénoliques de Carapa procera, Delonix regia et Hibiscus sabdariffa - Détermination des structures moléculaires et des activités antioxydantes*. Doctorat d'Université : Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Faculté des Sciences et Techniques. Marseille, France. 211 p.
- AFNOR, 1997. *NF V 08-408 (octobre 1997) Microbiologie des aliments – Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés – Méthode de routine (Indice de classement : V08-408)*.
- AFNOR, 2013. *NF EN ISO 7218/A1 (octobre 2013) Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations – Amendement 1 (Indice de classement : V08-002/A1)*.
- Ali B.H., Al Wabel N., Blunden G., 2005. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A review. *Phytotherapy Research*, **19**(5), 369-375.
- Bricage P., 1980. Étude des phénotypes pigmentaires du Bissap, *Hibiscus sabdariffa* L., Malvacées. I Biométrie de la productivité. *Bulletin I.F.A.N.*, **42**(4), 679-701.
- Castañeda-Ovando A., Pacheco-Hernández M., Páez-Hernández M.E., Rodríguez A.J., Galán-Vidal C.A., 2009. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, **113**, 859-871.
- Cevallos-Casals A., Cisneros-Zevallos L., 2004. Stability of anthocyanin-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*, **86**(1), 69-77.
- Chemat F., 2011. *Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs*. Dunod, Paris, 322 p.
- Cissé M. et al., 2009. Le bissap (*Hibiscus sabdariffa* L.) : composition et principales utilisations. *Fruits*, **64**(3), 179-193.
- Cissé M., Vaillant F., Soro D., Reynes M., Dornier M., 2011. Crossflow microfiltration for the cold stabilization of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Journal of Food Engineering*, **106**(1), 20-27.
- Durhard V., Garnier C., Megard D., 1997. Comparison of the stability of selected anthocyanin colorants in drink model systems. *Agro Food Industry Hi Tech*, **8**, 28-34.
- Francis F.J., 1989. Food colorants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **28**(4), 273-314.
- Guinle F., 2000. *Applications des méthodes séparatives membranaires pour la stabilisation du concentré de Bissap* (*Hibiscus sabdariffa*). Rapport de stage, CIRAD.
- Kjell T., Oyvind M.A., 2005. Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, **89**(3), 427-440.
- Markakis P., 1982. Stability of anthocyanins in foods. In: Markakis P. (ed.). *Anthocyanins As Food Colors*. Academic Press, New York, 163-180.
- Mourtzinis I. et al., 2008. Thermal stability of anthocyanin extract of *Hibiscus sabdariffa* L. in the presence of beta-cyclodextrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**(21), 10303-10310.
- Ngom P.M., 2001. *Essai de stabilisation de la couleur rouge de la boisson de bissap* (*Hibiscus sabdariffa* L.). Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Université Cheick Anta Diop, Dakar, 110 p.
- Pi-Jen T., McIntosh J., Pearce P., Camden B., Jordan B.R., 2002. Antocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. *Food Research International*, **35**(4), 351-356.
- Singleton V. L., Rossi A.J., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**(3), 144-158.
- Tsaï P.R., Asm O.A., 1996. Thermodegradation mechanism of anthocyanin in roselle. In: *IFT Annual Meeting Book of Abstracts*. Institute of food technologists, USA, p. 92.

Wood J.E., Senthilmohan S.T., Peskin A.V., 2002. Antioxidant activity of procyanin - containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, **77**(2), 155-161.

Wrolstad R.E., 1976. Color and pigment analyses in fruit products. *Oregon Agricultural Experiment Station Bulletin*, **624**, 1-17.