



HAL
open science

Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales

Thi Thu Nguyen

► **To cite this version:**

Thi Thu Nguyen. Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales. Autre. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK040 . tel-02079428

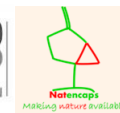
HAL Id: tel-02079428

<https://theses.hal.science/tel-02079428>

Submitted on 26 Mar 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE COMTÉ

UNIVERSITÉ DIJON - AGROSUP DIJON

UMR PAM (Procédés Alimentaires et Microbiologiques)

ÉCOLE DOCTORALE ENVIRONNEMENTS-SANTÉ

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne - Franche-Comté

Spécialité : Biotechnologie Agro-alimentaire

Options : Biochimie alimentaire, Génie des Procédés

Par NGUYEN Thi Thu

Éco-extraction et encapsulation de pigments caroténoïdes et anthocyanes à partir de plantes tropicales

Soutenance le 18/04/2018

Pr. Sylvie DESOBRY-BANON
Pr. NGUYEN Thi Minh Tu

Rapporteur, Université de Lorraine
Rapporteur, Institut Polytechnique de Hanoï

Pr. Andrée VOILLEY
Dr. Michel PROST

Examineur, AgroSup Dijon
Examineur, Lara-Spiral

Pr. Yves WACHÉ
Dr. TRAN Thi Thu Thuy

Directeur de thèse, AgroSup Dijon
Codirectrice de thèse, Institut de Chimie des
Substances Naturelles

Thèse financée par l'Agence Université de la Francophonie

Remerciement

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Unité Mixte de Recherche des Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM) et à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) de l'Académie des Sciences et Technologies du Vietnam. Je tiens tout d'abord à remercier les professeurs Patrick GERVAIS et Laurent BENEY, Directeur successifs de l'UMR PAM et le Professeur PHAM Quoc Long, Directeur d'ICSN pour m'avoir accueillie au sein de leurs équipes de recherche.

J'adresse mes remerciements à L'Agence Universitaire de la Francophonie qui a financé ma thèse. Je tiens également à remercier l'Association Rencontres du Vietnam pour son soutien financier pour ma 4^{ème} année de thèse.

Je souhaite exprimer mes plus chaleureux et sincères remerciements à mon Directeur de thèse, le Professeur Yves WACHÉ. Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse et de m'avoir accompagnée pendant ces années en France. Il fut agréable et motivant d'avancer au long de cette thèse avec toute ta bienveillance, ta confiance, tout ton encadrement scientifique et humain, ta disponibilité, et ton savoir.

J'adresse mes plus vifs remerciements à ma Directrice de thèse, le Docteur TRAN Thi Thu Thuy, pour avoir accepté de diriger cette thèse, ainsi que pour le partage de ses précieuses connaissances.

Je tiens vivement à remercier les professeurs Sylvie DESOBRY-BANON, Université de Lorraine et NGUYEN Thi Minh Tu, Institut Polytechnique de Hanoï, pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens à exprimer mes profonds remerciements aux membres de mon comité de thèse, le Professeur VO Thanh Giang, Université de Paris-Orsay et le Maître de conférence HDR Florence HUSSON, Université de Bourgogne – Franche-Comté, qui ont suivi annuellement mon travail et qui m'ont donné de précieux conseils scientifiques. Je remercie particulièrement le Professeur VO Thanh Giang de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire de Catalyse Moléculaire de l'Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay.

Madame le Professeur Andrée VOILLEY, avec qui j'ai eu de nombreuses discussions enrichissantes, c'est une grande joie de vous compter parmi les membres de mon jury de thèse, et je vous adresse mes plus chaleureux remerciements.

Je tiens à remercier Docteur Michel PROST, Lara-Spiral, pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Laurence NORET pour m'avoir accompagnée pour les analyses en HPLC à l'IUVV, à Jimmy GOBERT pour son soutien technique concernant les analyses colorimétriques à Welience, au Professeur Odile CHAMBIN pour ses conseils scientifiques et pour nos moments agréables.

Je n'oublie pas d'adresser un grand merci à Christine ROJAS, Sylvie MOUNDANGA, Florence BOFFY, Alexandre GAUDRY pour la disponibilité et la gentillesse dont ils ont fait preuve, en particulier dans le soutien technique, administratif et informatique.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe PAM et de l'équipe ICSN, tous ceux qui ont travaillé à mes côtés et ont partagé leur activité de chercheurs dans une ambiance conviviale. J'adresse mes remerciements à mes collègues de Dijon (Hanh, Ngoc, Dat, Sophal, Antonio, Manhal, Jean-Luc, Aurore, Da, Chi, Vuong, Maxime ...) et de Hanoï (Phuong, Inh, Huong, Ly, Trang, Ha, Nga, Tuyen Anh, Thu, Lam, Oanh ...) pour leur sincère amitié, les partages d'expériences et pour tous les bons moments passés ensemble.

Je voudrais remercier vivement mes amis vietnamiens : Binh An, Linh, Tu, Tran Bi, Uyen, Trang, Hanh, Hai Vu - Ha, Hung - Ha, Nhu Anh - Quan, Phuong – Mau, Chi, Hoang Anh, Truc-Tung, Thinh, Alex, ..., avec qui j'ai passé des moments pleins de convivialité et d'amitié.

Enfin, je souhaite rendre un hommage particulier à ma famille : mes parents, mon fiancé, mes beaux-parents, mes frères et sœurs, mes neveux et nièces pour le grand soutien dont ils ont fait preuve tout au long de mes études.

Résumé

Cette thèse porte sur l'éco-extraction et l'encapsulation de pigments naturels pour une exploitation et application dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique. Dans ce but, l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) ou par ultrasons (UAE) et celle par liquides ioniques (LI) ont été évaluées pour l'extraction de caroténoïdes et d'anthocyanes de plantes vietnamiennes. Les résultats obtenus montrent que le MAE a été un système permettant d'accélérer et d'améliorer tous les types d'extraction testés alors que les ultrasons se sont montrés particulièrement efficaces lorsque les pigments étaient présents à la surface des tissus végétaux. Cependant, l'UAE améliore également les résultats par rapport à des extractions sans assistance. Les LI classiques ne sont pas adaptés pour l'extraction des pigments caroténoïdes et anthocyaniques qui sont généralement non volatils et thermosensibles car il n'a pas été possible de séparer les pigments extraits des LI dans des conditions douces. Pour remédier à ce problème, des LI réversibles ont été évalués. Le DBU/1-hexanol était efficace pour extraire les caroténoïdes relativement accessibles, mais, en raison d'une viscosité élevée, il perdait son efficacité pour d'autres tissus. La deuxième partie de cette thèse concerne l'encapsulation d'anthocyanes d'hibiscus dans des levures. Nous avons d'abord travaillé avec des levures entières. Les résultats ont montré que les cellules de levure étaient un bon matériau pour l'encapsulation des anthocyanes. Cependant, pour les levures non désactivées, les enzymes ont provoqué une perte indésirable de couleur des anthocyanines pendant le stockage. Les microparticules de levures traitées thermiquement ont montré un effet protecteur élevé pendant le stockage. Puis, comme les anthocyanes étaient majoritairement encapsulés dans le réseau pariétal des levures, nous avons utilisé les écorces de levures séparées du reste des cellules. Les microparticules des écorces de levure ont apporté une bonne protection pour les anthocyanes contre l'humidité, la chaleur et la lumière. En comparant avec les microparticules de maltodextrine, celles des écorces de levure étaient plus stables dans des conditions d'humidité élevée. En général, les microparticules de levure ont montré une capacité à protéger les anthocyanes et à garder la couleur rouge de la poudre d'anthocyanes encapsulés. Ces résultats montrent que la poudre d'anthocyanes encapsulés dans des levures ou écorces de levure a un avenir prometteur pour être appliquée dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique.

Mots-clés : Pigments naturels, caroténoïdes, anthocyanes, extraction assistée, extraction par liquides ioniques réversibles, encapsulation, microparticules de levure, écorce de levure.

Abstract

This thesis deals with extraction processes using assistance technologies or green solvents and encapsulation systems of natural pigments in order to exploit and apply them in the food, cosmetic and pharmaceutical industries. In this goal, microwave-assisted extraction (MAE), ultrasonic-assisted extraction (UAE) and Ionic liquids (IL) were evaluated for the extraction of carotenoids and anthocyanins from Vietnamese plants. The results obtained show that the MAE was always a rapid and helpful system for all types of extraction tested whereas ultrasounds were particularly efficient when pigments are present on the surface of plant tissues. However, UAE was also improving results compared to conditions without assistance. Traditional IL are not suitable for the extraction of carotenoid and anthocyanin pigments that are generally non-volatile and heat-sensitive because it has not been possible to separate pigments extracted from IL under mild conditions. Therefore switchable IL were evaluated. DBU/ 1-hexanol was efficient to extract carotenoids that were relatively accessible, but, due to its high viscosity, it lost efficacy for other tissues. The second part of this thesis concerns the encapsulation of *Hibiscus* anthocyanins in yeasts. We have first worked with whole yeast cells. The results showed that yeast cells were a good material for the encapsulation of anthocyanins. However, yeast enzymes caused undesirable colour loss of anthocyanin during storage. Microparticles of heat-treated yeasts showed a high protective effect during storage. Then, as it was interesting to keep the pigments in the cell wall and deactivate the yeast enzymes, we used yeast hulls. Yeast hull particles brought a good protection to anthocyanins against moisture, heat and light. In comparison with maltodextrin microparticles, yeast hull ones were more stable in high humidity. In general, yeast microparticles have shown an ability to protect anthocyanins and to keep the red color of encapsulated anthocyanin powder. These results show that yeast encapsulated anthocyanins powder has a promising future to be applied in the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

Keywords: Natural pigments, carotenoids, anthocyanins, assisted extraction, extraction by switchable ionic liquids, encapsulation, yeast microparticles, yeast hulls

Liste des publications et communications

Communications:

- XXI Forum des Jeunes Chercheurs, à Dijon, Juin 2015 : « **Extraction et stabilisation d'anthocyanes à partir de Roselle (*Hibiscus sabdariffa*)** » - Poster
- XXII Forum des Jeunes Chercheurs, à Besançon, Juin 2016 : « **Application de liquide ionique réversible en extraction des pigments naturels** » - Communication oral

Publications :

- **Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast.** T-Thu Nguyen, Hanh Phan-Thi, Bao-Ngoc Pham-Hoang, Phuong-Thao Ho, Thi Thu Thuy Tran, Yves Waché (publiée)
- **Sustainable processes for the extraction of carotenoids from tropical plants.** T-Thu Nguyen, Hanh Phan-Thi, Thi Thu Thuy Tran, Giang Vo-Thanh, Yves Waché (soumise)
- **Microencapsulation of *Hibiscus Sabdariffa* L. calyx anthocyanins with yeast hulls.** T-Thu Nguyen, Andrée Voilley, Tran Thi Thu Thuy, Yves Waché (soumise)

Liste des figures (hors articles)

Figure 1. Isoprène et squelette carboné de caroténoïdes	8
Figure 2. Structure chimique de quelques carotènes (a, b) et xanthophylles (c, d, f)	9
Figure 3. Schéma simplifié de la bioconversion du β -carotène en vitamine A (Yahia & Ornelas-Paz, 2009).....	10
Figure 4. Structure du cation flavylum ou 2-phényl-1benzopyrilium, la structure de base des anthocyanes	14
Figure 5. Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide représentées dans le cas du cyanidin-3 glucoside	18
Figure 6. Mécanisme de l'extraction assistée par micro-ondes (Perino, Makerri, Abert-Vian, & Chemat, 2016).....	23
Figure 7. Effondrement de bulles de cavitation et libération de matériel végétal. Voir dans le texte pour le détail des explications.	24
Figure 8. Structure chimique des principaux cations LI rencontrés dans la littérature	26
Figure 9. Concept des LI réversibles par le groupe de Jessop (R = H ou un groupe alkyl).....	33
Figure 10. Baies de Goji (a) et structure de zéaxanthine (b).....	42
Figure 11. Baie de roucou (a) et structure de la bixine (b).....	43
Figure 12. Fleur de Rose d'Inde (a) et structure de la lutéine (b)	43
Figure 13. Les feuilles riches en caroténoïdes	44
Figure 14. (a) fleur en fructification, (b) calice et fruit, (c) calices séchées.....	45
Figure 15. Principales anthocyanidines du calice de la Roselle.....	45
Figure 16. Schéma d'un système de chromatographie sur couche mince	46
Figure 17. Schéma du tamisage moléculaire.....	51
Figure 18. Représentation de couplage vicinal proton et ses interactions	52
Figure 19. Résumé des résultats de la partie sur l'extraction : l'effet physique de l'assistance facilite la libération des composés par déstructuration du tissu végétal (à gauche) ; l'extraction par liquides ioniques traditionnels ne permet pas une séparation du solvant et nous avons travaillé sur des liquides ioniques réversibles (à droite).	56
Figure 20. Effet de solvants (a) et de l'assistance (b) sur l'extraction d'anthocyanes d'hibiscus.	75
Figure 21. Spectre RMN- ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de la bixine isolée.....	76
Figure 22. Spectre COSY ¹ H- ¹ H de la bixine isolée	78
Figure 23. Les spectres HMBC du composé de bixine isolée.....	79
Figure 24. Structure de la 9'-Z-bixine	80

Figure 25. Le spectre RMN- ¹³ C de la lutéine isolée	81
Figure 26. Les spectres DEPT de la lutéine isolée	82
Figure 27. Le spectre HSQC de la lutéine isolée	82
Figure 28. Le spectre COSY de la lutéine isolée	83
Figure 29. Le spectre HMBC de la lutéine isolée	84
Figure 30. Structure de la <i>all-E-3R,3'R,6'R</i> -lutéine.....	84
Figure 31. Chromatogramme HPLC de zéaxanthine isolée	86
Figure 32. Structure de la zéaxanthine	86
Figure 33. Le spectre RMN ¹ H de la zéaxanthine isolée.....	88
Figure 34. Le spectre RMN ¹³ C de la zéaxanthine isolée	89
Figure 35. Le spectre HMBC de la zéaxanthine isolée	89
Figure 36. Effet du statut physicochimique des cellules et du ratio anthocyanes/cellules sur l'efficacité d'encapsulation dans la levure (à gauche) ; Effet des conditions de stockage et d'enzyme de levure sur la stabilité d'anthocyanes et la couleur des micropraticules (à droite).	91

Liste des tableaux (hors articles)

Tableau 1. Quelques colorants naturels sont totalement autorisés en France	7
Tableau 2. Végétaux riches en β -carotène au Vietnam (Trung tâm dinh dưỡng, 2001)	13
Tableau 3. Principales anthocyanidines rencontrés chez les végétaux	14
Tableau 4. Rôle protecteur des anthocyanes dans la santé humaine	15
Tableau 5. Sources naturelles d'anthocyanes.....	20
Tableau 6. Classification des solvants d'extraction(Farid Chemat, 2011).....	25
Tableau 7. Valeurs de températures de transition vitreuse, de fusion et de décomposition de certains liquides ioniques (Moutiers & Billard, 2005).....	28
Tableau 8. Viscosité de quelques liquides ioniques (Moutiers & Billard, 2005).....	28
Tableau 9. Application des liquides ioniques pour l'extraction de composés bioactifs	30
Tableau 10. Application des liquides ioniques réversibles pour l'extraction	34
Tableau 11. Les trois grandes classes de procédés industriels de microencapsulation.....	36
Tableau 12. Principaux procédés de microencapsulation utilisés en sciences des aliments	37
Tableau 13. Encapsulation d'anthocyane par différents matériaux et techniques	38
Tableau 14. Application de levure pour l'encapsulation de polyphénols	40
Tableau 15. Coefficient d'absorption molaire des composés de cette étude.....	48
Tableau 16. Les conditions d'extraction d'anthocyanes à partir <i>Hibiscus sabdariffa</i>	74
Tableau 17. Données RMN ^1H & ^{13}C de bixine isolée et reportées (Rehbein et al., 2007) * 600 MHz, acétone- d_6 / D_2O	77
Tableau 18. Déplacement chimique en RMN- ^1H et- ^{13}C de la all-E-3R,3'R,6'R-lutéine isolée (mesurée dans CDCl_3) en comparant avec les données reportées* (Moss, 1976)*	85
Tableau 19. Déplacement chimique en RMN- ^1H et- ^{13}C de la zéaxanthine isolée (mesuré dans CDCl_3) en comparant avec les données reportées* (Moss, 1976)	87

Abréviations

a_w : activité de l'eau

COSY : correlated spectroscopy

CCM : chromatographie sur couche mince

DMSO : diméthyle sulfoxyde

DCM : dichloromethane

DJA : dose journalière admissible

DBU : amidine ; 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene

HMBC : heteronuclear multiple-bond correlation

HSQC : heteronuclear single quantum correlation

HPLC : chromatographie liquide haute performance

LI : liquide ionique

MAE: extraction assistée par micro-onde

OMe : groupe methoxyle O-CH₃

PF : *perilla frutescens*

RH: relative humidity

RMN : résonance magnétique nucléaire

Rf : Retention factor

SA : *sauropus androgynus*

Sc-CO₂ : CO₂ supercritique

T °C : température

UAE : extraction assistée par ultrasons

UV-vis : ultraviolet visible

λ_{max} : longueur d'onde maximale

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. Généralité sur les pigments et colorants alimentaire.....	4
1.1. Définitions d'un colorant, d'un pigment.....	4
1.2. Rôle de la couleur dans les aliments	4
1.3. Classification des colorants.....	5
1.4. Législation.....	6
2. Colorants naturels.....	7
2.1 Les caroténoïdes.....	8
2.1.1 Introduction aux caroténoïdes	8
2.1.2 Biodisponibilité pour la santé.....	9
2.1.3. Stabilité des caroténoïdes	10
2.1.4. Sources naturelles de caroténoïdes.....	12
2.2 Les anthocyanes	13
2.2.1. Introduction	13
2.2.2. Action antioxydante/ Biodisponibilité pour la santé	14
2.2.3. Stabilité des anthocyanes	17
2.2.4. Sources naturelles des anthocyanes.....	19
3. Techniques d'extraction des pigments naturels	21
3.1. L'extraction solide/liquide	21
3.2. Extraction assistée par micro-ondes et par ultrasons	22
3.2.1. Extraction assistée par micro-ondes	22
3.2.2. Extraction assistée par ultrasons	23
3.3. Les solvants pour éco-extraction.....	24
3.4. <i>Liquide ionique (LI), une nouvelle classe de solvant</i>	26
3.4.1 Structure et propriétés	26
3.4.2. Applications des liquides ioniques comme solvant.....	29
3.4.3 Liquide ionique réversible.....	33
4. Technique d'encapsulation.....	35
4.1. Introduction à la microencapsulation	35
4.2. Encapsulation d'anthocyanes	38
4.3. Les cellules de levure – un matériel potentiel pour l'encapsulation des polyphénols	40

CONCLUSION ET ORIENTATION DE L'ÉTUDE	41
CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES	42
1. Matière première	42
1.1 Lyciet (Goji) – Kỳ tử	42
1.2 Roucou – Điều màu	42
1.3 Rose d'Inde – Cúc vạn thọ.....	43
1.4 Sauropus androgynus (SA) – Rau ngót et Perilla frutescens (PF) – Tía tô.....	44
1.5 Hibiscus – Bụp giấm.....	44
2. Conditions expérimentales	46
2.1. Extraction.....	46
2.2. Encapsulation	46
3. Caractérisation physicochimique des pigments	46
3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	46
3.2 Spectrométrie UV-visible	47
3.3 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) avec détecteur à barrette de diodes (abréviation en anglais : DAD-HPLC)	48
3.4. Méthode spectrophotométrique à différents de pH : Détermination de la teneur totale en monomères d'anthocyanes (Giusti & Wrolstad, 2001).....	49
3.5. Colorimétrie	50
4. Purification et détermination structurale	50
4.1. Chromatographie sur colonne	50
4.2. RMN : résonance magnétique nucléaire	51
CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	55
1. Éco-extraction des pigments naturels.....	55
1.1. Article 1 : Sustainable processes for the extraction of carotenoids from tropical plants	56
1.2. Extraction d'anthocyanes d'hibiscus pour encapsulation	74
2. Purification et détermination structurale des caroténoïdes.....	76
2.1. Bixine.....	76
2.2. Lutéine	80
2.3. Zéaxanthine.....	86
3. Encapsulation d'anthocyanes d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	90
3.1 Article 2 : Encapsulation d'anthocyanes d' <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. comme colorants naturels dans la levure.....	91

3.2. Article 3 : Microencapsulation of Hibiscus Sabdariffa L. calyx anthocyanins with yeast hulls.....	108
CONCLUSION GÉNÉRALE	123
PERPECTIVES.....	126
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	128

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La couleur d'un aliment est importante dans le choix de ce que l'on mange. La couleur est un élément primordial dans notre relation à l'aliment et de ce fait les colorants ont, tout au long de l'histoire, eu un rôle prépondérant dans le monde culinaire, afin de susciter l'envie du consommateur final (Jacquot, Voilley, & Fagot, 2011). La couleur agit sur la psyché et, instinctivement, on préfère les aliments rouges, orange et jaunes, plutôt que verts ou bleus, signe d'amertume ou d'oxydation (Drewnowski, Henderson, & Barratt-Fornell, 2001). Qu'est-ce qui fait la couleur d'un aliment?

Dans la nature, la couleur des aliments est très riche et variée en fonction des pigments présents naturellement en eux. Dans le monde végétal, les principaux pigments proviennent de quatre familles :

- Les caroténoïdes à l'origine de l'orange de la carotte et de la citrouille et du rouge de la tomate, de la pastèque, du gâc.
- Les anthocyanes qui apportent le rouge, le violet, le bleu et le noir de l'aubergine, de l'artichaut violet, du raisin, du riz noir, des mûres, du radis.
- La chlorophylle qui est responsable de la couleur verte des légumes verts, comme les épinards ou les brocolis.
- Les flavonols qui donnent la couleur jaune dans la plupart des légumes et fruits comme les oignons ou l'orange.

Aujourd'hui, il existe un véritable boom pour les pigments d'origine végétale, d'une part car l'on identifie de nombreuses propriétés biologiques très intéressantes et d'autre part, car, suite à des attaques sur des propriétés néfastes pour la santé de colorants artificiels, l'industrie agro-alimentaire et des cosmétiques essaye de remplacer intégralement les composés synthétiques par des composés naturels. Mais, les pigments issus de plantes et particulièrement ceux appartenant aux familles des caroténoïdes et composés phénoliques sont des composés qui sont sensibles à la température, à l'oxydation, au pH etc. En outre, leurs propriétés biologiques ou de couleur sont liées à l'existence d'un système de doubles liaisons conjuguées intact, les procédés d'extraction basés sur le blanchiment thermique, la dégradation des tissus par chauffage et l'extraction à haute température sont à proscrire. Par ailleurs, avec les défis écologiques actuels de la planète, les procédés trop consommateurs d'énergie et polluants sont également à éviter. Il s'agit maintenant d'utiliser et développer des technologies moins consommatrices d'énergie, moins polluantes et permettant de préserver les composés extraits. Parmi les technologies répondant à cette problématique, il existe une

technologie non polluante car permettant de récupérer intégralement le solvant d'extraction : il s'agit de l'extraction par liquides ioniques. Il a été montré que les liquides ioniques peuvent servir à la dissolution des bio-macromolécules tels que la cellulose (Y. Cao et al., 2009), les protéines (Xie, Li, & Zhang, 2005) etc avec efficacité. La cellulose est le principal constituant des cellules végétales, donc l'application des liquides ioniques facilite l'extraction tout en évitant le problème de dégradation des composés intéressants. D'ailleurs, on peut citer également les techniques d'extraction assistée par microondes et ultrasons pour réduire la consommation d'énergie et de solvants. Les effets physiques des assistances sur la matrice végétale induisent une meilleure pénétration du solvant dans les cellules, ce qui améliore ainsi le transfert de masse et augmente le rendement et la cinétique d'extraction.

Une fois l'extraction faite, les pigments naturels doivent être stabilisés et dispersés dans la perspective d'une application agroalimentaire et pharmaceutique. L'encapsulation, une technique très utilisée pour protéger et moduler les fonctionnalités des molécules fragiles, est la réponse pour ces besoins. Dans la dernière décennie, elle a été largement étudiée et utilisée dans de nombreuses applications dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire. A notre UMR Procédés Alimentaires et Microbiologique, les chercheurs ont travaillé sur l'encapsulation de curcumine (A. T.-B. Nguyen, Winckler, Loison, Wache, & Chambin, 2014), de β -carotène (B. N. Pham-Hoang, Romero-Guido, Phan-Thi, & Waché, 2018), de fisétine (de Câmara et al., 2016), de quercétine (B.-N. Pham-Hoang, Winckler, & Waché, 2017), des composés d'arôme (B. N. Pham-hoang, Voilley, & Waché, 2016)...

Cette thèse s'est inscrite dans le cadre de la collaboration entre UMR PAM de Dijon et l'Institut de Chimie des Substances Naturelles de l'Académie des Sciences et de Technologie du Vietnam à Hanoi. Cette collaboration vise à développer des procédés pour utiliser les pigments extraits de plantes Vietnamiennes dans des applications agroalimentaires. L'objectif de cette thèse est de développer des procédés d'extraction dans des conditions douces afin d'éviter la dégradation des pigments et de garder leurs fonctionnalités. On a cherché en particulier à utiliser des techniques « vertes » respectueuses de l'environnement. Ensuite dans le but de protéger et d'apprécier les potentialités d'utilisation des pigments dans des aliments, nous avons travaillé sur l'encapsulation. La compréhension des phénomènes mis en jeu ainsi que l'évaluation de la capacité de protection des composés actifs des capsules sont également abordées.

Le premier chapitre est consacré à une étude bibliographique faisant le point des connaissances générales sur les pigments alimentaires, les pigments naturels, en particulier les

INTRODUCTION GÉNÉRALE

caroténoïdes et les anthocyanes concernant leurs propriétés chimiques, leur stabilité, leur biodisponibilité et leurs sources. Les techniques d'extraction et d'encapsulation sont ensuite abordées. La partie expérimentale décrit ensuite les produits ainsi que les techniques de caractérisation utilisées dans cette étude. Puis les différentes étapes de l'étude sont présentées d'une manière indépendante. Le premier chapitre de résultats porte sur l'extraction des pigments à partir de plantes. La purification des caroténoïdes et l'encapsulation d'anthocyanes fait l'objet des chapitres suivants.

CHAPITRE I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité sur les pigments et colorants alimentaire

1.1. Définitions d'un colorant, d'un pigment

Un colorant ou pigment est un composé qui absorbe sélectivement de l'énergie électromagnétique dans la région du spectre visible ou en UV proche (Jacquot et al., 2011). Des atomes qui se retrouvent dans un état excité regagnent leur état fondamental soit par une réémission de lumière, soit par dissipation d'énergie thermique ou chimique.

Un pigment naturel dans un système biologique est synthétisé et accumulé dans, ou excrété à partir des cellules vivantes (B. S. Hendry, 1996).

Les pigments naturels proviennent de diverses sources telles que les animaux, les plantes ou les minéraux. Ils peuvent être utilisés comme colorants. Pour les obtenir, il est nécessaire d'utiliser des méthodes d'extraction (extraction par solvant, distillation, chromatographie, etc.). En outre, les pigments peuvent également être produits par synthèse chimique. Aujourd'hui, les colorants sont très présents dans l'alimentation, en particulier dans les boissons et les bonbons.

Il existe une distinction entre un colorant et un pigment dans le domaine des colorants. Selon Jacquot et al (2011), un colorant est une substance modifiant la couleur du milieu dans lequel il est introduit et dans laquelle elle est soluble alors qu'un pigment est généralement insoluble. Cependant, le terme « pigments caroténoïdes » est souvent utilisé alors qu'ils se dissolvent dans l'huile et donnent de la couleur. Cette définition technique est différente de la définition biologique selon laquelle les anthocyanes, la chlorophylle, les flavonols, etc sont également des pigments.

1.2. Rôle de la couleur dans les aliments

Dans le domaine alimentaire, de nombreuses contributions se sont intéressées aux phénomènes d'apprentissage du goût, des préférences et des aversions à l'égard des produits. La première caractéristique remarquée d'un aliment est sa couleur. L'aspect d'un repas peut avoir un effet de stimulation ou non de l'appétit ou provoquer du dégoût. Les repas traditionnels dans le monde sont différents. Les bruns et les verts de l'occident, les nuances plus pâles et plus subtiles des plats chinois et les couleurs vives, des composants délicatement sculptés des repas thaï sont des exemples (Hutchings, 2011). En effet, la qualité de la nourriture est d'abord jugée sur la base de la couleur et nous évitons les légumes flétris, les fruits meurtris, la viande pourrie et les aliments trop cuits.

De nombreux tests ont démontré combien la couleur est importante pour notre appréciation de la nourriture. Lorsque les aliments sont colorés de sorte que la couleur et la

saveur correspondent, cela peut également affecter la perception de certaines odeurs ou de certains goûts. Ainsi, on trouvera des associations entre la couleur et le goût telles que : rouge : goût puissant, rose : sucré et doux, jaune : piquant et acide, orangé : poivré et épicé, vert : salé et aigre (Cavassilas, 2012; Robert W. Burnham, 1963).

Aujourd'hui, l'industrie des colorants constitue un secteur capital de la chimie moderne. Depuis quelques décennies, l'industrie alimentaire mondiale utilise une quantité de plus en plus importante de colorants naturels ou artificiels surtout dans les conserves, les confiseries, les boissons, mais aussi dans la charcuterie, les fruits et légumes, les matières grasses (huile, beurre, fromage) et le sucre. Cependant, bien que la couleur des fruits et des légumes puisse varier pendant la saison et que le traitement puisse provoquer une perte de couleur, les fabricants d'aliments doivent assurer l'uniformité de l'apparence du produit d'une semaine à l'autre. Pour le fabricant, la cohérence des couleurs est considérée comme une preuve visuelle de la cohérence absolue du processus de fabrication.

Des couleurs peuvent être ajoutées aux aliments pour plusieurs raisons, ce qui peut être résumé comme suit (B. S. Hendry, 1996) :

- a) Pour renforcer les couleurs déjà présentes dans les aliments mais moins intenses que les attentes du consommateur
- b) Pour assurer l'uniformité lot après lot de la couleur dans les aliments
- c) Pour restaurer l'apparence originale des aliments dont la couleur a été affectée par le traitement
- d) Pour donner de la couleur à certains aliments comme les sucreries, les glaces et les boissons gazeuses, qui seraient autrement incolores

1.3. Classification des colorants

Il y a plusieurs façons de classer les colorants. On peut le faire suivant leur propriété principale qui est leur couleur. On peut le faire également suivant leur nature chimique ce qui permet de faire un rapprochement entre plusieurs colorants (colorants azotés, non azotés). Enfin, une classification suivant l'origine est également reconnue dans la littérature : couleurs synthétiques, couleurs artificielles et couleurs naturelles.

- a) Colorants artificiels : ce sont des colorants qui ne sont pas produits dans la nature et sont produits par synthèse chimique, par exemple : Tartrazine (E102), jaune de quinoléine (E104).
- b) Colorants synthétiques : ce sont des colorants qui sont fabriqués par synthèse chimique de manière à être identiques chimiquement aux colorants présents

dans la nature, par exemple le β -carotène (E160ai), la riboflavine et la canthaxanthine.

- c) Colorants naturels : ce sont des colorants qui proviennent d'un produit naturel, minéral, végétal ou animal. Le marché des additifs alimentaires a une grande variété de colorants naturels tels que les chlorophylles qui donnent la couleur verte (E140), le charbon médicinal végétal qui donne la couleur noire (E153), le paprika (E160c) qui donne la couleur orange, la riboflavine (E101) la couleur jaune.

1.4. Législation

Les colorants alimentaires autorisés en Europe possèdent un code de E100 à E182, avec des dizaines correspondant à leur couleur : 0 pour le jaune ; 1 pour l'orange ; 2 pour le rouge ; 3 pour le bleu ; 4 pour le vert ; 5 pour le brun et noir ; 6 pour le jaune ; l'orange ou le rouge ; 7 pour les colorants minéraux et 8 pour les colorants spéciaux.

La sécurité de tous les colorants alimentaires autorisés dans l'Union européenne (UE) fait l'objet d'une évaluation scientifique rigoureuse, effectuée par les experts scientifiques du groupe ANS (Alimentation, Nutrition, Sécurité) de l'EFSA (European Food Safety Authority) ; leurs résultats sont publics. La France permet une large gamme de couleurs, dont certaines sont d'origine naturelle et sont listées dans le tableau 1. Parmi eux, le β -carotène est disponible à la fois d'origine synthétique (E160ai) ou naturelle (E160aai – β -carotènes extraits de végétaux ; E160aiii – β -carotènes de *Blakeslea trispora* ; E160aiv – β -carotènes d'algues).

Cependant, les conditions d'utilisation sont peut-être différentes entre les pays comme le cas de la tartrazine qui est appelée Yellow 5 aux USA où elle est interdite comme d'ailleurs en Autriche, en Norvège, en Finlande et en Tunisie. Elle est limitée ou déconseillée dans d'autres pays européens mais autorisée en France, en Suisse et en Angleterre.

Un autre indicateur très important dans la législation des additifs alimentaires est la dose journalière admissible (DJA). Elle représente la quantité d'une substance qu'un individu moyen de 60 kg peut théoriquement ingérer quotidiennement, sans risque pour la santé. Elle est normalement exprimée en mg de substance par kg de poids corporel (Kacew & Lee, 2012). Par exemple, L'EFSA a établi une DJA pour la bixine de 6 mg de bixine/kg/jour et une DJA de 0,3 mg de norbixine/kg/jour (European Food Safety & Tard, 2017).

En résumé, l'utilisation des couleurs peut être contrôlée de trois manières distinctes comme suit :

- a) La législation nationale énumère les couleurs qui peuvent être utilisées dans les aliments

- b) L'utilisation de la couleur dans un pays est limitée par le type de nourriture qui peut être coloré
- c) La quantité maximale de couleur pouvant être ajoutée à un aliment peut également être spécifiée

Tableau 1. Quelques colorants naturels sont totalement autorisés en France

Loi N°	Nom	Famille
E100	Curcumine	Colorants Jaune
E101i	Riboflavine	Colorants Jaune
E120	Cochenille	Colorants Rouge
E140	Chlorophylle	Colorants Vert
E141	Complexes-cuivre-chlorophylle	Colorants Vert
E150a	Caramel	Colorants Brun
E153	Charbon végétal	Colorants Brun
E160a	Provitamine A	Colorants Orange
E160c	Paprika	Colorants Orange
E160d	Lycopène	Colorants Orange
E160e	Apocaroténal	Colorants Rouge
E161	Xanthophylle	Colorants Jaune
E161b	Lutéine	Colorants Jaune
E162	Rouge de Betterave	Colorants Rouge
E163	Anthocyanes	Colorants Rouge
E172	Oxydes de fer	Colorants Diverses
E181	Tanins	Colorants Rouge

2. Colorants naturels

Les colorants alimentaires naturels sont importants pour notre bien-être. Ils n'ont pas que des propriétés colorantes mais aussi des propriétés biochimiques. Ils donnent des précurseurs de vitamines telles que vitamine A, B1, B2, K1, K2 que nous ne pouvons pas synthétiser (B. S. Hendry, 1996). Par conséquent, pour l'homme, ils peuvent aussi apporter une valeur en termes biologiques. Les colorants artificiels ne possèdent aucune fonction biologique utile.

2.1 Les caroténoïdes

2.1.1 Introduction aux caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules hydrophobes appartenant à la famille des terpènes. Ils sont des composés à structure hydrocarbonée, sont dérivés de tétraterpène, comprenant généralement 40 atomes de carbone avec un squelette carboné construit à partir de huit unités isoprènes (figure 1).

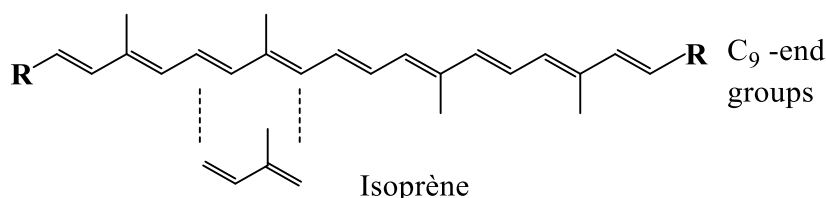


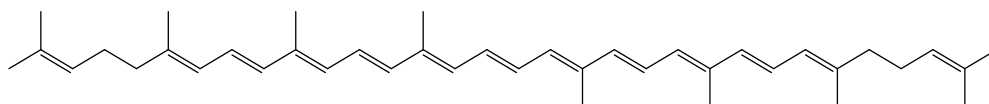
Figure 1. Isoprène et squelette carboné de caroténoïdes

Les caroténoïdes se classent dans 2 groupes : les hydrocarbures caroténoïdes sont appelés carotènes et les dérivés contenant des fonctions oxygénées (les plus souvent des groupes hydroxy, céto, époxy, méthoxy ou acide carboxylique) sont appelés xanthophylles (figure 2). En général, les caroténoïdes sont pratiquement insolubles dans l'eau mais assez bien solubles dans les lipides (Cao-Hoang, Phan-Thi, Osorio-Puentes, & Waché, 2011).

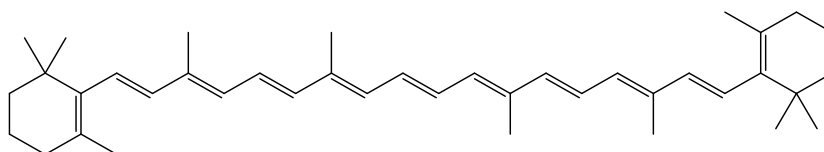
La couleur est l'élément caractéristique des caroténoïdes, elle est plutôt jaune, orange et rouge. Ces molécules possèdent cette gamme de couleur grâce à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et ainsi leur absorbance à large bande centrée autour de 450 nm (Junghans, Sies, & Stahl, 2001).

Aujourd'hui, plus de 600 caroténoïdes ont été isolés à partir de produits naturels mais seulement une vingtaine est détectable dans les tissus ou le sérum humain. Le terme caroténoïde recouvre deux classes de composés voisins, d'une part les hydrocarbures non oxygénés, les carotènes et d'autre part leurs dérivés oxygénés, les xanthophylles (Faure et al., 1999; Rodríguez-Bernaldo de Quirós & Costa, 2006).

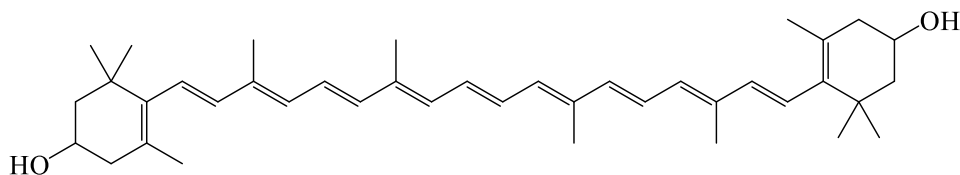
(a) Lycopène



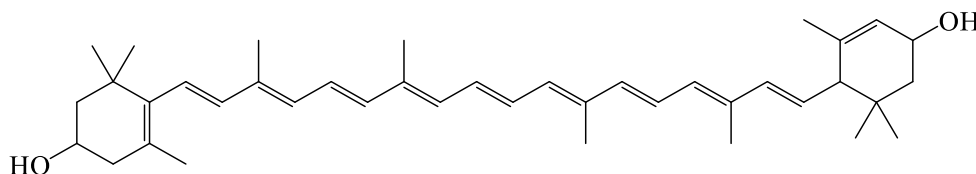
(b) β -carotène



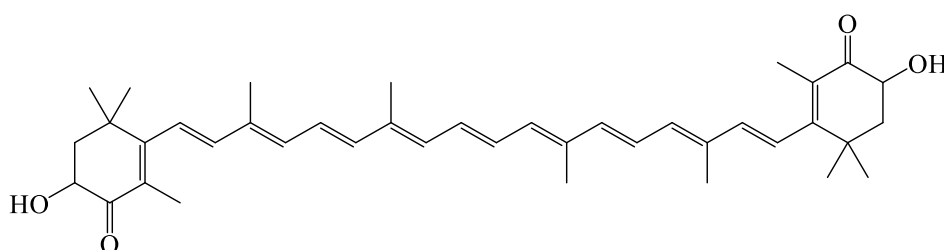
(c) Zéaxanthine



(d) Lutéine



(f) Astaxanthine

**Figure 2.** Structure chimique de quelques carotènes (a, b) et xanthophylles (c, d, f)

2.1.2 Biodisponibilité pour la santé

Dans l'alimentation, les caroténoïdes sont d'abord connus pour la convertibilité de certains d'entre eux en vitamine A, qui est importante pour la croissance et le développement des tissus épithéliaux des yeux et ainsi pour le maintien du système immunitaire. Près de 10% des caroténoïdes, parmi eux l' α -carotène, la cryptoxanthine et le β -carotène sont des précurseurs de la vitamine A (Yahia & Ornelas-Paz, 2009). Ces caroténoïdes sont convertis enzymatiquement dans l'intestin en deux molécules de rétinol et sont en général la principale source de vitamine A (Olson, 1989). Les caroténoïdes sont également de puissants antioxydants capables de protéger les cellules vivantes contre les attaques des radicaux libres, les dommages oxydatifs à la lumière UV et d'exercer ainsi une action préventive contre un certain nombre de maladies dégénératives. Les niveaux plasmatiques de caroténoïdes sont corrélés négativement avec les niveaux d'isoprostanes qui sont suspectés de contribuer à un risque accru de crise cardiaque (Block et al., 2002). Les niveaux de caroténoïdes sont inversement associés au vieillissement de la peau (Schagen, Zampeli, Makrantonaki, & Zouboulis, 2012), l'athérosclérose (Klipstein-Grobusch et al., 2000), les maladies cardiovasculaires (Linnewiel-Hermoni, Paran, & Wolak, 2016), la sarcopénie (Semba et al.,

2003) et la mortalité (Hu et al., 2004). Certaines études montrent qu'ils contribuent au renforcement des communications intercellulaires, ce qui pourrait expliquer qu'ils peuvent ralentir le développement de tumeurs cancéreuses (Faure et al., 1999; Puah, Choo, Ma, & Chuah, 2005). L'association entre les faibles niveaux sériques de β -carotène et le risque accru de mortalité a récemment été rapportée (Hu et al., 2004).

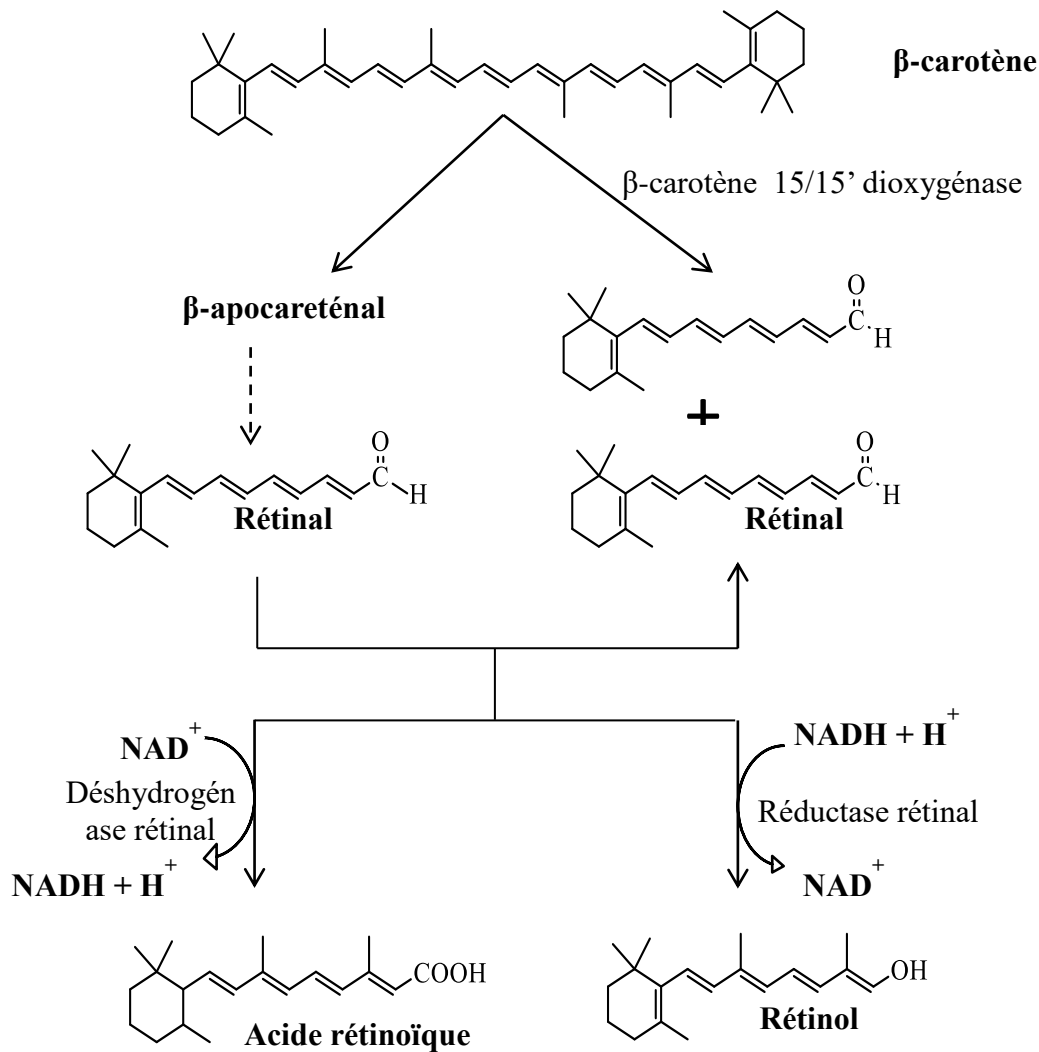


Figure 3. Schéma simplifié de la bioconversion du β -carotène en vitamine A (Yahia & Ornelas-Paz, 2009)

2.1.3. Stabilité des caroténoïdes

La chaîne de polyène conjugué qui caractérise les caroténoïdes rend également ces composés sensibles à la dégradation par un certain nombre d'agents tels que la chaleur, la lumière, l'oxygène, la présence de certaines enzymes, etc (Boon, McClements, Weiss, & A Decker, 2010; Yahia & Ornelas-Paz, 2009). L'isomérisation et l'oxydation, qui peuvent avoir

lieu pendant le traitement et le stockage, entraînent une perte de couleur et d'activité biologique et la formation de composés volatils qui confèrent une saveur souhaitable ou indésirable à certains aliments.

Une séquence de dégradation du caroténoïde dans le jus de la pomme de cajou sur la base des produits trouvés lors du chauffage à 90 °C pendant jusqu'à 2 heures a été proposée et réalisée (Zepka, Garruti, Sampaio, Mercadante, & Da Silva, 2014). La concentration des caroténoïdes totaux dans le modèle de jus de pomme de cajou non cuit a diminué de 107 à 78,9 µg/mL après 2 h de chauffage à 90 °C. En raison de la dégradation thermique des caroténoïdes, des produits volatils sont formés tels que le p-xylène et le naphthalène, le 1,2,3- et le 1,3,5-triméthylbenzène. Les scientifiques ont également souligné que la dégradation de la bixine et du lycopène peuvent se produire à des températures supérieures à 100 °C, et un temps de chauffage plus long entraîne un pourcentage plus élevé de dégradation (B. S. Hendry, 1996; Phan-Thi & Waché, 2014; Rios, Borsarelli, & Mercadante, 2005; J. Shi, Le Maguer, Bryan, & Kakuda, 2003). Shi et al (2003) ont également exposé la purée de tomate à de la lumière visible (400-700 nm) à 25 °C. La perte de lycopène total et la concentration de *cis*-isomères étaient plus importantes par irradiation par la lumière que par traitement thermique, suggérant que l'irradiation à la lumière était plus destructrice que le chauffage, en termes de dégradation du lycopène.

Par rapport à l'effet de la température et de la lumière, la présence d'oxygène a été décrite comme plus destructive (Boon et al., 2010). La réaction des caroténoïdes avec de l'oxygène atmosphérique a été observée comme étant assez rapide, en particulier dans les systèmes constitués de caroténoïdes purifiés dans des solvants organiques. L'auto-oxydation du β-carotène dans le benzène ou le tétrachlorométhane à l'obscurité à 30 °C sous une atmosphère d'oxygène ou en faisant barboter de l'oxygène à travers le solvant a été observée avec une période d'induction de moins d'une heure, suivie d'une production rapide de produits d'oxydation. Dans ces conditions, le β-carotène a été complètement consommé dans les 30 heures (Boon et al., 2010). Cette dégradation d'auto-oxydation est fortement accélérée et augmentée si, au lieu d'être initiée par de l'oxygène, elle l'est par des espèces plus réactives de l'oxygène. Ceci est à l'origine d'un test de capacité antioxydante mais c'est également un sujet qui a fait l'objet de nombreuses recherches au laboratoire de Biotechnologie/UMR PAM de Dijon dans le but de comprendre la dégradation oxydative du carotène ou d'autres caroténoïdes (Aurélien Bossier, Papolreay, & Belin, 1995; Waché, Bossier-DeRatuld, Lhuguenot, & Belin, 2003), en fonction de l'environnement physicochimique (Waché, Bossier-De Ratuld, & Belin, 2006; Waché, Bossier-DeRatuld, Ly, & Belin, 2002) et de proposer des procédés

biotechnologiques de production de composés de dégradation des caroténoïdes (Aurelie Bosser & Marc Belin, 1994; Huong Ly, Cao Hoang, Belin, & Waché, 2008).

2.1.4. Sources naturelles de caroténoïdes

Les caroténoïdes sont non seulement synthétisés par des organismes photosynthétiques comme des bactéries anoxygéniques, des cyanobactérie (procaryotes), des algues et par certaines plantes (eucaryotes) mais aussi par des organismes non photosynthétiques comme certaines bactéries et champignons (Goodwin, 1980).









Chez les plantes, les caroténoïdes sont clairement visibles par la couleur qu'ils donnent aux fruits (tomates), fleurs (marigold/rose d'Inde) et racines (carotte). Ils sont également présents dans les tissus verts de certaines feuilles mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle dont la dégradation en automne dévoile l'existence des pigments de caroténoïdes (Cao-Hoang & Waché, 2009).

Chez les animaux, les caroténoïdes ne peuvent pas être synthétisés. Leur rôle dans la couleur de certains crustacés, insectes, poissons, et oiseaux résulte d'une absorption alimentaire (Goodwin, 1980).

Certaines plantes originaires du Sud-Est Asiatique sont très riches en caroténoïdes. D'après l'Institut de Nutrition du Vietnam, le Gac est le fruit le plus riche en β -carotène et lycopène, la feuille de « bo ngot » est la plus intéressante parmi les feuilles riches en caroténoïdes qui comprennent aussi le « tia to », le « den com », la corète potagère et le « kinh gioi » (tableau 2).

En outre, certaines études récentes ont montré que les caroténoïdes se trouvent aussi dans plusieurs autres fruits et graines comme le « ky tu » (*Lycium pallidum*) (Nguyen-Thi, Hoang-Thi, & Nguyen-Quyet, 2007) ou le « dieu mau » (*Bixa Orellana .L*) (Le-Anh, Dinh-Nga, & Phan- Thi, 2008)

Tableau 2. Végétaux riches en β -carotène au Vietnam (Trung tâm dinh dưỡng, 2001)

Fruits, légumes et autres végétaux	Nom scientifique	Teneur de β -carotène ($\mu\text{g}/100\text{ g}$ aliment)
Gác 	<i>Momordica cochinchinensis</i> (Lour.) Spreng	52520
Rau Ngót 	<i>Sauropus androgynus</i>	6650
Tía tô Basilic japonais 	<i>Perilla frutescens</i> Britt	5520
Dền cơm Amarante 	<i>Amaranthus viridis</i>	5300
Cà rốt Carotte 	<i>Daucus carota</i>	5040
Cần tây Céleri 	<i>Apium graveolens</i>	5000
Rau đay Corète potagère 	<i>Corchorus olitorius</i> L.	4560
Kinh giới marjolaine douce 	<i>Elsholtzia cristata</i>	4360

2.2 Les anthocyanes

2.2.1. Introduction

Les anthocyanes qui constituent le groupe le plus important de colorants visibles à l'œil humain, sont des pigments qui colorent les plantes en bleu, rouge, mauve, rose ou orange (Delgado-Vargas, Jiménez, & Paredes-López, 2000). Chimiquement, les anthocyanes sont des flavonoïdes, par conséquent ces structures présentent un squelette de $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$. Pourtant, elles diffèrent des autres flavonoïdes naturels en absorbant fortement la lumière visible. La gamme de couleurs associées aux anthocyanes résulte de leur capacité à former des structures de résonance, à partir d'une substitution distincte et variée du noyau parent $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$, et de divers facteurs environnementaux (B. S. Hendry, 1996). L'aglycone de l'anthocyane, le noyau $\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$, est appelé cation flavylum ou 2-phényl-1-benzopyrilium (figure 4).

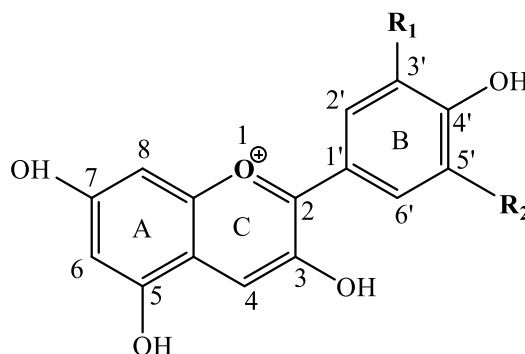


Figure 4. Structure du cation flavylium ou 2-phényl-1benzopyrilium, la structure de base des anthocyanes

À l'exception des formes 3-désoxy, les anthocyanidines sont relativement instables et se retrouvent rarement sous forme libre dans les tissus végétaux (Harborne, 1967). Les anthocyanes sont des glycosides de dix-huit anthocyanidines naturelles différentes et dont les plus courantes sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3. Principales anthocyanidines rencontrés chez les végétaux

Anthocyanidine	R1	R2	Couleur à pH 1	Numéro E
Delphinidine	OH	OH	Bleu, violet	E163b
Cyanidine	OH	H	Rouge	E163a
Pelargonidine	H	H	Orange	E163d
Petunidine	OCH ₃	OH	Bleu, pourpre	E163f
Peonidine	OCH ₃	H	Rose-rouge	E163e
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃	Pourpre	E163c

R1 et R2 correspondent aux groupes représentés figure 4.

2.2.2. Action antioxydante/ Biodisponibilité pour la santé

Les composés qui sont les plus faciles à oxyder sont souvent les meilleurs antioxydants (molécules qui peuvent donner un électron libre ou des atomes d'hydrogène à des radicaux libres réactifs). Les anthocyanes ont une activité antioxydante grâce à leurs aglycones. Comme tous les polyphénols, elles possèdent des groupes hydroxyles phénoliques pouvant fournir aux radicaux libres des H capables de les neutraliser. Plusieurs études ont suggéré que le contenu anthocyanique et leur activité antioxydante correspondante contribuent aux effets protecteurs des fruits et des légumes contre les maladies dégénératives et chroniques (tableau 4).

Tableau 4. Rôle protecteur des anthocyanes dans la santé humaine

Source	Anthocyanes principales	Effet	Références
Framboise <i>Rubus idaeus</i> <i>Rubus occidentalis</i>	Cyanidin-3-O-sophoroside Cyanidin-3-O- (2G-O-glucosyl) rutinoside Cyanidin-3-O-glucoside Cyanidin-3-O-rutinoside.	Anti-inflammatoire,	(Li et al., 2014; Teng et al., 2017)
Mûre <i>Morus alba L.</i>	Cyanidin-3-glucoside chloride Cyanidin-3-rutinoside chloride Pelargonidin-3-glucoside	Anti-diabète, contre le stress oxydatif	(Lee et al., 2014; F. Yan & Zheng, 2017)
Cornouiller sauvage <i>Cornus mas</i>	Cyanidine 3-O-galactoside Pelargonidine 3-O-galactoside Delphinidine	Anti-diabète, anti-obésité	(Jayaprakasam, Olson, E Schutzki, Tai, & Nair, 2006)
Hibiscus <i>Hibiscus sabdariffa</i>	Delphinidin 3-sambubioside Cyanidin 3-sambubioside Cyanidin 3-glucoside Delphinidin 3-glucoside	Contre le cancer du sein, antihypertenseur, anti-obésité	(Ojeda et al., 2010; Patel, 2014; C.-H. Wu et al., 2016)
Raisin	Malvidine-3-O-glucoside	Cardioprotecteur,	(Karthikeyan, Bai, & Devaraj, 2007;

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<i>Vitis vinifera</i> L.	Pétunidine-3-O-glucoside Cyanidine-3-O-glucoside Delphinidine-3-O-glucoside paeonidine-3-O-glucoside	contre le stress oxydatif.	Leong, Burritt, & Oey, 2016)
Cyanidin-3-O- b – glucoside	Standard C3G	Anti-inflammatoire, contre la maladie d'Alzheimer	(L. Qin, Zhang, & Qin, 2013; X. Yan et al., 2015)
Myrtille <i>Vaccinium angustifolium</i>	Peonidine-3-glucoside Malvidin-3-galactoside Delphinidine-3-glucoside Delphinidin-3-galactoside	Anti-inflammatoire, réduit le risque de maladie cardiovasculaire, contre le stress oxydatif.	(Liang et al., 2013; Riso et al., 2013)
Riz noir <i>Oryza sativa</i> L.	Cyanidine-3-O-glucoside Peonidine-3-O-glucoside chloride	Réduit le stress oxydatif, augmente l'adaptabilité de l'activité des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT)	(Chiang et al., 2006; Walter et al., 2013)

2.2.3. Stabilité des anthocyanes

Comme la plupart des colorants naturels, les anthocyanes souffrent d'instabilité inhérente. Ils sont plus stables dans des conditions acides. Ils peuvent se dégrader de nombreuses manières, allant de la perte de couleur à une prise de couleur brun. Les principaux facteurs influençant la stabilité des anthocyanes sont le pH, la température et la présence d'oxygène et de lumière, mais la dégradation enzymatique et les interactions avec des composants alimentaires (par exemple l'acide ascorbique, les ions métalliques, les sucres, les copigments) ne sont pas moins importantes.

Effet du pH

La présence de l'ion oxonium adjacent à la position C-2 dans les anthocyanes est responsable de leur nature amphotère caractéristique. Ainsi, les anthocyanes non et monoacylés se conduisent pour la plus part d'entre elles comme des indicateurs de pH, existant soit comme un acide, soit comme une base selon le pH. Les transformations structurales des anthocyanes en fonction du pH sont fondamentales pour leur couleur et leur stabilité. Les solutions contenant des anthocyanes présentent généralement leur coloration rouge la plus intense à pH acide (par exemple < pH 3). Avec un pH croissant, les extraits contenant des anthocyanes s'estompent normalement au point où ils peuvent sembler incolores (pH 4.5) avant de se transformer finalement en violet ou en bleu à pH > 6. En fonction du pH, en milieu aqueux, quatre formes coexistent (figure 5) (Jackman & Smith, 1996).

- le cation flavylium AH⁺ (1), de couleur rouge
- les bases quinoniques A (2 ; 2' ; 3 ; 3') de couleur bleu-mauve
- les pseudobases ou bases carbinols B (4 ; 5) sont incolores
- les chalcones C *cis* 6 et *trans* 6', de couleur jaune clair.

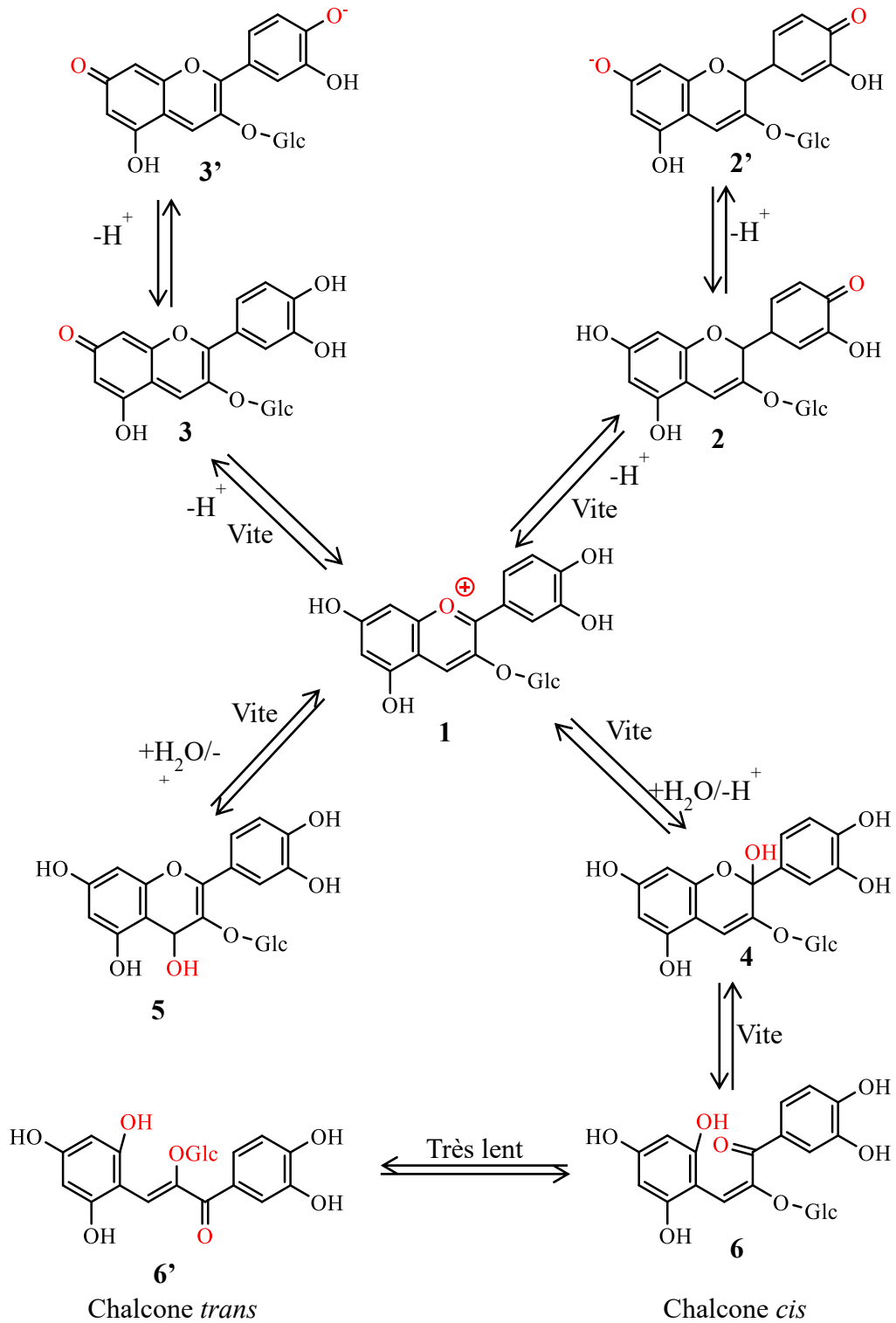


Figure 5. Transformations structurales des anthocyanes en solution aqueuse acide représentées dans le cas du cyanidin-3 glucoside

Effet de la température

Comme pour la plupart des réactions chimiques, la stabilité des anthocyanes et la vitesse de leur dégradation sont fortement influencées par la température.

La déprotonation du cation flavylium par solvant ($AH^+ \rightarrow A \rightarrow A^-$) est exothermique, tandis que l'hydratation cationique ($AH^+ \rightarrow AOH = B$) et l'ouverture du cycle pyrylium ($B \rightarrow C_E$) sont endothermiques et associées à des changements d'entropie positifs (Jackman & Smith, 1996). Ainsi, à moins que des caractéristiques structurelles ou d'autres facteurs ne réussissent à inverser l'équilibre vers la formation du cation flavylium ou de la base quinonoïdale, la formation de chalcone est favorisée par l'augmentation de la température (à savoir pendant l'entreposage et le traitement) au détriment des espèces quinonoïdale, flavylique et hémiacétal.

Effet de la lumière

Les anthocyanes sont généralement instables lorsqu'elles sont exposées aux UV ou à la lumière visible ou à d'autres sources de rayonnements ionisants. Les anthocyanes substitués au groupe hydroxyle en C-5, connues pour être fluorescentes, sont plus sensibles à la décomposition photochimique que celles non substituées à cette position. La copigmentation peut accélérer ou retarder la décomposition en fonction de la nature du copigment. La lumière provoque une augmentation des taux auxquels les anthocyanés subissent une dégradation thermique, via la formation d'un état excité par un cation flavylium. La photo-oxydation des anthocyanes produit les mêmes produits que la dégradation thermique, ce par quoi un adduit C-4-hydroxy sert d'intermédiaire qui subit lui-même une hydrolyse en position C-2 et une ouverture de cycle consécutive pour donner de la chalcone. La chalcone subit ensuite une dégradation supplémentaire par rapport aux produits de dégradation d'anthocyanes usuels, par ex. 2,4,6-trihydroxybenzaldéhyde et des acides benzoïques substitués.

2.2.4. Sources naturelles des anthocyanes

Contrairement aux caroténoïdes, qui peuvent être trouvés dans les plantes et les animaux, tels que l'astaxanthine dans la viande et les coquilles de crevettes, les anthocyanes sont trouvés uniquement dans les plantes et les champignons. À ce jour, environ 700 anthocyanes structurellement différentes ont été identifiées dans la nature et le nombre augmente constamment (Gowd, Jia, & Chen, 2017).

Les plus souvent rencontrés sont les glycosides de la cyanidine, de la malvidine, de la delphinidine, de la pelargonidine, de la peonidine et de la pétunidine. Environ 2% de tous les hydrocarbures fixés dans la photosynthèse sont transformés en flavonoïdes et leurs dérivés,

tels que les anthocyanes. Ils peuvent être localisés dans divers types de tissus végétaux comme ceux des fruits (raisin, framboire, mûre, fraise, cassis,...), des légumes (chou violette, aubergine,...), des racines (radis, betteraves rouges,...), des feuilles (feuilles de maïs violet, feuilles de cassis,...), des fleurs (*Hibiscus*, artichaut,...) ou dans des céréales (riz noir, maïs violet,...). Ils sont également présents dans les tissus verts de certaines feuilles mais leur couleur est masquée par celle de la chlorophylle dont la dégradation en automne dévoile l'existence de pigments d'anthocyanes.

Certains fruits contiennent seulement une ou deux anthocyanes tandis que d'autres, comme les raisins Concord, en ont au moins 15 (Muñoz-Espada, Wood, Bordelon, & Watkins, 2004). Tableau 5 présentant quelques fruits et végétaux vraiment riches en anthocyanes.

Tableau 5. Sources naturelles d'anthocyanes

Appellation	Nom scientifique	Teneur en anthocyanes mg/g	Références
Hoa Búp Giấm Roselle	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	58,60 (matière sèche)	(Sindi, Marshall, & Morgan, 2014)
Tía tô Basilic japonais	<i>Perilla frutescens</i> (L.)	0,7-1,8 (matière sèche)	(Meng, Lozano, Bombarda, Gaydou, & Li, 2009)
Lá cẩm tím	<i>Peristrophe bivalvis</i> (Purple)	0,021-0,146 (matière sèche)	(Quan et al., 2016)
Hoa đậu biếc Fleur de pois bleu	<i>Clitoria ternatea</i>	0,74	(Siti Azima, Noriham, & Manshoor, 2017)
Framboise noire	<i>Rubus occidentalis</i>	34,65 (matière sèche)	(Wada & Ou, 2002)
Raisin « Norton »	<i>Vitis aestivalis</i>	8,90	(Muñoz-Espada et al., 2004)
Myrtille	<i>Vaccinium corymbosum</i>	3,86	(X. Wu et al., 2006)
Mûre (mulberry) coréenne	<i>Morus alba L.</i>	0,13-2,06	(Bae & Suh, 2007)
Aubergine	<i>Solanum melongena L.</i>	1,19-1,2	(Dranca & Oroian, 2016)
Cassis	<i>Ribes nigrum</i>	5,33	(X. Wu et al., 2006)
Pomme rouge		0,17	(X. Wu et al., 2006)
Fraise	<i>Rosaceae</i>	0,35	(X. Wu et al., 2006)

3. Techniques d'extraction des pigments naturels

3.1. L'extraction solide/liquide

L'extraction des végétaux est une extraction solide/liquide visant à extraire certains constituants présents dans les plantes, éventuellement suivie d'étapes de purification. Elle est réalisée, en principe, par contact d'un solide (le végétal) avec un liquide et la séparation grâce au liquide d'un ou plusieurs composés solubles, « les solutés », contenus dans un matériau solide insoluble. Le liquide d'extraction est appelé « solvant ». Le transfert du soluté dans le solvant nécessite un certain temps afin d'être complet, et il est essentiel de déterminer la vitesse globale du phénomène, c'est-à-dire la vitesse d'extraction. Cette vitesse est régie par trois processus élémentaires de l'échange de matière : la dissolution du soluté dans les particules par le solvant, ainsi que la diffusion de l'extrait (solvant + solutés) vers l'extérieur de la particule et la diffusion du soluté intégré dans l'extrait au contact du solide à destination de la masse restante du solvant. La séparation des solutés désirés est basée sur la différence de leur affinité pour le solvant utilisé et du gradient de concentration. Un solvant d'extraction est caractérisé par différentes propriétés ; il doit posséder une grande capacité de dissolution, une température d'ébullition peu élevée, une faible viscosité et être, si possible, non toxique, ininflammable et non explosif. Un bon solvant, sélectif et volatil, fournit des solutions riches en soluté désiré tout en réduisant les opérations d'évaporation et de purification. Le choix d'un solvant à faible viscosité et de masse volumique peu élevée est recommandé pour faciliter la diffusion du solvant, l'agitation et la séparation mécanique. En général, les facteurs intervenant dans l'extraction sont liés à l'état du solide et du soluté, à la nature du solvant, à la température, au degré d'agitation des phases, à la concentration résiduaire en soluté sur le solide.

Dans les procédés industriels alimentaires/pharmaceutiques, les procédés d'extraction requièrent souvent 70% des investissements et consomment 50% de l'énergie. Les solvants les plus utilisés à l'heure actuelle sont l'hexane, le cyclohexane, le méthanol, le dichlorométhane et l'acétone. Cependant, les solvants organiques, pour bon nombre d'entre eux, sont inflammables, très volatils et toxiques (cancérogènes, mutagènes, etc.). Tout cela est de plus en plus montré du doigt pour cause de contribution à la pollution environnementale. Pour résoudre ces problèmes, de nombreuses solutions ont été proposées telles que l'extraction avec une assistance ou un changement de solvant classique toxique par les solvants vert, les fluides supercritiques, les liquides ioniques, etc. Dans ce nouveau contexte, le terme « **éco-extraction** » a été élaboré.

« L'éco-extraction est basée sur la découverte et la conception de procédés d'extraction permettant de réduire la consommation énergétique, mais aussi l'utilisation de solvants alternatifs et des ressources végétales renouvelables, tout en garantissant un produit/extrait sûr et de qualité ». Elle est basée sur 6 principes (Farid Chemat, 2011):

- favoriser l'innovation par la sélection variétale et l'utilisation de ressources végétales renouvelables.
- privilégier les solvants alternatifs et principalement ceux issus des agro-ressources.
- réduire la consommation énergétique par l'assistance des technologies innovantes et favoriser la récupération d'énergie.
- favoriser la création de coproduit au lieu de déchets pour intégrer la voie de la bio- ou agro-raffinerie.
- réduire les opérations unitaires grâce à l'innovation technologique et favoriser les procédés sûrs, robustes et contrôlés.
- privilégier un produit non dénaturé, biodégradable, sans contaminants et surtout porteur de valeurs : « éco-extrait ».

3.2. Extraction assistée par micro-ondes et par ultrasons

3.2.1. Extraction assistée par micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques qui se situent dans le spectre électromagnétique dans la gamme de fréquence 300 MHz à 300 GHz, entre les ondes radio et l'infrarouge. Les ondes électromagnétiques sont la résultante d'un champ électrique E et d'un champ magnétique H perpendiculaire entre eux et à la direction de propagation. Les amplitudes des champs varient de façon sinusoïdale au cours du temps et donc de la propagation.

L'extraction assistée par micro-ondes est une méthode simple, efficace utilisant moins de temps et de solvant. Cependant les inconvénients de cette technique sont d'une part le rendement faible lorsque les solutés ou les solvants sont apolaires et d'autre part la température opératoire qui est relativement haute. A l'inverse des techniques classiques de chauffage par conduction ou convection, l'utilisation des micro-ondes implique une interaction directe entre un rayonnement électromagnétique et la matière. Le mécanisme du chauffage micro-ondes est basé sur la rotation dipolaire des molécules polaires (qui possèdent des extrémités positives et négatives) sous l'effet d'un champ électrique alternatif. Le chauffage à l'aide de micro-ondes d'un produit résulte ainsi de la conversion en chaleur de l'énergie d'une onde électromagnétique dans le matériau. Ce transfert d'énergie particulier

implique un transfert de matière, lui aussi spécifique, dont les mécanismes diffèrent sensiblement de ceux de l'extraction solide-liquide traditionnelle.

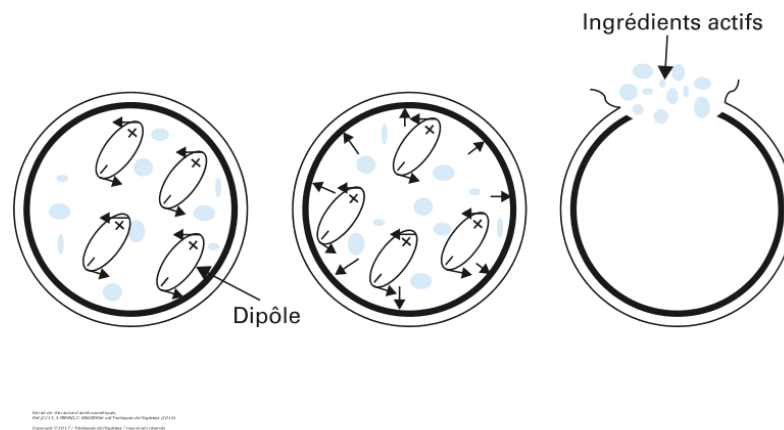


Figure 6. Mécanisme de l'extraction assistée par micro-ondes (Perino, Makerri, Abert-Vian, & Chemat, 2016)

3.2.2. Extraction assistée par ultrasons

Les ultrasons sont des ondes mécaniques capables de se déplacer dans un milieu élastique à une fréquence supérieure à la limite maximale d'audibilité de l'oreille humaine (16 kHz). Pour l'extraction des molécules des plantes, une puissance d'ultrasons à une intensité entre 20 et 100 kHz est souvent utilisée.

L'extraction assistée par ultrasons (UAE) est une méthode simple en manipulation et traitement, efficace et peu coûteuse. Grâce aux ultrasons, les extractions complètes peuvent maintenant être réalisées en quelques minutes avec un rendement élevé, réduisant la consommation de solvant et d'énergie, donnant une plus grande pureté du produit final par rapport à une extraction classique. L'UAE permet aussi de travailler à des températures relativement basses et d'éviter la thermodestruction des composés. Quand les cycles de raréfaction augmentent, les forces maintenant la cohésion du liquide sont vaincues et des bulles de cavitation apparaissent. Ce phénomène est appelé cavitation. Comme représenté sur la figure 7, une bulle de cavitation peut être générée près de la surface de la plante (a), puis pendant un cycle de compression, cet effondrement de bulle (b) et un microjet dirigé vers la matrice végétale est créé (b et c). La haute pression et la température impliquées dans ce processus vont détruire les parois cellulaires de la matrice végétale et son contenu peut être libéré dans le milieu (d) (Farid Chemat, Zill e, & Khan, 2011).

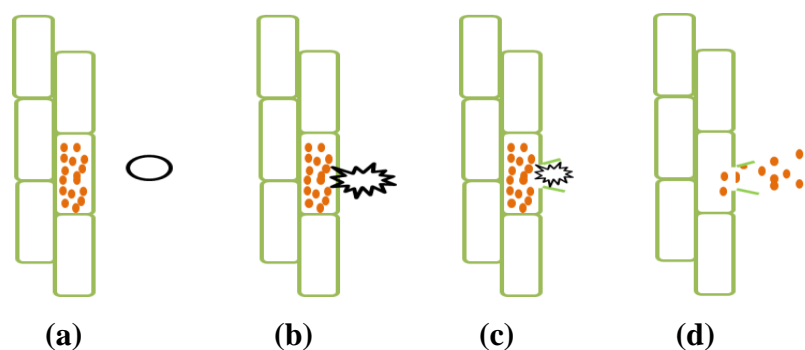


Figure 7. Effondrement de bulles de cavitation et libération de matériel végétal. Voir dans le texte pour le détail des explications.

3.3. Les solvants pour éco-extraction

Dans une démarche d'éco-extraction, un solvant « vert », en référence à la chimie verte, ne doit pas être seulement efficace mais doit aussi posséder, des caractéristiques complémentaires liées à la sécurité et à l'impact environnemental. Le solvant « vert » le plus connu actuellement est l'éthanol, obtenu par fermentation de matières riches en sucres comme la betterave et les céréales. L'eau est aussi un solvant idéal, recyclable, non toxique et disponible. Elle est très largement utilisée dans l'extraction par distillation à la vapeur. En plus, le CO₂ supercritique (sc-CO₂), qui n'est ni toxique à proprement parler, ni inflammable et naturellement abondant, et les liquides ioniques, qui sont thermiquement très stables, non inflammables (voire le chapitre 3.5), ont été proposés également.

La technique d'extraction au sc-CO₂ permet de travailler à une température modérée qui ne dénature pas les qualités organoleptiques et les principes actifs de l'extrait obtenu. A la fin de l'extraction, par abaissement de la pression, on provoque le passage du gaz carbonique de l'état supercritique à l'état gazeux et le CO₂ s'élimine d'extrait sous pression atmosphérique. Cela permet d'obtenir des produits purs exempts de toutes traces de solvant. Cette technique est efficace (rendement élevé, temps réduit) et respectueuse de l'environnement et de la santé (pas de solvant organique, solvant recyclable). Ses limitations sont liées à un système complexe, une mise au point difficile et le coût initial du matériel (Ooi & Heng, 2018 *in press*).

Une classification des solvants d'extraction par Farid Chemat est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6. Classification des solvants d'extraction (Farid Chemat, 2011)

Solvant d'extraction	Technique d'extraction	Pouvoir solvant vis-à-vis de composés			Sécurité & Santé	Coût	Impact environnemental
		Polaire	Peu polaire	Apolaire			
Sans solvant	Hydro-diffusion par micro-ondes et gravité (<i>extraction d'huiles essentielles</i>)				+++	+	+++
Eau	Entraînement à la vapeur d'eau (<i>extraction d'huiles essentielles</i>)	++	+		+	++	+
	Distillation assistée par micro-ondes (<i>extraction d'huiles essentielles</i>)	+++	+++	+	+	+	++
	Extraction par eau sub-critique (<i>extraction d'arômes</i>)	+	++		+	+	+
CO ₂	Extraction par CO ₂ supercritique (<i>décaféination du thé et café</i>)	-	+	+++	+	+	+
Liquides ioniques	Sel d'ammonium (<i>extraction de l'artémisinine</i>)	-	+	+++	-	-	++
Agrosolvants	Ethanol en substitution au méthanol (<i>colorants</i>)	+	+	-	-	++	+
	Glycérol en substitution au méthanol (<i>polyphénols</i>)	+	+	-	-	+	+
	Terpènes (d-limonène) en substitution à l'hexane (<i>matières grasses et huiles</i>)	-	+	++	-	+	+
Solvants pétrochimiques	Hexane (<i>extraction de matières grasses et huiles</i>)	-	-	+++	---	++	---

3. 4. *Liquide ionique (LI), une nouvelle classe de solvant*

Les liquides ioniques sont des sels possédant une température de fusion inférieure à 100 °C et sont donc liquides à des températures plus basses que les autres sels. Ils sont initialement dérivés des sels fondus à haute température ambiante et stables à l'air. Les études sur ces liquides particuliers ont débuté dans les années 1960, notamment à l'Air Force Académie (Wilkes, 2002). Cela s'explique par le fait qu'une des propriétés les plus intéressantes des liquides ioniques réside dans leur tension de vapeur négligeable, permettant une récupération aisée des produits finaux par distillation, sans dégradation ni perte du solvant par évaporation et ainsi un taux de recyclage élevé du solvant. Pour cette raison, l'emploi des liquides ioniques contribue à la baisse des pollutions atmosphériques et des quantités d'effluents qu'il faut ensuite gérer (Moutiers & Billard, 2005). A ce jour, les liquides ioniques sont utilisés dans plusieurs domaines, dont la synthèse (Mohammad Fauzi & Amin, 2012), en catalyse (Gordon, 2001) ainsi que pour l'extraction (Fontanals, Borrull, & Marcé, 2012; Oppermann, Stein, & Kragl, 2011; Trujillo-Rodríguez, Rocío-Bautista, Pino, & Afonso, 2013; Yoo, Pu, & Ragauskas, 2017).

3.4.1 Structure et propriétés

Les liquides ioniques appartiennent à plusieurs familles chimiques. Il y a de nombreuses combinaisons différentes de cations et d'anions pour la synthèse de LI. Les propriétés physiques et chimiques du LI sont modifiées lors du changement des cations et/ou des anions.

Les cations

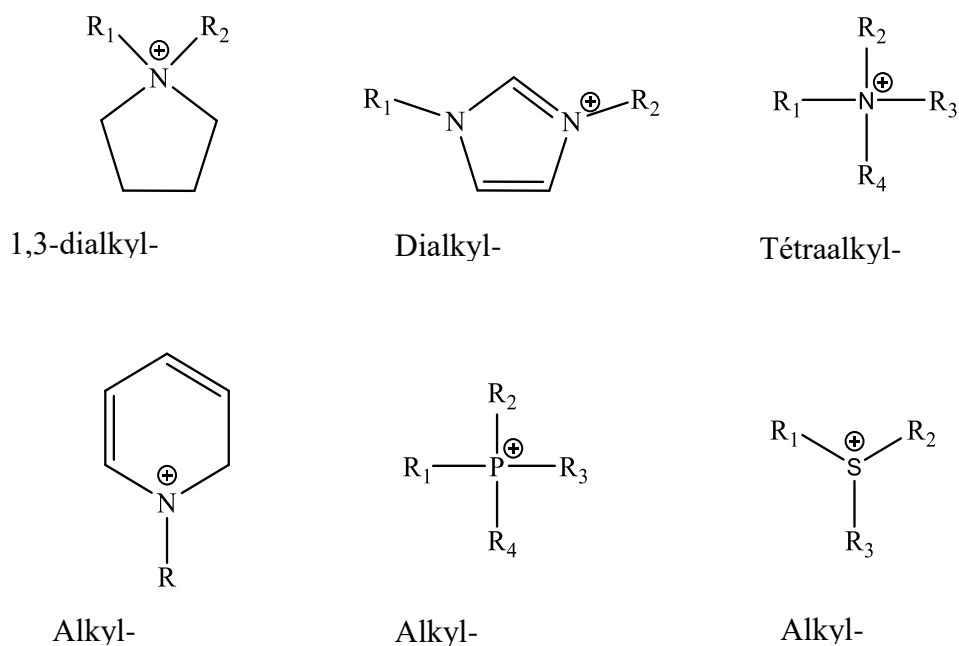


Figure 8. Structure chimique des principaux cations LI rencontrés dans la littérature

Le cation des liquides ioniques est généralement une structure organique possédant une faible symétrie. A l'heure actuelle, les liquides ioniques les plus utilisés (figure 8) ont une structure composée de cations centrés sur l'azote (tétraalkyl-ammonium, alkyropydinium, alkyimidazolium), le phosphore (phosphonium) ou le soufre (sulfonium) (Gordon, 2001; Keskin, Kayrak-Talay, Akman, & Hortaçsu, 2007).

Les anions

Les anions du LI sont très divers, inorganiques (Cl^- , PF_6^- ...) ou organiques (triflate, tosylate, phénylphosphonate, bistriflylimide...). Ils peuvent également être classés en deux groupes (Keskin et al., 2007) : les anions fluorés tels que PF_6^- , BF_4^- , CF_3SO_3^- , $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2\text{N}^-$ et les LI avec des anions non fluorés tels que AlCl_4^- , Cl^- .

Propriétés

Les LI sont constitués de deux composants : un cation et un anion. Par conséquent, leurs caractéristiques physiques et chimiques, en particulier la température de fusion ou la solubilité, changent avec les changements de cation et/ ou d'anion. Il est possible d'obtenir un solvant ayant les propriétés souhaitées en faisant varier le cation ou l'anion. Cependant, ils ont généralement les principales propriétés physico-chimiques suivantes :

- Ils possèdent de très bonnes propriétés de dissolution dans de nombreux solvants organiques et inorganiques. PE : tous les $\text{C}_n\text{C}_1\text{-imBF}_4$ (de $n=0$ à 18) sont solubles dans la propanone et CH_2Cl_2 (D. Holbrey & R. Seddon, 1999)
- Ils sont stables à haute température
- Ils n'ont pas ou quasiment pas de pression de vapeur
- Ils sont très polaires et visqueux

Les tableaux 7 et 8 présentent la température de transition vitreuse, de fusion et de décomposition et la viscosité de certains liquides ioniques.

Tableau 7. Valeurs de températures de transition vitreuse, de fusion et de décomposition de certains liquides ioniques (Moutiers & Billard, 2005)

Liquide ionique	T vitreuse (°C)	T fusion (°C)	T décomposition (°C)
[C2mim]Cl	-	87 89 (Kazibwe, Kim, Chun, & Gopal)	285 (Kazibwe et al.)
[C2mim][Tf ₂ N]	-87	-16 -15 (Kazibwe et al.)	417 455 (Kazibwe et al.)
[C2mim][BF ₄]	-89	15 11 (Kazibwe et al.)	391
[C4mim][BF ₄]	-97		403
[C4mim][Tf ₂ N]	-87	16	439 (Kazibwe et al.)
[C6mim]Cl	-	41 (Kazibwe et al.) 65	254 (Kazibwe et al.)
[C6mim][Tf ₂ N]	-84		

Tableau 8. Viscosité de quelques liquides ioniques (Moutiers & Billard, 2005)

Liquide ionique	Viscosité (cP)	Liquide ionique	Viscosité (cP)
[C2mim][Tf ₂ N]	25	[C4mim][Tf ₂ N]	52 (20 °C)
[C2mim][BF ₄]	66.5 (20 °C) 37.7 (22 °C)	[C4mim][PF ₆]	450 (Kazibwe et al.) (25 °C) 450 (Kazibwe et al.) (25 °C)
[C2mim][CH ₃ CO ₂]	160 (20 °C)	[C4mim][CF ₃ CO ₂]	73 (20 °C)
[C2mim][CF ₃ CO ₂]	45 (20 °C)	[C6mim][Tf ₂ N]	60 (25 °C)
[C4mim][BF ₄]	219 (Kazibwe et al.) (25 °C)	[C6mim][PF ₆]	410 (25 °C)

3.4.2. Applications des liquides ioniques comme solvant

L'intérêt des LI en chimie analytique a augmenté rapidement au cours des années et une large gamme d'applications des LI en chimie analytique a été rapportée. Les études sur les LI en chimie analytique ont principalement porté sur les LI en tant que solvants pour l'extraction dans l'extraction liquide-liquide classique (LLE), l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (UAE), la micro-extraction en phase liquide (LPME) et la micro-extraction en phase solide (SPME) ; en tant qu'additif de phase mobile dans la chromatographie liquide haute performance (HPLC), l'électrophorèse capillaire (CE) et la chromatographie à contre-courant (CCC) ; et comme modificateur de la phase absorbante ou stationnaire en HPLC, chromatographie en phase gazeuse (GC) et SPME. Les LI, en tant que solvants d'extraction, peuvent favoriser les interactions entre la substance analytique et le solvant en raison de leurs fonctions chimiques uniques.

L'extraction des composés bioactifs à partir de plantes utilisant des LI est très prometteuse car elle permettrait d'atténuer la pollution environnementale et d'améliorer la sélectivité et les rendements d'extraction de composés intéressants dans les procédés de prétraitement des échantillons par rapport aux solvants organiques classiques. La plupart des études ont été réalisées avec des liquides ioniques de la famille des imidazolium avec différentes longueurs de chaîne, et divers anions inorganiques (PF_6^- , Br^- , BF_4^- , ...). Le tableau 9 énumère ces applications.

Tableau 9. Application des liquides ioniques pour l'extraction de composés bioactifs

Liquides ioniques	Méthode	Bioactive substance	Sources	Commentaire	Références
[C4mim]Cl [C4mim]Br [C4mim][BF ₄] (bPyCl) [C2mim]Br [C6mim]Br [C2mim][BF ₄] [C4mim][N(CN) ₂] [C4mim] ₂ [SO ₄] [C4mim][H ₂ PO ₄]	MAE	Acide gallique Acide ellagique Quercétine <i>trans-resveratrol</i>	<i>Smilax china</i> (racines) <i>Psidium guajava</i> Linn. (feuilles)	- Micro-ondes MAS-I (Sineo Microwave, Shanghai, Chine), quantification des composés par HPLC. - Solution aqueuse [C4mim]Br-2.5 M a été déterminée comme LI d'extraction optimal. - Dans les conditions optimisées, les rendements d'extraction des composés polyphénoliques se situaient entre 79,5 et 93,8 % avec une extraction en une étape de 10 minutes.	(Du, Xiao, Luo, & Li, 2009)
[C4mim]Cl [C4mim]Br [C4mim][BF ₄] [C4mim][PF ₆] [C2mim][BF ₄] [C6mim][BF ₄] [C8mim][BF ₄]	MAE	Alcaloïdes phénoliques	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	- Micro-ondes domestique modifié en ajoutant un condenseur d'eau, quantification des composés par HPLC. - [C4mim]Br-1.5 M et [C6mim]Br-1M a été sélectionné. - Une réduction des temps d'extraction (de 2 h à 90 s) et une efficacité supérieure remarquable (20 à 50 % d'amélioration) par rapport aux méthodes HRE et MAE	(Lu, Ma, Hu, Dai, & Pan, 2008)

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

[C2mim]Br [C4mim]Cl [C4mim]Br [C4mim]BF4 [C4mim]PF6 [C6mim]Br	MAE	<i>N</i> -nornuciferine, <i>O</i> -nornuciferine, nuciferine	Feuilles de lotus	- Micro-ondes domestique – 2450 MHz, 700 W, quantification des composés par HPLC. - [C6mim]Br-1M a été sélectionné - Un rendement d'extraction plus élevé (0,9-43,7 % amélioré) par rapport aux méthodes HRE et MAE - Un temps d'extraction plus court (de 2 h à 2 min).	(Ma et al., 2010)
[C2mim]Br [C4mim]Br [C6mim]Br [C8mim]Br [C10mim]Br [C4mim]Cl [C4mim]BF4 [C4mim]NO3 [C4mim]OH	MAE	Proanthocyanes	<i>Larix gmelini</i> Bark	- WP700TL 23-K5 micro-ondes domestique modifié en ajoutant un condenseur d'eau, 2450 MHz, 700 W. - Les conditions optimales : temps de trempage de 3 h, ratio solide-liquide de 1 :20 (g/ml), puissance d'irradiation de 230 W, temps d'irradiation de 10 min, [C4mim]Br-1,25 M et deux cycles d'extraction ; rendement d'extraction 114,86 ± 3,93 mg/g.	(L. Yang et al., 2012)
[C12mim]Cl [C12mim]Br [C12 ₂ mim][NO ₃] [C12mim][HSO ₃] [C12mim][SO ₃]	UAE	Composés phénoliques	Propolis	- Ultrasons : 500 W, 40 kHz - [C12mim]Br-0,2M a été sélectionné - 20 composés phénoliques ont été identifiés par UHPLC.	(J. Cao, Peng, Du, Zhang, & Xu, 2017)

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

[C2mim]Br [C6mim]Br [C10mim]Br				- Plus simple, plus efficace, nécessite moins de solvant organique et un temps d'extraction plus court.	
([C4mim][PF6] [C6mim][PF6] [C8mim][PF6])	UAE	Composés phénoliques	<i>Ficus carica</i> L.	- Ultrasons : 100 W, 40 kHz - ([C4mim][PF6]-1M a été sélectionné - Efficacité d'extraction plus élevée et temps d'extraction réduit	(H. Qin, Zhou, Peng, Li, & Chen, 2015)
([C _n mim]Br) N = 2,4,6,8,10,12,14,16	MAE	Flavonoïdes Glycosides	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	- Micro-ondes domestique – 2450 MHz, 700 W ; Système HPLC Agilent 1100 series. - [C12mim]Br-0.25 M a été sélectionné.	(Zhou et al., 2015)
GMA-EGDMA[MIM][Cl]	SPE	Caféine Théophylline	Thé vert	Le polymère ionique modifié a été utilisé avec succès comme un solvant spécial dans un processus d'extraction en phase solide (SPE) pour isoler la caféine et la théophylline du thé vert.	(Tian, Yan, & Row, 2009)
[C4mim][PF6] [C6mim][PF6] [C8mim][PF6] [C6mim][BF4] [C8mim][BF4]	LLE	Acide butyrique 3- indole (IBA)	Famille de pois	- [C4mim] [PF6] a été jugé le plus efficace. -La capacité de [C4mim] [PF6] était de $17,6 \times 10^{-4}$ mmol IBA pour 1,0 mL d'IL	(Absalan, Akhond, & Sheikhan, 2008)

3.4.3 Liquide ionique réversible

La grande majorité des applications des LI à ce jour ne concernent que la réaction ; elles ignorent la séparation et la purification des produits. Ceux-ci sont nécessaires pour un processus complet et c'est dans la séparation et la réutilisation que les plus grands problèmes se produisent, tant dans la consommation d'énergie que dans les pertes et la pollution. Cependant, la faible pression de vapeur et la faible volatilité peuvent causer quelques difficultés à séparer le produit désiré et les LI après réaction. Les liquides ioniques réversibles, sont ceux qui peuvent être déstabilisés entre les formes moléculaires et ioniques, permettant de surmonter les problèmes de séparation et de purification des LI classiques.

Les LI réversibles ont été décrits pour la première fois il y a quelques années par (Jessop, Heldebrant, Li, Eckert, & Liotta, 2005a). D'une manière générale, les LI réversibles sont formés par le mélange de mélanges équimolaires d'un alcool avec une base organique forte (par exemple l'amidine, ou 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene, DBU).

L'exposition d'un mélange 1 : 1 des deux liquides neutres DBU et de 1-hexanol en CO₂ gazeux à 1 atm, provoque une conversion exothermique de la phase liquide moléculaire à un liquide ionique (figure 9). Le liquide ionique peut être converti en un liquide neutre en faisant barboter un gaz inerte, par exemple N₂ ou Ar, à travers le liquide à température ambiante et peut également être inversé en chauffant jusqu'à 50-60 °C, ce qui donne des taux d'inversion plus élevés (Jessop et al., 2005a).

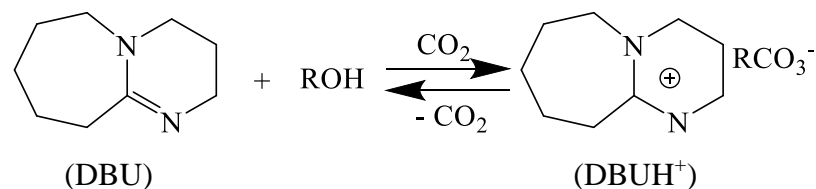


Figure 9. Concept des LI réversibles par le groupe de Jessop (R = H ou un groupe alkyl)

Les sels d'alkylcarbonate de DBU, préparés en faisant barboter du CO₂ à travers des mélanges équimolaires de DBU et d'éthanol, de méthanol ou d'eau, sont des solides à température ambiante. Cependant, ceux préparés à partir de DBU et de 1-propanol, de 1-butanol, de 1-hexanol, de 1-octanol ou de 1-décanol sont des liquides visqueux à ou près de la température ambiante (Anastas, 2013). La viscosité d'un mélange de DBU-1-propanol sous N₂ est de 5,5 cP à 23 °C mais augmente de plusieurs fois pendant le traitement au CO₂. La viscosité de la forme liquide ionique est de 410 cP, mais avec un grand écart-type (± 77 cP) (Phan et al., 2008).

Tableau 10. Application des liquides ioniques réversibles pour l'extraction

Liquides ioniques	Application	Matrice	Commentaire	Référence
DBU/octanol DBU/ethanol	Extraction d'hydrocarbures	microalgue <i>Botryococcus braunii</i>	- Rendement le plus élevé (DBU/octanol) - systèmes recyclables non volatils/ non inflammables	(Samorì et al., 2010)
DBU/butanol DBU/hexanol	Extraction sélective des hémicelluloses	Epinette – <i>Picea abies</i>	- Solvant efficace pour le fractionnement du bois -Recyclage simplifié et possibilités de réutilisation.	(Anugwom et al., 2012)
DBU/decanol	Microextraction de plomb (Pb) et de cadmium (Cd)	eau de lac	- Procédé rapide et respectueux de l'environnement - Récupération de métaux > 97%	(Bilal et al., 2017)

4. Technique d'encapsulation

4.1. Introduction à la microencapsulation

L'encapsulation est définie comme une technologie consistant à piéger des matériaux solides, liquides ou gazeux dans des capsules miniatures, de taille nano-, micro- ou millimétriques, qui peuvent libérer leur contenu à des vitesses contrôlées dans des conditions spécifiques (Mishra, 2015). Elle peut également être définie par sa taille de particules, par exemple : nanoencapsulation, microencapsulation, etc. Dans la dernière décennie, elle a été largement étudiée et de nombreuses applications sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique et alimentaire pour répondre aux besoins. Les avantages possibles des ingrédients microencapsulés dans l'industrie alimentaire sont résumés par (Zuidam & Shimoni, 2010) comme suit :

- Praticité supérieure d'utilisation de l'agent actif (par exemple, conversion de l'agent actif en une poudre, qui peut être exempte de poussière, s'écouler librement et avoir une odeur plus neutre)
- Immobilisation des agents actifs dans les systèmes de transformation des aliments
- Amélioration de la stabilité du produit final et pendant le traitement (c'est-à-dire moins d'évaporation de l'agent actif volatil et / ou aucune dégradation ou réaction avec d'autres composants dans le produit alimentaire tels que l'oxygène ou l'eau)
- Amélioration de la sécurité (par exemple, réduction de l'inflammabilité des substances volatiles comme l'arôme, pas de manipulation d'huile volatile concentrée)
- Création d'effets visuels et texturaux (repères visuels)
- Propriétés ajustables des composants actifs (taille des particules, structure, lipo- ou hydro-soluble, couleur)
- Masquage d'un goût indésirable
- Libération contrôlée (différenciation, libération par le stimulus droit)

Les procédés de microencapsulation sont variés, et il est nécessaire de les classer afin de convenablement les sélectionner en fonction de la problématique traitée. Selon Benoît et al. (2013), ils peuvent être classés en trois groupes selon le principe technique : physico-chimiques, mécaniques, chimiques (table 11) (Benoît, Richard, & Venier-Julienne, 2013). Dans l'industrie alimentaire, de nombreux procédés d'encapsulation reposent sur la réalisation en premier temps d'une dispersion fine de l'actif (sous forme gazeuse, liquide ou pulvérulente) et cette dispersion est ensuite entourée d'un matériau enrobant par différents

procédés physico-chimiques (tableau 12). La préparation d'extrudats fondus, de liposomes, et l'utilisation de matériaux naturels comme des cellules de levure peuvent être des exceptions.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé le procédé de lyophilisation pour encapsuler des pigments de la famille des anthocyanes. Il s'agit de la technique la plus appropriée pour l'encapsulation des molécules thermosensibles et instables dans une solution aqueuse (Vandamme, Poncelet, & Subra_Paternault, 2007). Elle permet une conservation à long terme grâce à l'abaissement de l'activité de l'eau du produit. La plupart des propriétés initiales de la matière première telles que la forme, les dimensions, l'apparence, le goût, la couleur, la saveur, la texture et l'activité biologique sont bien conservées (Ceballos, Giraldo, & Orrego, 2012). Les capsules de linoléate de menthyle obtenues par lyophilisation ont été mieux conservées contre l'oxydation que celles obtenues par atomisation (spray-dring) et ceci quelle que soit l'humidité relative (Minemoto, Adachi, & Matsuno, 1997). Les inconvénients majeurs de la lyophilisation sont la consommation d'énergie élevée, la longue durée de traitement. Comparé au séchage par spray-dring la lyophilisation est jusqu'à 30-50 fois plus chère (Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007).

Tableau 11. Les trois grandes classes de procédés industriels de microencapsulation

Procédés physico-chimiques	Procédés mécaniques	Procédés chimiques
<ul style="list-style-type: none"> - Séparation de phase ou coacervation (simple ou complexe) - Evaporation – extraction de solvant - Gélification thermique d'émulsion (hot melt) 	<ul style="list-style-type: none"> - Atomisation / séchage (spray-drying) - Gélification ou congélation de gouttes (prilling) - Enrobage en lit fluidisé (spray-coating) - Extrusion/ sphéronisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Polycondensation interfacile - Polymérisation interfacile - Polymérisation en milieu disperse (émulsion, miniémulsion...) par voie radicalaire ou anionique

Tableau 12. Principaux procédés de microencapsulation utilisés en sciences des aliments

Procédés	Étapes du procédé	Tailles de particules (µm)	Taux d'encapsulation (%)
Atomisation / séchage (spay-drying)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dispersion ou dissolution de la matière active dans une solution de matériau enrobant 2. Atomisation 3. Séchage 	1 – 400	< 50
Lyophilisation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dispersion ou dissolution de la matière active dans une solution de matériau enrobant 2. Congélation de l'échantillon 3. Séchage sous basse pression 4. Broyage (si nécessaire) 	20 – 5000	Variable
Enrobage en lit fluidisé	<ol style="list-style-type: none"> 1. Fluidisation de la poudre de articles 2. Pulvérisation du matériau enrobant sur les particules 3. Séchage et filmification de l'enrobage 	100 – 5000	60 – 90
Gélification de gouttes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dispersion ou dissolution de la matière active dans une solution aqueuse de polymères (Pe : alginate, chitosan) 2. Laisser tomber goutte à goutte dans un bain de gélification 	200 – 5000	< 30
Coacervation	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dispersion de la matière active dans une solution aqueuse de deux polymères portant des charges opposée 2. Ajustement du pH de la solution 3. Coacervation : les gouttelettes de coacervat se déposent à la surface de la matière active à encapsuler et former un enrobage continu 4. Réticulation : Cet enrobage est consolidé par réticulation des macromolécules constitutives du coacervat 	5 – 200	40 – 90
Expansion rapide de solutions supercritiques	<ol style="list-style-type: none"> 1. Dissolution de la matière active et du matériau enrobant dans le fluide supercritique 2. Pulvérisation du mélange dans un environnement ayant une pression inférieure au point critique. L'expansion brutale de la solution supercritique provoque la précipitation des solutés sous forme de microsphères 	10 – 400	< 50

4.2. Encapsulation d'anthocyanes

Le problème majeur associé au stockage des anthocyanes est leur instabilité causée par la température, l'oxygène, la lumière et certaines enzymes pendant le traitement et le stockage de la marchandise. Par conséquent, de nombreux efforts ont été réalisés dans le développement de techniques pour protéger les anthocyanes contre les dommages causés par les facteurs extérieurs. Dans diverses expériences sur l'encapsulation d'anthocyanes, différents matériaux et composés ont été utilisés tels que maltodextrine avec différents DE, gomme arabique, pectine, etc. Le tableau 13 présente certains des matériaux et techniques utilisés dans l'encapsulation d'anthocyanes.

Tableau 13. Encapsulation d'anthocyane par différents matériaux et techniques

Anthocyanes	Matériaux encapsulation	Techniques	Références
Anthocyanes de pétales de safran	- Gomme de graines de Cress (<i>Lepidium sativum</i>) - Gomme arabique	Lyophilisation	(Jafari, Mahdavi-Khazaei, & Hemmati-Kakhki, 2016)
	- Gomme arabique - Maltodextrine	Lyophilisation	(Mahdavee-Khazaei, Jafari, Ghorbani, & Hemmati Kakhki, 2014)
Anthocyane de jaboticaba (résidu/pomace)	- Maltodextrine - Pectine - Protéine de soja	Lyophilisation	(Pereira-Souza, Deyse-Gurak, & Damasceno-Ferreira-Marczak, 2017)
Anthocyane de myrtille	- Gomme arabique - Whey proteine	Nébulisation/séchage (Spray-drying)	(Flores, Singh, Kerr, Pegg, & Kong, 2014)
	- Pectine de citron, de pomme, de betterave - Pectine amidée	Spray-drying	(Berg, Bretz, Hubbermann, & Schwarz, 2012)
Anthocyane de <i>Berberis vulgaris</i>	- Maltodextrine and gomme Arabique	Spray-drying	(Akhavan-Mahdavi, Jafari, Assadpour, &

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

	(3 :1) - Maltodextrine and 39elatin (3 :1) - Maltodextrine		Ghorbani, 2016)
Anthocyane d'hibiscus	- Maltodextrine	Assistée par micro- ondes/émulsion	(Zaidel, Sahat, Jusoh, & Muhamad, 2014)
	- Gélation ionique	- Extrusion - Spray-drying	(de Moura, Berling, Germer, Alvim, & Hubinger, 2018)
	maltodextrine, pectine, gélatine, whey protein, carraghénane et gomme arabique	Spray-drying	(Díaz-Bandera, Villanueva-Carvajal, Dublán-García, Quintero- Salazar, & Dominguez- Lopez, 2015)
Cyanidine-3-O- glucoside	Ferritines	Emulsion	(Zhang et al., 2014)
Anthocyane de la peau de raisin	- Maltodextrine - Gomme arabique	Lyophilisation	(Stoll, Costa, Jablonski, Flôres, & de Oliveira Rios, 2016)
Anthocyane de framboise	- Gélatine - Gomme arabique	Coacervation complexe	(Shaddel et al., 2017)
	Isolat de protéine de soja	Electrospinning	(S. Wang, Marcone, Barbut, & Lim, 2013)
anthocyane de la peau de <i>Myrciaria cauliflora</i>	Polyéthylène glycol (Flores et al.)	CO ₂ supercritique	(Santos, Albarelli, Beppu, & Meireles, 2013)

4.3. Les cellules de levure – un matériel potentiel pour l'encapsulation des polyphénols

Dans le domaine de la microencapsulation, les cellules de levure ont été reconnues en tant que microcapsules naturelles depuis 1977, quand Shank a breveté une technique utilisant des cellules de levure spéciales contenant des lipides à plus de 40% (w/w) pour encapsuler des substances liposolubles (B. Pham-Hoang, Romero-Guido, Phan-Thi, & Waché, 2013). En fait, la structure eucaryote de la paroi cellulaire de levure en a fait un excellent matériau de paroi d'encapsulation et ses propriétés naturelles ont montré de nombreux avantages par rapport à d'autres technologies de microencapsulation (Nelson, 2002). La paroi cellulaire a une structure épaisse de 100-200 nm, ce qui représente généralement jusqu'à 25-30% du poids sec de la cellule. Il a été démontré que la paroi de la levure permettait à des molécules d'un poids allant jusqu'à 400 kDa de diffuser librement (De-Nobel, Klis, Munnik, Priem, & Van-Den-Ende, 1990) et que la cellule de levure était capable de charger jusqu'à 70% ou, plus communément, 50% de composé actif par poids de cellule.

De plus, il a été montré que la paroi cellulaire de la levure présente un potentiel antioxydant qui est montré par l'étude de (G. Shi et al., 2008) pour la protection oxydative et photo-dégradative du resvératrol. Les capsules de levure se sont également révélées être un système hautement protecteur au traitement thermique pour la curcumine avec une efficacité contre la dégradation thermique jusqu'à un chauffage isotherme à 200 °C (Paramera, Konteles, & Karathanos, 2011b). Le tableau 14 présente certaines études utilisant des cellules de levure comme microcapsules pour l'encapsulation de polyphénols.

Tableau 14. Application de levure pour l'encapsulation de polyphénols

Polyphénols	Levure	Techniques	Références
Resvératrol	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lyophilisation	(G. Shi et al., 2008)
Acide chlorogénique	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lyophilisation	(G. Shi et al., 2007)
Curcumine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lyophilisation	(Paramera, Konteles, & Karathanos, 2011a)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Perfusion sous vide fournit	(Young, Dea, & Nitin, 2017)
Quercétine	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Lyophilisation	(B.-N. Pham-Hoang et al., 2017)

CONCLUSION ET ORIENTATION DE L'ÉTUDE

La couleur des aliments est un sujet qui a suscité un intérêt de longue date autant chez les producteurs que chez les consommateurs (Jacquot et al., 2011). La nature nous offre une merveilleuse diversité de végétaux et une palette de couleurs incroyables. Les superbes couleurs « rouge, rose, jaune, orangé, bleue, violet et pourpre » de nombreuses fleurs, fruits et légumes sont dues à des caroténoïdes et des anthocyanes. Ces couleurs dépendent de la structure chimique et peuvent varier lors de la complexation de métaux. Ils sont des antioxydants intéressants mais naturellement sensibles à l'oxydation et à la température, aux enzymes, à l'humidité, à la lumière et à l'acidité du milieu. C'est pourquoi, ils sont facilement détruits par les méthodes d'extraction classiques. Les liquides ioniques avec leurs propriétés particulières qui leur confèrent de bonnes qualités pour l'extraction sont intéressants comme technologie douce, efficace et non polluante. L'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et l'extraction assistée par ultrasons (UAE) montrent également leur potentiel pour être une technique « verte » en réduisant la consommation de solvant et le temps d'extraction. Nous allons donc travailler sur l'extraction des colorants naturels par liquides ioniques, MAE et UAE. En même temps les techniques de protection des principes actifs ont également été étudiées. L'encapsulation est très efficace et très utilisée pour répondre à ce besoin.

Le Laboratoire Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques (PMB) travaille depuis quelques années sur l'encapsulation de composés d'arômes (lactones, éthyle esters...) de composés actifs hydrophobes (curcumine, β -carotène, quercétine) dans des levures. Les cellules de levure étaient un bon matériau pour l'encapsulation ainsi que pour la protection des composés actifs contre les agents externes tels que l'oxydation, la température, l'humidité.

Dans ce travail, les pigments proviennent de différentes plantes Vietnamiennes et appartiennent aux familles des caroténoïdes et des anthocyanes. Nous avons choisi les techniques d'extraction avec assistances ou avec solvants verts pour le but « éco-extraction » et pour éviter la dégradation des pigments. Une fois extraits, les caroténoïdes principaux ont été purifiés afin d'être utilisés comme un standard. Les actifs hydrophiles, anthocyanes, ont été sélectionnés pour l'étude de l'encapsulation par levures.

CHAPITRE II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Matière première

1.1 Lyciet (Goji) – Kỳ tử

Goji, *Lycium chinense* (figure 10), est le nom commercial de la baie du lyciet. Il se présente sous la forme d'une petite baie orange, un peu allongée (1 à 2 cm), de saveur légèrement sucrée. Une baie de *Lycium* comporte 3 parties : la peau, la chair et les grains. Chaque baie contient de 15 à 25 petits grains qui sont riches en lipide et en cellulose. La chair et la peau du *Lycium* sont colorées d'orange à rouge. Elles sont les parties qui contiennent des caroténoïdes (Nguyen-Thi et al., 2007; C. C. Wang, Chang, Inbaraj, & Chen, 2010).



Figure 10. Baies de Goji (a) et structure de zéaxanthine (b)

Parmi les caroténoïdes du *Lycium*, la zéaxanthine (code européen E161h) est majoritaire. En outre, le *Lycium* contient aussi des flavonoïdes et des polysaccharides. Le Goji est principalement vendu sous formes de fruits séchés qui sont largement utilisés au Vietnam. Dans cette étude, ils proviennent de magasins de pharmacie asiatique à Hanoï, Vietnam et ont été achetés environ 12 euros/kg.

1.2. Roucou – Điều màu

Le Roucou, *Bixa orellana* L. (figure 11), est à l'origine un arbre ou arbuste des régions d'Amérique tropicale. Il contient une teneur élevée en bixine (figure 11b) qui est actuellement utilisée comme colorant alimentaire (code européen E160b) (Hagiwara et al., 2003; Sinha, Chowdhury, Saha, & Datta, 2013). Au Vietnam, il est largement utilisé sous forme de grains séchés ou en poudre comme colorant alimentaire ou teinture de couleur magenta (Le-Anh et al., 2008).

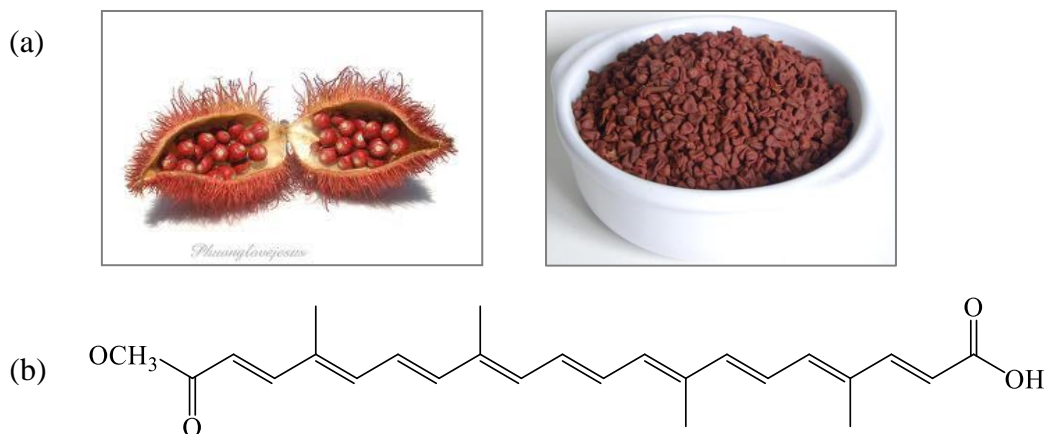


Figure 11. Baie de roucou (a) et structure de la bixine (b)

A gauche, une baie ouverte, à droite, grains de roucou

Un fruit de roucou contient plusieurs grains (figure 11a). Tous les grains de roucou sont enveloppés d'une couche de poudre rouge. Tous les colorants sont contenus dans cette poudre.

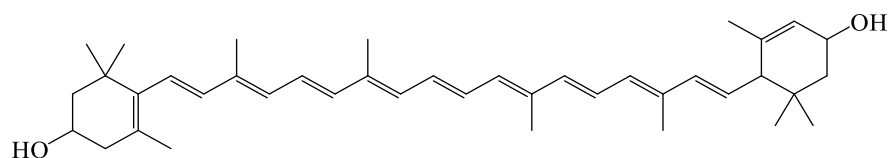
1.3. Rose d'Inde – *Cúc vạn thọ*

La rose d'Inde (*Tagetes erecta* L.), communément appelée Marigold en anglais et souci en français, est une espèce de plantes herbacées de la famille des Asteraceae. Elle est originaire du Mexique (figure 12a). Ses fleurs de couleur jaune ou orange sont spécialement utilisées pour soigner les maladies oculaires, les rhumes, les conjonctivites, la toux, les ulcères, les hémorragies et pour purifier le sang (Kazibwe et al., 2017). On rapporte également que les fleurs de Marigold contiennent de grandes quantités de lutéine (figure 12b) qui sont utilisées comme colorants dans les aliments et les boissons (Sowbhagya, Sampathu, & Krishnamurthy, 2004).

Dans le cadre de cette thèse, les pétales de fleurs de Marigold séchées ont été fournis par l'Université de Nha Trang, Vietnam. Les pétales de fleurs sont récoltés en novembre 2005 à Khanh Hoa, Vietnam. Elles ont été récoltées puis séchées à 80 °C jusqu'à ce que la masse ne change plus, puis écrasées et stockées dans un congélateur à -20 °C jusqu'à utilisation.



(a)



(b)

Figure 12. Fleur de Rose d'Inde (a) et structure de la lutéine (b)

1.4. *Sauropus androgynus* (SA) – Rau ngót et *Perilla frutescens* (PF) – Tía tô

Le Rau ngót et le tía tô sont 2 légumes très connus au Vietnam (figure 13). Ils sont utilisés dans l'alimentation quotidienne. Ils sont également utilisés dans les remèdes traditionnels contre le rhume et la fièvre depuis très longtemps (Andarwulan et al., 2012; S.-Y. Yang et al., 2012).

Le Rau ngót et le tía tô ont été achetés dans un marché local à Hanoi en août 2012. Ils ont ensuite été séchés au soleil et transportés en France pour nos études.

D'après l'Institut de Nutrition du Vietnam, Rau ngót et Tía tô contiennent une quantité importante de β -carotène (code européen E160a) : 6650 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ et 5520 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de poids frais respectivement. Pourtant, les caroténoïdes sont cachés par la couleur verte des chlorophylles dans ces feuilles. Les feuilles de Rau ngót sont vertes et les feuilles de Tía tô ont une face verte, une face violette.



Figure 13. Les feuilles riches en caroténoïdes

a : *Sauropus androgynus* (Rau ngót) ; *b* : *Perilla frutescens* (Tía tô)

1.5. *Hibiscus* – Búp giấm

Hibiscus sabdariffa, appelé également Roselle, Jamaïca ou Karkadé, est une plante herbacée buissonnante annuelle ou bisannuelle, atteignant de un à plus de cinq mètres selon la variété et le mode culture (Ali, Wabel, & Blunden, 2005). Aujourd'hui, il est largement cultivé dans les régions tropicales et subtropicales, comme en Inde, Arabie Saoudite, Chine, Malaisie, Indonésie, Philippines, Vietnam, Soudan, Egypte, Nigeria et au Mexique (Chewonarin et al., 1999; Da-Costa-Rocha, Bonnlaender, Sievers, Pischel, & Heinrich, 2014; Eslaminejad & Zakaria, 2011; Nguyen Xuan et al., 1999). La fleur est axillaire, solitaire au sommet d'un pédoncule court presque cessible. Le calice est presque glabre, formé de cinq sépales auxquelles se soude un calicule extérieur multifide (8 à 12 bractéoles courtes de formes triangulaires). Les calices et calicules des fleurs sont extérieurement plus au moins rouge foncé et intérieurement peuvent montrer un dégradé du rouge au vert. Cette pigmentation rouge s'accroît au cours du développement et semble d'autant plus marquée que l'insolation est intense (Paul, 1995).

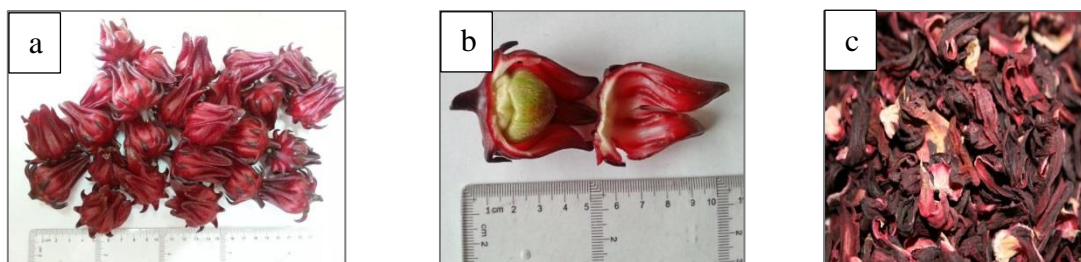


Figure 14. (a) fleur en fructification, (b) calice et fruit, (c) calices séchées

Les anthocyanes les plus fréquentes de l'hibiscus sont la delphinidin 3-sambubioside, le cyanidin 3-sambubioside, le cyanidin 3-glucoside et le delphinidin 3-glucoside (Borrás-Linares et al., 2015; Wong, Yusof, Ghazali, & Che Man, 2002).

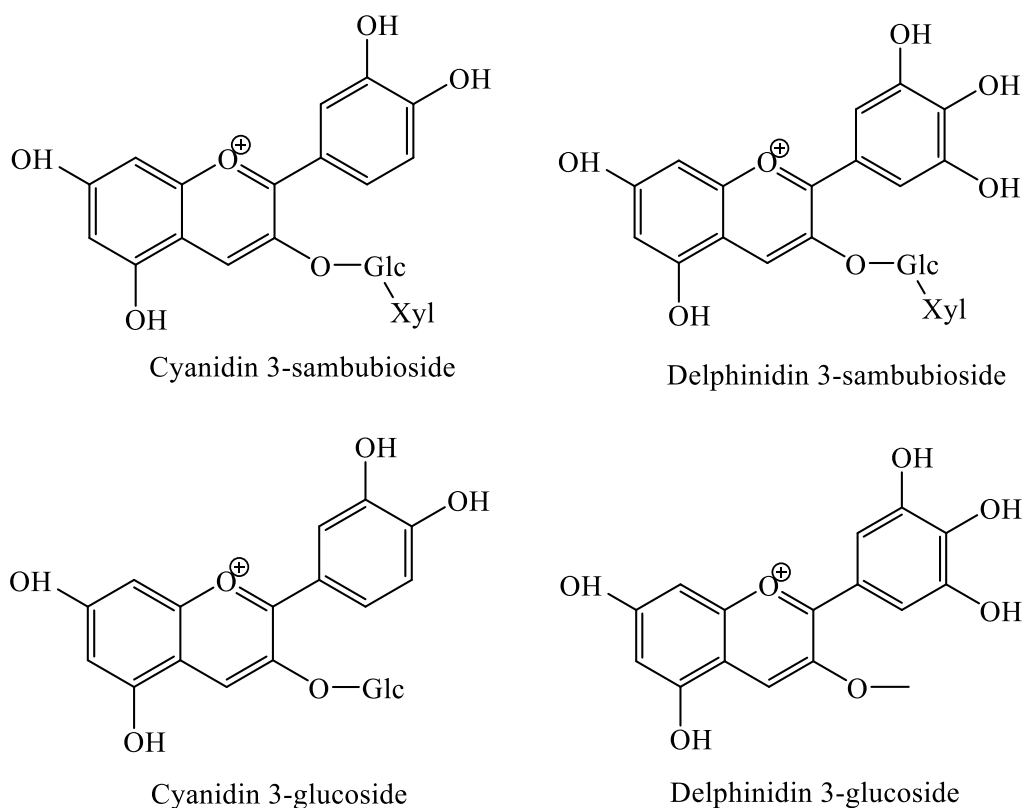


Figure 15. Principales anthocyanidines du calice de la Roselle

Les fruits d'*Hibiscus sabdariffa* ont été récoltés à Tam Dao, Vietnam en décembre 2014. Après avoir retiré les capsules, les calices ont été séchés dans un séchoir à 40 °C pendant 48 h. Les calices séchés ont été écrasés et stockés dans un congélateur à -40 °C jusqu'à utilisation.

2. Conditions expérimentales

2.1. Extraction

Les conditions expérimentales de l'étape d'extraction des pigments sont décrites dans la section « Materials and methods » de l'article 1 : Sustainable processes for the extraction of carotenoids from tropical plants – page 61.

2.2. Encapsulation

Les conditions expérimentales de l'étape d'encapsulation d'anthocyane sont décrites dans la section 2.3, 2.4 dans l'article 2 « Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast » - page 96 et la section « materials and methods » dans l'article 3 « Microencapsulation of *Hibiscus Sabdariffa* L. calyx anthocyanins with yeast walls compared with maltodextrin through freeze drying » - page 111.

3. Caractérisation physicochimique des pigments

3.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques. Elle s'effectue généralement sur une fine couche de silice (phase stationnaire) déposée sur un support. Le mélange étudié est posé à l'aide d'un capillaire à environ 1 cm du bord du support (dépend de la taille du support) puis placé dans une cuve contenant l'éluant. Le niveau de l'éluant doit être en dessous de linge de dépôt. Le récipient est ensuite refermé par un couvercle (figure 16).

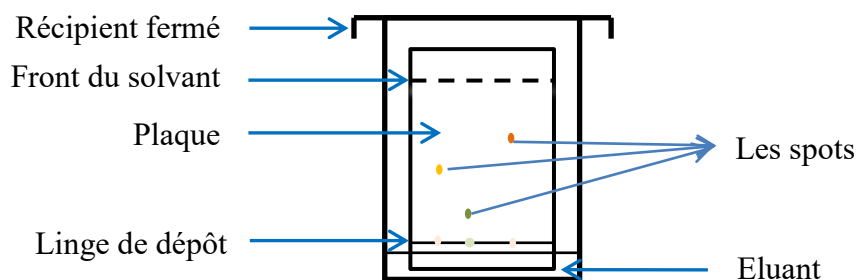


Figure 16. Schéma d'un système de chromatographie sur couche mince

La tache migre sur la plaque plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant. La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le Rf de « Retention factor » (Rapport frontal). Ce Rf est le rapport de la distance parcourue par le composé divisé par la distance parcourue par l'éluant.

$$Rf = \frac{\text{distance de migration du spot}}{\text{hauteur du front du solvant}}$$

Chaque spot correspond à un constituant et on l'identifie par comparaison du Rf avec un témoin (une même substance migre à la même hauteur dans des conditions opératoires identiques ; même Rf).

3.2 Spectrométrie UV-visible

La spectrophotométrie permet de mesurer l'absorbance d'une molécule à une longueur d'onde donnée. Une solution est colorée si elle absorbe une partie des radiations de la lumière blanche.

Nous avons utilisé le Spectrophotomètre UV-Vis (UV-1650 pc) pour analyser des extraits aux longueurs d'onde de 250 à 700 nm. Pour identifier un composant, nous avons observé les longueurs d'onde des pics majeurs. Le β -carotène dans l'hexane a des maxima d'absorbance à 425, 450 et 478 nm. La zéaxanthine dans le chloroforme présente ses maxima à 433, 462 et 493 nm, la lutéine dans le chloroforme et la bixine dans l'éthanol absorbent à 429, 457 et 484 nm (Rodriguez-Amaya, 2001)

La concentration d'un composant est calculée en suivant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon * l * C$$

Avec : - A : absorbance à longueur d'onde du pic majeur

- ϵ : le coefficient d'absorption molaire en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ou d'absorption en masse % ($E_{cm}^{1\%}$ – absorbance d'une solution de 1 g/100 mL) (voir tableau 15)

- C : la concentration de la solution en ($mg \cdot L^{-1}$)

- l : la largeur de cuve en cm

La concentration des composés dans une solution, évaluée par l'absorption de la solution à une longueur d'onde λ dépend des propriétés des caroténoïdes et de la longueur d'onde dont le coefficient d'extinction est différent :

$$C \text{ (mol/l)} = A / (\epsilon \cdot L)$$

$$\text{Ou } C \text{ (mg/l)} = 10000 \cdot A / E_{cm}^{1\%}$$

$$\text{Ou } C \text{ (mg/l)} = 10^3 \cdot M \cdot A / (\epsilon \cdot L) - M \text{ est la masse moléculaire}$$

Tableau 15. Coefficient d'absorption molaire des composés de cette étude

Composé	λ_{\max} , nm	ϵ	$E^{1\%}_{\text{cm}}$	Référence
β -carotène	450	-	2592	(Rodriguez-Amaya, 2001)
Zéaxanthine	450	-	2540	
Bixine	456	-	4200	
Lutéine	445	-	2550	
Curcumine	426	5500	1607	(Waranyoupalin et al., 2009)
Anthocyane (<i>Delphinidine-3-glucosides</i>)	520	23700	-	(Giusti & Wrolstad, 2001)

3.3 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) avec détecteur à barrette de diodes (abréviation en anglais : DAD-HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance est une méthode utilisée pour qualifier et quantifier les composés dans les extraits des végétaux (Gupta, Sreelakshmi, & Sharma, 2015; Sindi et al., 2014). Cette méthode, initialement chromatographie liquide haute pression, est basée sur les mêmes principes que la chromatographie sur colonne (voir dans la section 4.1) et met en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage que d'adsorption, d'échange d'ions ou d'exclusion.

Pour identifier les anthocyanes de l'extrait d'hibiscus, le Chrom Elite HPLC avec pompe L-2130 et la colonne Luna 5 μ m, C18(2) (250 x 4,6mm), Phenomenex avec la phase stationnaire inverse a été utilisé. Deux solvants pour la phase mobile, (A) 0,2% (v/v) d'acide formique dans de l'eau milli-Q, (B) acétonitrile ont été utilisés en gradients de concentration en commençant avec 10% (B) qui a augmenté à 20% (0-10 min) puis à 70% (10-11 min). Les conditions ont été maintenues à 70% de B pendant 4 minutes avant de revenir à 10% de B (15-16 min) et de finir avec 10% de B (16-25 min). Les échantillons ont été dilués à partir des extraits concentrés. Le débit était de 0,8 ml/min, les longueurs d'ondes d'analyse à 520 nm, la température d'injection de 10 °C et le temps d'analyse de 30 min.

Pour identifier les caroténoïdes, la colonne Zorbax SB-18 5 μ m (150 x 3 mm), Agilent avec la phase stationnaire inverse a été utilisée. Les solvants utilisés étaient le mélange méthanol – acétonitrile – dichlorométhane (10/85/5, v/v/v) + 0.05% de triméthylamine. Le

débit était de 0.6 ml/min, les longueurs d'ondes d'analyse de 220 à 600 nm, la température d'injection de 25 °C et le temps d'analyse de 30 min.

3.4. Méthode spectrophotométrique à différents de pH : Détermination de la teneur totale en monomères d'anthocyanes (Giusti & Wrolstad, 2001)

Les anthocyanes se transforment de manière réversible sous l'influence du pH. La forme de cation flavylum de couleur rouge prédomine à pH 1,0 et la forme pseudobases incolore à pH 4,5. La méthode spectrophotométrique à différentes de pH est basée sur la détermination de l'absorbance des solutions extractives diluées avec des solutions tampon de pH 1 et pH 4.5 à une seule longueur d'onde (λ vis-max). Pour cette raison, l'analyse a parcourue quelques étapes. Cette différence correspond aux monomères d'anthocyanes, non condensés. Il s'agit de :

- Préparer deux séries de solutions : une, par dilution de l'extrait dans une solution tampon pH = 1 (KCl 0.025 M/ HCl), l'autre, par dilution de l'extrait dans une solution tampon pH = 4,5 (H₃CCOOH 0.4 M/ HCl). Pour obtenir le pH nécessaire, la solution tampon doit être en excès.
- Etudier le spectre d'absorption pour les deux séries des solutions dans le domaine visible (300-750 nm) pour identifier le λ vis-max et la dilution optimale.
- Mesurer l'absorbance de chaque solution à λ vis-max et a 700 nm, dans un intervalle de 15-60 min de la préparation parce que les anthocyanes sont instable.

- Calculer l'absorbance des solutions diluées :

$$A = (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700}) \text{ pH } 1.0 - (A_{\lambda \text{ vis-max}} - A_{700}) \text{ pH } 4.5 \quad (1)$$

- Calculer le contenu total en anthocyanes à partir de la loi l'absorption Lambert-Beer, pour une cuvette de 1 cm :

$$C = \frac{A * M * D * 1000}{\epsilon * l}$$

C : concentration de solution – mg/L

A : absorbance des solutions diluées (calculé dans l'étape 4)

M : masse molaire de l'anthocyane de laquelle on exprime le contenu (M = 449,2 g/mol pour cyanidin-3- glucoside).

ϵ : absorptivité molaire pour le cyanidine-3-glucosyde ($\epsilon = 26900 \text{ L.mol}^{-1} .\text{cm}^{-1}$ à 520 nm)

l : = 1cm

1000 : facteur pour transformer de g à mg.

3.5. Colorimétrie

La colorimétrie est la discipline psychophysique qui se donne pour objectif la mesure de la couleur. Elle relie des mesures physiques effectuées sur la lumière aux perceptions colorées et permet de déterminer les propriétés d'un objet en fonction de sa couleur.

La colorimétrie Chroma meter CR-400 (Konica Minolta, Japon), avec une source lumineuse D65 et un diamètre de faisceau lumineux de 8 mm, a été utilisée. Les mesures de couleur ont été obtenues en plaçant des échantillons de solution d'anthocyanes dans un récipient en verre avec un fond optiquement transparent. Le système Cielab (Commission internationale de l'éclairage) interprète la couleur de l'échantillon dans un repère cartésien tridimensionnel L^* , a^* , b^* où l'axe de L^* représente la clarté, l'axe des a^* représente une nuance de couleur entre le rouge et le vert, et l'axe des b^* entre le jaune et le bleu. Le logiciel Color Express a été utilisé pour exprimer la couleur des microcapsules après l'encapsulation grâce à trois axes de L^* , a^* , b^* dans l'espace tridimensionnel de couleur du système Cielab.

Le chroma ou saturation C^* et l'angle de teinte corrigé H° ont été calculé pour chaque échantillon. La différence de couleur (ΔE^*) a été utilisée pour mesurer la différence de l'intensité de couleur entre deux échantillons.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$H^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

La stabilité des anthocyanes encapsulés a été évaluée par le changement de leur couleur d'après et d'avant le stockage.

4. Purification et détermination structurale

4.1. Chromatographie sur colonne

La chromatographie est une méthode physico-chimique de séparation basée sur les différences d'affinités des substances présentes dans un mélange à analyser à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. On utilise une colonne en verre équipée d'un verre fritté et d'un robinet. La colonne est remplie d'une poudre, généralement de l'alumine, de la silice, du sephadex ou une résine échangeuse d'ions. Un mélange est placé en haut de la colonne. Selon la nature de l'éluant et du contenu de la colonne, certaines molécules sont plus facilement éluées que d'autres. Dans la chromatographie en phase normal, les composés les plus retenus sont les composés polaires. Le pouvoir d'une phase mobile, qui est en générale un mélange de deux solvants : l'un polaire, l'autre apolaire, dépend de sa propre polarité. Au

cours de la séparation et après avoir isolé les produits apolaires, on peut progressivement augmenter la polarité de l'éluant afin de récupérer les produits les plus polaires. Un gradient d'éluant est donc réalisé.

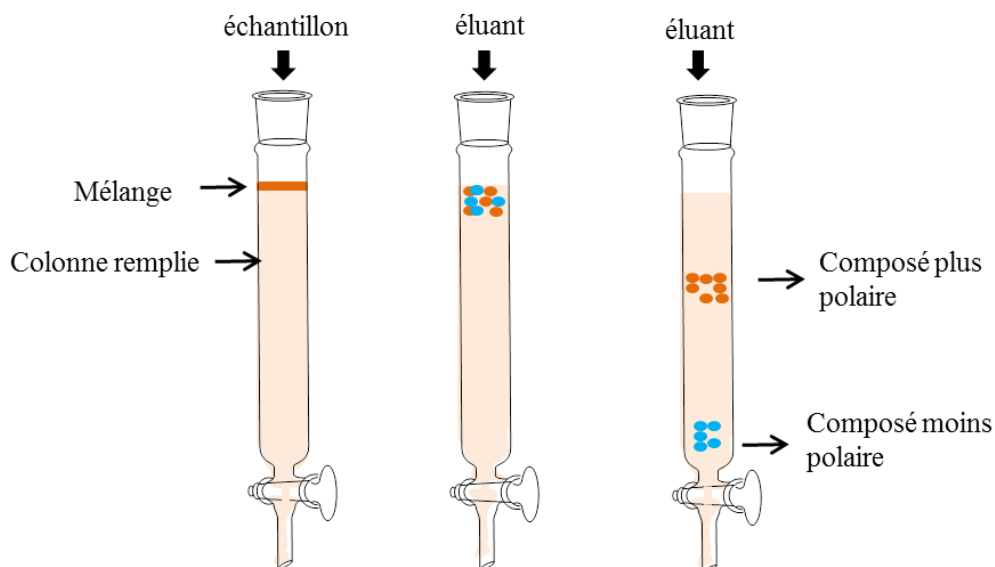


Figure 17. Schéma du tamisage moléculaire

Le remplissage de la colonne est la première étape et aussi l'étape clé pour une bonne séparation. Dans le cadre de notre étude, on a utilisé la méthode remplissage par voie humide. Hexane et Silice ont été bien mélangés afin d'obtenir une bouillie relativement fluide pour pouvoir s'écouler facilement. Avec l'aide d'un entonnoir, on verse suffisamment de bouillie dans la colonne afin que l'adsorbant qui se dépose progressivement constitue une couche d'environ 2 cm. On tapote les parois de la colonne dans le but de favoriser le tassement de l'adsorbant. On ouvre alors le robinet pour que le solvant s'écoule lentement et on continue l'addition de la bouillie par portions successives. Quand tout l'adsorbant est introduit, on laisse ensuite décanter jusqu'à ce que le liquide qui surnage atteigne la limpidité. Les extraits végétaux sont absorbés sur 5 à 10 g de silice dans un solvant adéquat et on dispose le solide obtenu après évaporation au sommet de la colonne, puis on procède à l'alimentation de la colonne en éluant. Pendant l'opération, on veillera à ce que le niveau de solvant soit toujours supérieur à celui de l'adsorbant. On a récupéré les fractions de 10 à 20ml dans des récipients numérotés. L'analyse s'est faite par CCM et les fractions de même composition seront rassemblées.

4.2. RMN : résonance magnétique nucléaire

La RMN est une méthode spectroscopique d'analyse de la matière, impliquant les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. L'échantillon à séparer, que l'on

dispose dans un champ magnétique très intense, obtient une aimantation nucléaire qui est détectée par sa mise en résonance avec un champ électromagnétique.

Le signal d'un proton est caractérisé par son déplacement chimique δ (exprimé en ppm de la valeur du champ magnétique), qui dépend essentiellement de la nature de l'atome qui le porte (carbone, azote ou oxygène le plus souvent) et des autres substituants portés par ce dernier et les atomes adjacents : la présence de substituants comme des $-\text{OH}$, $=\text{O}$, ou celle de liaisons insaturées ($\text{C}=\text{C}$) affectent de façon caractéristique la valeur du déplacement chimique. Par ailleurs, les protons portés par un même carbone ou des atomes adjacents vont présenter des couplages, qui vont se traduire par une multiplicité du signal : le couplage avec un autre proton se traduit par la formation d'un doublet (avec deux protons d'un triplet etc.) et la largeur de ce doublet (exprimée en Hertz) dépend de la valeur des angles dièdres entre les liaisons C-H. La mesure des constantes de couplage permet donc de définir à la fois le nombre des voisins et la stéréochimie de la molécule.

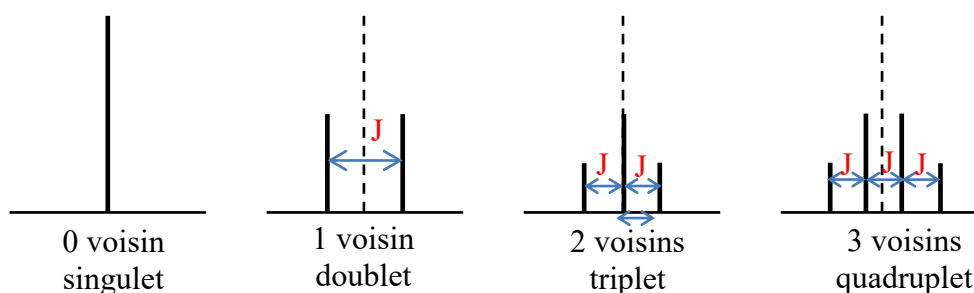


Figure 18. Représentation de couplage vicinal proton et ses interactions

Les résultats d'analyse par RMN sont présentés sous forme de spectres mono (^1H et ^{13}C) et bidimensionnels (HSQC, HMBC, COSY). Chaque donnée fournit des signaux typiques pour la détermination structurale des composés.

Avec l'aide d'un spectromètre Bruker Avance 500 (BrukerBioSpin, Suisse), sous les conditions de fréquence (500 MHz pour le RMN ^1H et 125 MHz pour le RMN ^{13}C), de solvant (Diméthylsulfoxyde – DMSO et chloroforme deutéré – CDCl_3), des spectres mono et bidimensionnels sont obtenus.

RMN ^1H

Le spectre de RMN ^1H procure de nombreuses informations comme les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différentes variantes d'hydrogènes perceptibles dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes « voisins » d'un hydrogène donné ainsi que le déplacement chimique propre à chaque proton.

RMN-¹³C Carbon

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique donne naissance à une crête distincte sur un spectre. Habituellement, ce procédé est un moyen de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse est basée sur les déplacements chimiques observés selon l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience est un moyen de mettre en évidence des carbones primaires (CH₃), secondaires (CH₂), tertiaire (CH) et, dans une moindre mesure les carbones quaternaire (C).

Heteronuclear Single Quantum Correlation (HSQC)

Le spectre HSQC nous permet d'interpréter précisément les couplages hétéronucléaires H-C directs (¹J_{H-C}). La plupart des carbones (sauf carbones quaternaires) sont déterminés.

Heteronuclear Multiple-Bond Correlation (HMBC)

Les données fournies par l'HMBC mettent en évidence les couplages hétéronucléaires H-C à longue distance avec les constantes de couplage ²J_{H-C} ou ³J_{H-C}.

Correlated Spectroscopy (COSY)

La COSY met en évidence les protons avec des couplages géminaux ²J_{H-H} et des couplages vicinaux ³J_{H-H}.

Une corrélation HMBC C_A-H_B à travers n liaisons ainsi qu'une corrélation HSQC C_B-H_B manifestent que C_A et C_B sont séparés par n-1 liaisons. En considérant que n à la valeur de 2 ou 3, cela implique que C_A et C_B sont soit liés ensemble, soit liés à un atome commun indéterminé X. Si tous les voisins de C_A ou de C_B sont connus, le nombre de possibilités pour X est restreint relativement à la situation où les listes de voisins de C_A et C_B ne sont pas totalement connues. Cela nécessite donc en priorité d'analyser les corrélations des atomes dont les voisins sont tous connus. Un méthyle n'ayant qu'un seul voisin, il est nécessaire que l'analyse des corrélations des groupes méthyles se fasse de manière prioritaire, d'autant plus que toutes les corrélations des protons d'un groupe méthyle sont toujours visibles. L'ordre dans lequel les corrélations sont sélectionnées, soit afin d'attribuer des spectres, soit dans le but de trouver une structure, est optimal lorsqu'il n'y a qu'un nombre minimal de possibilités de déduction. Il n'est cependant pas toujours possible de diminuer ce nombre à 1 dans le cas de toutes les corrélations HMBC.

Les informations procurées par un spectre COSY se traduisent également en relations de proximité entre carbones si on dispose d'un spectre HSQC : Une corrélation COSY H_A-H_B à travers n liaisons et les corrélations HSQC C_A-H_A et C_B-H_B indiquent que C_A et C_B sont

séparés par $n-2$ liaisons. Dans le cas où n vaut 2, le spectre HSQC permet de détecter immédiatement si les 2 noyaux ^1H (de δ différents) sont portés par le même carbone. Les corrélations à travers 3 liaisons constituent ainsi un moyen de déduire des liaisons entre atomes de carbone.

CHAPITRE III. RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Éco-extraction des pigments naturels

Les pigments naturels suscitent un intérêt croissant de la part de l'industrie alimentaire en raison de leur importance nutritionnelle et de leurs propriétés antioxydantes. Comme présenté dans le chapitre I, ils sont sensibles à de nombreux facteurs différents, et sont facilement dégradés. Les procédés d'extraction basés sur le blanchiment thermique, la dégradation des tissus par chauffage et l'extraction à haute température sont à proscrire. Dans un premier temps, il s'agissait d'étudier et développer des technologies moins consommatrices d'énergie, moins polluantes et permettant de préserver les composés extraits. Les effets des techniques d'assistance par microondes (MAE) ou ultrasons (UAE) et de nouveaux solvants (liquides ioniques classiques ou réversibles) ont été évalués. Ces premiers résultats sont présentés dans l'article intitulé « **Sustainable processes for the extraction of carotenoids from tropical plants** ».

1.1. Article 1 : Sustainable processes for the extraction of carotenoids from tropical plants

Cette publication est soumise à l'*International Journal of Food Science and technology* sous le numéro IJFST-2018-24512.



International Journal of Food Science and Technology 2018

Original article

Résumé graphique

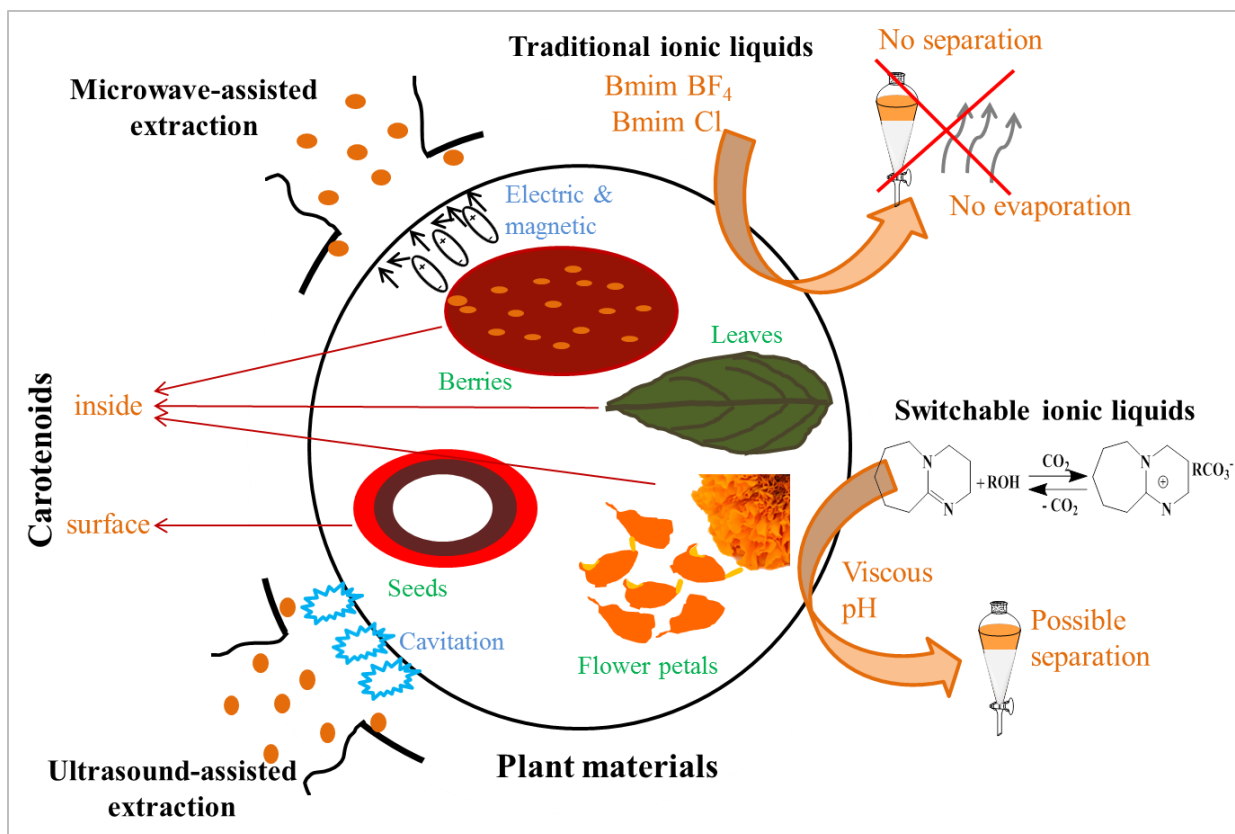


Figure 19. Résumé des résultats de la partie sur l'extraction : l'effet physique de l'assistance facilite la libération des composés par déstructuration du tissu végétal (à gauche) ; l'extraction par liquides ioniques traditionnels ne permet pas une séparation du solvant et nous avons travaillé sur des liquides ioniques réversibles (à droite).

Procédés durables pour l'extraction de caroténoïdes à partir de plantes tropicales

T-Thu Nguyen, Hanh Phan-Thi, Thi Thu Thuy Tran, Giang Vo-Thanh, Yves Waché

Résumé

Les systèmes d'extraction ont un besoin urgent de procédés plus durables utilisant des technologies d'assistance ou des solvants verts. Ces technologies, comprenant l'extraction assistée par micro-ondes (MAE), l'extraction assistée par ultrasons (UAE) et les liquides ioniques (LI), ont été évaluées pour l'extraction de caroténoïdes de divers tissus de plantes tropicales. Pour l'extraction de la zéaxanthine à partir des baies de Goji, l'extraction par solvant a été achevée en seulement trois cycles pour le MAE, tandis que les UAE ont nécessité plus de cycles, mais ont amélioré significativement les résultats par rapport à sans assistance. Pour l'extraction de la bixine à partir de graines de roucou, il n'y avait pas de différence significative entre 3 et 12 cycles avec la méthode MAE et UAE. Mais MAE était toujours un système plus rapide. Pour l'extraction par des LI, une méthode impliquant un système de LI réversibles utilisant DBU a été utilisée pour améliorer la séparation. Un rendement d'extraction élevé a été obtenu à partir de graines de roucou (522 mg de bixine/ 100 g de roucou) après une seule extraction. Cependant, le rendement obtenu avec les LI n'était pas significativement différent ou inférieur à celui du 1-hexanol pour d'autres tissus (baies, pétales). Le liquide ionique réversible utilisé était très efficace pour extraire les caroténoïdes relativement accessibles, mais, en raison d'une viscosité élevée, il perdait son efficacité pour d'autres tissus. Ces résultats montrent que les LI ont un avenir prometteur pour l'extraction des actifs et que certaines techniques d'assistance peuvent déjà améliorer significativement l'extraction par solvant.



International Journal of Food Science and Technology 2018

Original article

Sustainable processes for the extraction of carotenoids from tropical plants

T-Thu Nguyen^{1,2,3,*}, Hanh Phan-Thi^{1,2}, Thi Thu Thuy Tran³, Giang Vo-Thanh⁴, Yves Waché^{1,2}

¹International Joint Laboratory Tropical Bioresources & Biotechnology between UMR PAM (Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France) & SBFT (Hanoi University of Science & Technology, Hanoi, Vietnam).

²The Natencaps project

³Institute of Natural Substance Chemistry, Vietnam Academy of Science & Technology, Hanoi, Vietnam

⁴ Institut de Chimie Moléculaire et des Matériaux d'Orsay, ICMMO, UMR 8182, Laboratoire de Catalyse Moléculaire, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France.

*Corresponding author at: UMR PAM, AgroSup Dijon, University of Burgundy, 21000 Dijon, France

E-mail address: nguyenthu1712@gmail.com

Key words: Microwave-assisted extraction, Ultrasonic-assisted extraction, Carotenoids, Ionic liquid, Switchable ionic liquids, Plant pigments

Summary

Extraction needs more sustainable processes using assistance technologies or green solvents. Microwave-assisted extraction (MAE), ultrasonic-assisted extraction (UAE) and Ionic liquids (IL) were evaluated for the extraction of carotenoids from various tissues of tropical plants. For zeaxanthin extraction from Goji berries, solvent extraction was completed in three cycles for MAE whereas UAE required more cycles but improved significantly results compared to without assistance. For bixin extraction from annatto seeds, 3 cycles with were sufficient for both assistance technologies. For IL extraction, a method involving a switchable IL system was used to improve separation. A high extraction yield was obtained from annatto seeds (522 mg bixin/ 100 g seeds) after only one extraction. However, the yield obtained with IL was not significantly different or lower than that of 1-hexanol for other tissues (berries, petals). The switchable ionic liquid used was very efficient to extract carotenoids relatively accessible, but, due to a high viscosity, lost its efficiency for other tissues.

Introduction

The production of natural phytonutrients is a source of income for many tropical countries especially in South-East Asia. Indeed, this region possesses a large and fragile biodiversity which is classified in the biodiversity hot-spots list. It is thus interesting to improve extraction procedures as well as to identify new potential plant sources while taking care of the plant heritage. Pigments as carotenoids can be particularly rich under tropical climates as these compounds, besides providing an attractive colour, can be related to the adaptation to sun radiations. Several carotenoids are obtained from plants after extraction. Carotene can be extracted from carrots and algae, lycopene from tomatoes etc. There is now a growing interest for extraction from tropical plants like zeaxanthin which can be extracted from goji berries (*Lycium chinensis*).

Among the characteristics of extraction processes, it is important to have a low release of toxic solvents and Volatile Organic Compounds (VOC), low energy consumption and to avoid the presence of remaining solvents in the extract. When pigments are concerned, due to their high fragility, extraction has also to keep soft extraction conditions.

Plant pigments can be used as natural food colours or as compounds active for health. They all have in common a conjugated double bonds part responsible for colour. This part makes them very reactive and sensitive to oxidation through reactive oxygen species, heat, light etc. As they can have different roles in plants, they can be present in various tissues (leaves, flower and flower buds, fruits etc.) making them more or less difficult to extract.

Extraction processes are often not sustainable, generating toxic compounds, dangerous, expensive or having a negative carbon balance. Industry is thus expecting new technologies that will present only positive properties. However, although being an active and innovating field, extraction keeps being based on the fundamental principles that are the use of a solvent diffusing into the solid, able to solubilise the active and that can be separated for harvesting the active. Breakthrough innovations have concerned the discovery of new solvents, with the development of supercritical fluids and, more recently, of ionic liquids. Upgrade innovations, for their part, can be based on ways to assist solvent extraction, increasing diffusion of the solvent by increasing temperature or disrupting tissues etc. Main physical techniques of assistance are irradiation by microwaves or ultrasounds. Both, microwave-assisted extraction (MAE) and ultrasonic-assisted extraction (UAE), have been shown to allow reduced solvent consumption and shorter extraction times, while the extraction yields are equivalent or even

higher than those obtained with conventional methods (Kaufmann & Christen, 2002; Konwarh, Pramanik, Kalita, Mahanta, & Karak, 2012). Microwaves cause heating via two simultaneous mechanisms, taking place inside the matrices and leading to the originality of this technique which, unlike classical conductive heating methods, sees heat transfer coming from the inside to the outside of raw materials, leading to the disruption of the tissues and subsequent improvement of solvent penetration and of the dissolution of the active (Kaufmann & Christen, 2002; Siquin, Goner, & Dellacherie, 1993). In UAE, the transfer of ultrasonic waves is from the outside to the inside of raw materials forming cavitation bubbles near the solid surface due to the pressure difference. This can result in implosions towards the solid surface, as well as to a local increase of temperature and pressure (Konwarh et al., 2012), provoking eventually a disruption of the cell walls and release of the content.

Supercritical fluid extraction is the major innovation concerning the extraction fluids. It has developed mainly for supercritical CO₂ as the supercritical point is relatively easy to reach and as CO₂ is not explosive and generates no VOC. Some drawbacks that can impede its development are the cost of equipment and operations, the fact that CO₂ is not always adequate for extraction and other fluids that can be added to improve the process are often polluting and, eventually, that CO₂ releases are in the focus (Ooi & Heng, 2018 *in press*).

It is thus necessary to evaluate other concepts that could become new technologies. Among them, the use of ionic liquids (IL) has been mentioned as a potential green technology (Farid Chemat, 2011; Han & Armstrong, 2007; Martins, Braga, & De Rosso, 2017). ILs are salts possessing a low fusion temperature making them liquid below 100°C and sometimes at ambient temperatures. They have been developed for their flexible solvation properties resulting in modular applications and for their negligible vapour tension. This later property results in an easy harvesting of the active through distillation without loss of solvent or VOC emission and with a high recycling yield. However, despite the growing usage of IL, their utilisation for the extraction of heat-sensitive natural compounds remains to be demonstrated due to viscosity/diffusion, separation and scale issues.

Our study aims at evaluating the potential of green technologies such as MAE and UAE and IL on the extraction of hydrophobic or hydrophilic pigments from various tissues of tropical plants.

Materials and methods

Materials

In the framework of this article, we focused on five tropical plants rich in carotenoids as new sources of natural colours. Goji berry (*Lycium chinense*), annatto seeds (*Bixa orellana* L.),

marigold flower (*targetes erecta* L.) and two leaf-vegetables, “Bo ngot” (*Sauropus androgynus*) and “Tia To” (*Perilla frutescens*) were naturally rich in zeaxanthin, bixin, lutein and twice β -carotene, respectively. They were obtained from Viet Nam.

Ethanol 96%, n-hexane, petroleum ether, acetone, chloroform, 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene (DBU), 1-butanol, 1-hexanol, were obtained from Sigma Chemical Company (Fontanals et al.). The plates for the thin-layer chromatography (TLC) -10x20cm with silica gel 60 were obtained from Merck.

Assisted extraction of carotenoid

Before being extracted, plant materials were pre-treated by grinding with a mini chopper (Moulinex AT710131, France) and soaking in ethanol 50 % (v/v) for 12h for lycium samples only. The solvent of extraction, the time and number of extraction and the extraction methods support were chosen depending on the plant tissues. They are given in the results part. The microwave SM 117 (Proline, China) and the ultrasonic vibration cell VC-250 (Sonics & materials INC., USA) were used for the study. A microwave power corresponding to a capacity of 50 to 60 W was used. After each extraction cycle, the extracts were filtered, collected and then evaporated under reduced pressure. The condensed extract was recovered and stored in a freezer.

Extraction of carotenoid with switchable ionic liquids

DBU salts were prepared by bubbling CO₂ through equimolar mixtures of DBU and alcohols at 1 atm, with the mole ratio of 1:1. A tube was inserted and CO₂ bubbled through the DBU/alcohol liquid at a constant rate for 1 h to make sure that the reaction was completed. The solution was stirred with a magnetic rotor during the bubbling operation.

0.5 g material was mixed with 2 g switchable IL and extracted by microwave for 2 minutes. The extract was then bubbled with N₂ for 1 h in order to return IL in the molar liquid phase and filtered. HCl 1N was added in excess in the extract to react with DBU to create [DBU]Cl - a water-soluble salt. Two phases were obtained thereby, an organic phase consisting in pigments in hexanol, and a water phase with [DBU]Cl in water and residual HCl. The pigments were recovered by evaporation of hexanol and the DBU was recovered by adding NaHCO₃ to neutralize HCl and release DBU.

TLC

The mobile phases were mixtures of toluene/acetone (5:1) to analyse annatto extract, of dichloromethane/methanol (19:1) to analyse marigold flower extract and of petroleum ether/acetone (95:5) to analyse goji berry, Bo ngot and Tia to extract.

Spectrophotometry

The concentration of carotenoids was calculated according to the Lambert - Beer law:

$$C = (A \cdot Dilution) / (E_{cm}^{1\%} * l * 10000)$$

With C: the concentration of the compound in solution, expressed in mg.L⁻¹, A: the absorbance, the mass absorption coefficient E^{1%}_{cm} - absorbance of a solution of 1 g/100 mL (see Table 1) and l: the length of the optical path in the solution (1 cm).

Table 1: The mass absorption coefficient of carotenoids in this study (Rodriguez-Amaya, 2001)

Carotenoid	λ_{max} , nm	E ^{1%} _{cm}
β-carotene	450	2592
zeaxanthin	450	2540
bixin	456	4200
lutein	445	2550

HPLC

The HPLC system was composed of a Chrom Elite HPLC pump L-2130; an automatic injector; a L-2455 diode array detector (DAD); and a column C30 AcclaimTM (C30, 5 μ m, 4.6x150 mm) Dionex, Thermo Scientific. The mobile phase was a mixture of MTBE (Methyl tert-butyl ether) – acetonitrile – methanol (50/15/35, v/v/v) with a flow rate of 1,0 mL/min; The analysis was in the range of 220 to 600 nm, the injection temperature was 10 °C and the analysis time, 30 min.

NMR

The NMR system was a Bruker Avance (Bruker, Rheinstetten, Germany). ¹H NMR spectra of DBU, alcohols and carbonate salts were acquired at 250 and 300 MHz, at room temperature.

Statistical analysis

All analyses were carried out at least in triplicate and results were expressed as means \pm standard deviation. Differences between variables were tested for significance using a one way ANOVA.

Results and discussion

Assisted extraction

Materials selection

Different tissues rich in carotenoids and possessing different structures were selected: leaves of *Sauropus androgynous* (SA) and *Perilla frutescens* (PF); annatto grain, goji berry and marigold flower. For assisted solvent extraction, plants were extracted in several extraction cycles until the residues lost their colour. The results of TLC and spectrophotometry showed that the extracts of SA and PF contained a variety of pigments among which the existence of β -carotene was confirmed (figure 1). However, the HPLC results showed that the β -carotene content was low compared to that of other compounds (data not shown). These complex mixtures made the extraction and purification of β -carotene from these two leaves difficult. For this reason, leaves of SA and PF were considered as not interesting for the purpose of our work and were not kept further in the study. In contrast, the results of TLC analyses confirmed that zeaxanthin, bixin and lutein pigments were the major pigments in extracts of goji berries, annatto seeds and marigold flower, respectively. These plants were kept for further study, and the results are presented in detail in the following sections.

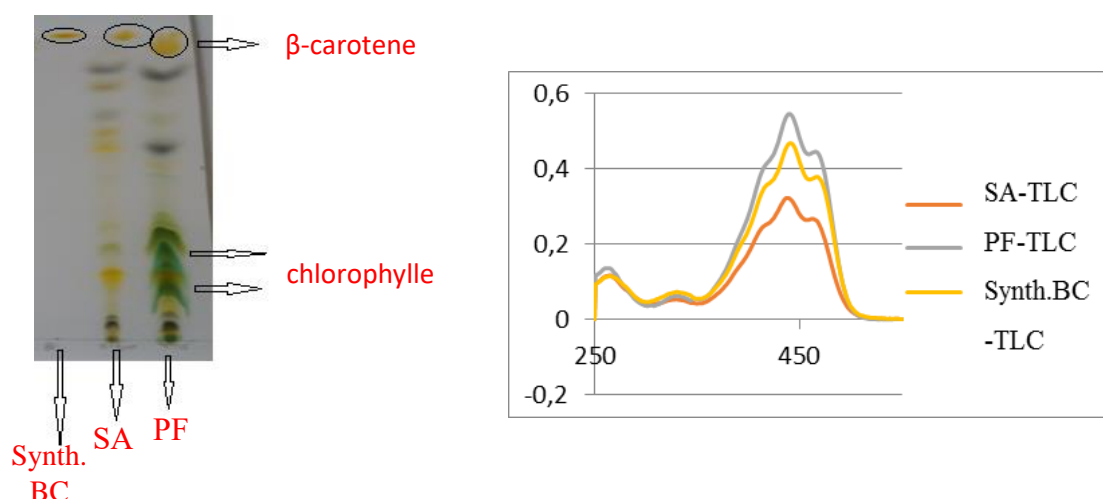


Figure 1: Separation by TLC of the pigments of SA and PF compared to a sample of synthetic carotene (left) and UV-Vis spectra of TLC-separated carotene of SA and PF.

Choice of the protocol of assistance

a, Microwave Assisted Extraction procedure

The procedure for the MAE of natural carotenoids has been optimised based on the monitoring of the actual temperature of the sample during extraction because carotenoids are easily denatured at higher temperatures starting at 60 °C for zeaxanthin and at 50 °C for bixin. Extractions were performed in triplicate in independent assays on 20 g dry goji berries in 150 ml hexane, in a 250 ml flask with pre-treatment or on 10 g dry annatto seeds in 200 ml ethanol 96%. After 3 minutes of irradiation, the sample temperature had increased rapidly to 67 °C for goji berries and to 72 °C for annatto seeds. Therefore the assistance process by

micro wave was punctuated by short pauses. Each microwave assisted extraction cycle included the three heating steps which are shown in figure 2.

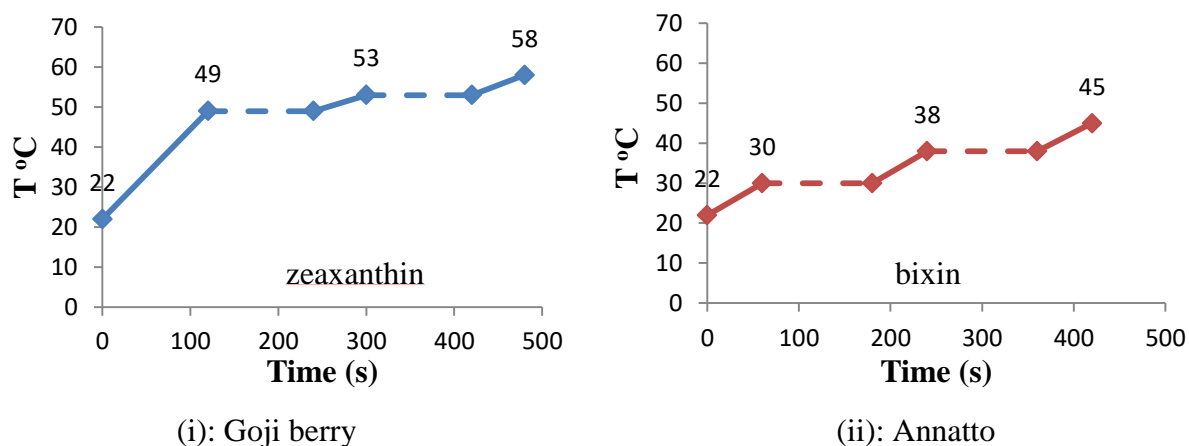


Figure 2: Sample temperature reached during discontinuous irradiation.

b, Ultrasound Assisted Extraction procedure

The UAE procedure of natural carotenoids has been optimised through experiments on goji berries. The effects of continuous and discontinuous ultrasonic treatments on the extraction yields were compared (figure 3). The results showed that the performance of the discontinuous UAE was significantly higher than the one of continuous UAE, hence we kept the discontinuous mode to compare the extraction yields of the following different extraction powers, 22, 26, 30 MHz. The power of 26 MHz was the most effective with an extraction efficiency which was clearly the highest. Therefore, the UAE procedure was established with discontinuous method at the power of 26 MHz.

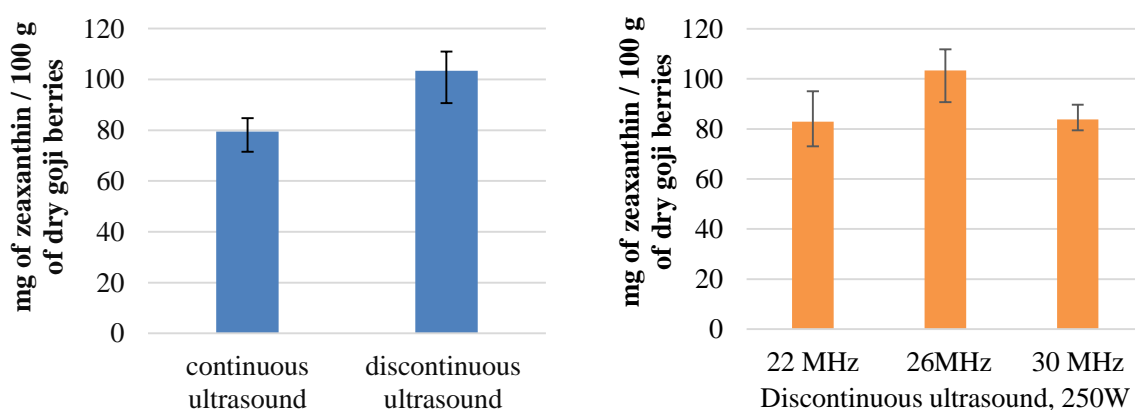
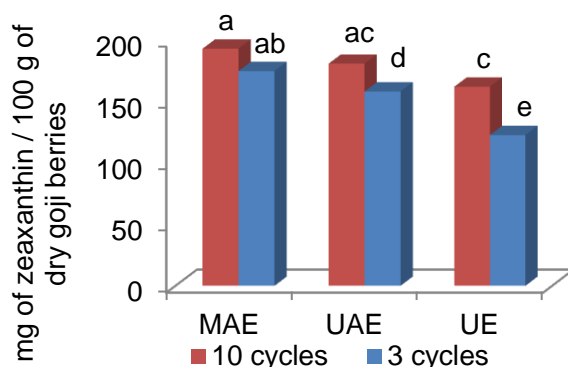


Figure 3: Extraction yield from goji berries after the first cycle depending on the irradiation method and power.

Effect of the number of cycles of extraction and of technical assistance

a, Goji berries

The amounts of zeaxanthin obtained after 3 and 10 cycles of extraction using microwave-assisted-, ultrasound-assisted- and unassisted (UE)- extraction are shown in [figure 4](#). One way ANOVA was used to evaluate the significance of the results. The values presented are the mean of triplicates.



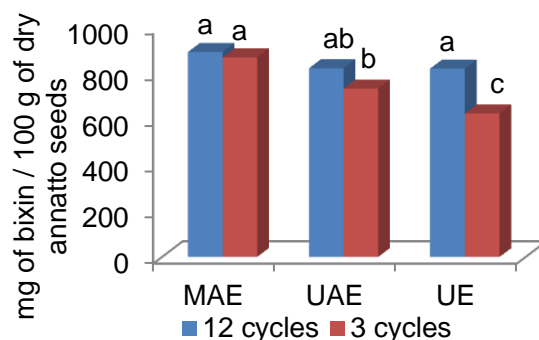
Different letters differ significantly, $p < 0.05$

Figure 4: Comparison of amounts of obtained zeaxanthin (mg/100 g goji berry) after a 3- and 10-cycle extraction.

Results in [figure 4](#) show that significant differences ($P < 0,05$) are observable between the three methods after three cycles extraction. After 10 cycles, the yield obtained for the method without assistance is lower than for the two other methods ($P < 0.1$). In the MAE method, the result is not significantly increased after 10 cycles compared with 3 cycles ($P < 0,05$), whereas for the UAE and UE, the results are still improving between 3 and 10 cycles. Finally, the extraction of goji berries assisted by microwave is the most effective with three cycles of extraction that are sufficient to extract the pigment. This result is consistent with the principle of action of microwaves as in goji berries; zeaxanthin is located in the tissues of the berry.

b, Annatto seeds

The yield of two assisted methods MAE and UAE were compared with the unassisted method. Moreover the quantities of bixin obtained from annatto after three and twelve cycles were also compared to choose the optimal number of cycles to shorten the extraction time and reduce the solvent used.



Different letters differ significantly, $p < 0.05$

Figure 5: Comparison of amounts of bixin obtained after 3 and 12 cycles extraction.

According to the statistical analysis of one way ANOVA with $P < 0,05$, there was no significant difference between assisted and unassisted extraction after 12 cycles and we can assume that most of the bixin has been extracted. For MAE, this yield of extraction is already reached after 3 cycles showing that this method is the most effective of the three methods. For UAE yields are significantly greater than for extraction without assistance. In addition, the improvement between three and twelve cycles is not significantly ($P < 0.1$). It is clear that the effect of ultrasound on annatto seeds is more efficient than on goji berries and the difference between the yield of microwave and ultrasound on annatto seeds was lower than in goji berries. These results on a pigment present on the surface of the tissue could be expected from the mechanism of action of ultrasounds.

Extraction with Ionic liquids

As a first try of extraction of pigments with IL, we carried out the extraction of hibiscus anthocyanins with 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (Bmim BF₄) and 1-butyl-3-methylimidazoliumchloride (Bmim Cl). The IL preparation was 0.75 M. The apparent result of extraction was positive as the IL became red. However, it was not possible to extract this hydrophilic pigment from the IL preparation with food compatible solvents, and, due to the sensitivity of anthocyanins to heat, distillation was not possible.

Extraction with switchable ionic liquids

Some recent researches have been developing new possibilities of ionic liquids that can be easily made or undone (Anastas, 2013; Jessop, Heldebrant, Li, Eckert, & Liotta, 2005b; Phan et al., 2008). In the present study, we used the switchable IL systems based on amidine 1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene (DBU) and alcohols. Beginning with the shorter chain length alcohol, ethanol, DBU salt was synthesised by bubbling CO₂. Unfortunately, this ionic compound was not liquid at ambient temperature, forming a white solid (figure 6).

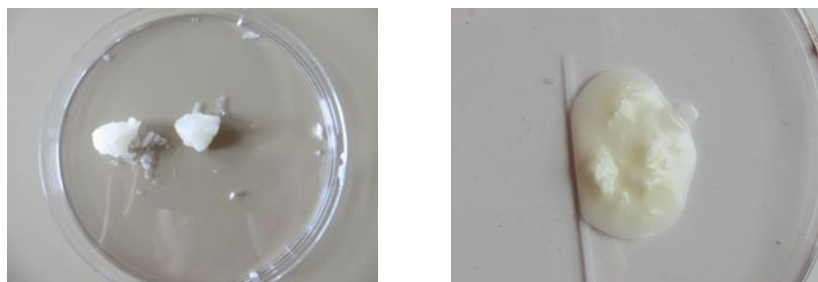


Figure 6. Salts obtained with DBU and alcohols. Left, solid salt obtained with ethanol, right, viscous ionic liquid obtained with hexanol.

It was thus necessary to change the alcohol component and a salt was made of DBU and butanol, resulting in a similarly solid salt. With hexanol, a liquid was obtained, although rather viscous. Both synthesised ionic compounds were characterised by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy to confirm the presence of carbonate salts (figure S3 and S4 in supplementary data).

The switchable IL made of DBU and hexanol was used for extraction. As preliminary results, this system was tested on the extraction of two polyphenolic compounds, anthocyanins from *Hibiscus* and curcumin from curcuma (results not shown). High pH of DBU salts changed the colour of the anthocyanin and curcumin extract to dark blue and red, respectively. The colour of the extracts confirmed that the extraction was efficient but the colour of anthocyanin and curcumin extracts turned to pale red and orange, respectively, when HCl was added to separate the DBU. We used thus this system to extract carotenoids from goji berry, annatto seeds and marigold flower as these compounds are less sensitive to pH. Yields obtained after one extraction are given in [table 2](#) and compared with results obtained after one cycle of solvent extraction.

Tableau 2: Yields of extraction of carotenoids by DBU/hexanol/CO₂ and 1-hexanol (mg of carotenoids / 100 g of dry material).

Materials / solvents	DBU/hexanol/CO ₂	1-hexanol
Annatto seed	522.67 ± 17.38 ^a	273.42 ± 10.36 ^b
Goji berry	26.59 ± 3.60 ^c	32.44 ± 1.77 ^c
Marigold flower	502.76 ± 30.86 ^d	677.80 ± 26.03 ^e

Different letters differ significantly, $p < 0,05$

Three cases were observable concerning the comparison between IL and solvent extraction. Either IL or hexanol was better, for annatto and marigold, respectively, or the two solvents gave similar results as for goji. The very high extraction yield obtained from annatto seeds but not for other tissues could be explained by a good capacity of dissolution of carotenoids but a

low diffusivity. Due to the rather viscous state of the IL, the advantage exhibited on carotenoids present on the surface of annatto is lost for goji for which results are similar between the solvents. In our study, there are also physicochemical differences between the carotenoids with bixin which is more polar and smaller than zeaxanthin and lutein. Therefore, the affinity of carotenoids towards the solvent can be slightly different as well as the diffusivity of the molecule inside the tissues. However, the IL diffusivity seems to be the key parameter.

Discussion

Carotenoids are among the most widespread of the natural groups of pigments. They comprise a large family of C40 polyenes with an isoprenoid structure which provides them many physical, chemical and biological properties (Cao-Hoang, Fougère, & Waché, 2011). Carotenoid extracts are desirable for use in dietary supplements and as additions to processed foods. Over the years, numerous scientific studies have attempted to develop the improved extraction methods for carotenoids. The vegetable matrices and the extraction parameters (e.g., solvent, pressure and temperature) have important influences for the efficient extraction of carotenoids (Arvayo-Enriquez, Mondaca-Fernandez, Gortarez-Moroyoqui, Lopez-Cervantes, & Rodriguez-Ramirez, 2013; Saini & Keum, 2018). The choice of solvent is the most critical factor for efficient extraction of carotenoids, and depends mainly on the carotenoid composition of the food. A large number of studies have been conducted to evaluate the efficiency of various solvents. However, no precise recommendations can be made to use a specific solvent or solvent mixture for a particular sample (Saini & Keum, 2018).

For carotenoid pigments that are usually non-volatile and heat-sensitive, classical ionic liquids are not adapted for recollection of the pigment. Switchable ionic liquids are preferable but have to be carefully designed for the best affinity of the active and the lowest viscosity resulting in an acceptable diffusivity. From our results, it seems that ionic liquids, despite a deal of interesting properties that can make them one day the ultimate family of solvents for extraction, are still requiring some technology efforts of optimisation for pigments extraction. Last but not least, the concern of regulation in relation with authorisation of use, toxicity and possible labelling as green solvents is still waiting for response (Martins et al., 2017; Zhu et al., 2009). As highly tuneable solvents that can be designed with various cations and anions, there is still a high potential for developing new ILs and there is a recent trend on food-compatible ILs (Toledo Hijo, Maximo, Costa, Batista, & Meirelles, 2016) that are still to be

developed for affinity diversification, with solvents that could be adapted for hydrophobic long chain carotenes, and, more difficult, for switchability.

In this context and taking into account that really few industrial processes are presently based on ILs (Martins et al., 2017), assistance is a good short- and medium-term alternative to reach a greener extraction. Our results show that, depending on the pigment and on the plant tissue structure, assistance can improve significantly the extraction process. In our examples, MAE was always a rapid system with results after 3 cycles being not significantly different from those obtained after 10 or 12 cycles which were the best results obtained. UAE was also improving results compared to without assistance but reached the same level as MAE after 10 cycles for goji and 12 cycles for annatto.

As a conclusion from our results, microwave assistance is helpful for all types of extraction whereas ultrasounds are particularly efficient when pigments are present on the surface of plant tissues. Switchable ionic liquids were very efficient to extract carotenoids relatively accessible. For extraction inside tissues, a new ionic liquid should be designed that would be more fluid and thus would present a better diffusivity. Such an IL is not available with DBU salts and another salt should be targeted.

Acknowledgements

The authors are thankful to Christine Rojas for technical help. The project was supported by BPI (OSEO A1108002D) in the frame of the Natencaps project and by AgroSup Dijon, in the frame of the International Joint Laboratory Tropical Bioresources & Biotechnology. Nguyen Thi Thu was granted by the Agency of French speaking Universities.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

- Anastas, Paul T. (2013). Handbook of Green Chemistry. In W. Leither & P. G. Jessop (Eds.), vol. 4 (pp. 508).
- Arvayo-Enriquez, Hector, Mondaca-Fernandez, Iram, Gortarez-Moroyoqui, Pablo, Lopez-Cervantes, Jaime, & Rodriguez-Ramirez, Roberto. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5(12), 2916-2924.
- Cao-Hoang, Lan, Fougère, Rémi, & Waché, Yves. (2011). Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. *Food Chemistry*, 124(1), 42-49.

- Chemat, Farid. (2011). éco-extraction du végétal - procédés innovants et solvants alternatifs. In). Paris Dunod.
- Fontanals, Núria, Borrull, Francesc, & Marcé, Rosa M. (2012). Ionic liquids in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 41, 15-26.
- Han, Xinxin & Armstrong, Daniel W. (2007). Ionic Liquids in Separations. *Accounts of Chemical Research*, 40(11), 1079-1086.
- Jessop, Philip G., Heldebrant, David J., Li, Xiaowang, Eckert, Charles A., & Liotta, Charles L. (2005). Reversible nonpolar-to-polar solvent. *Nature*, 436, 1102.
- Kaufmann, Béatrice & Christen, Philippe. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113.
- Konwarh, Rocktotpal, Pramanik, Sujata, Kalita, Dipankar, Mahanta, Charu Lata, & Karak, Niranjana. (2012). Ultrasonication – A complementary ‘green chemistry’ tool to biocatalysis: A laboratory-scale study of lycopene extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 292-299.
- Martins, Paula Larangeira Garcia, Braga, Anna Rafaela, & de Rosso, Veridiana Vera. (2017). Can ionic liquid solvents be applied in the food industry? *Trends in Food Science & Technology*, 66, 117-124.
- Ming, Ooi Shing & Paul, Heng Wan Sia. (2018 in press). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactives – A Southeast Asia Perspective. In R. Cachon, P. Girardon & A. Voilley (Eds.), *Gases in Agro-Food Processes*: Academic Press.
- Phan, Lam et al. (2008). Switchable Solvents Consisting of Amidine/Alcohol or Guanidine/Alcohol Mixtures. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(3), 539-545.
- Rodriguez-Amaya, D.B., Institute, International Life Sciences, & OMNI. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*: ILSI Press.
- Saini, Ramesh Kumar & Keum, Young-Soo. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90-103.
- Sinquin, a, Gorner, T, & Dellacherie, E. (1993). L'utilisation des micro-ondes en chimie analytique. *Analisis*, 21, 1-10.
- Toledo Hijo, Ariel A. C., Maximo, Guilherme J., Costa, Mariana C., Batista, Eduardo A. C., & Meirelles, Antonio J. A. (2016). Applications of Ionic Liquids in the Food and Bioproducts Industries. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(10), 5347-5369.
- Zhu, S. et al. (2009). *A Mini-Review on Greenness of Ionic Liquids (Vol. 23)*.

Supplementary data

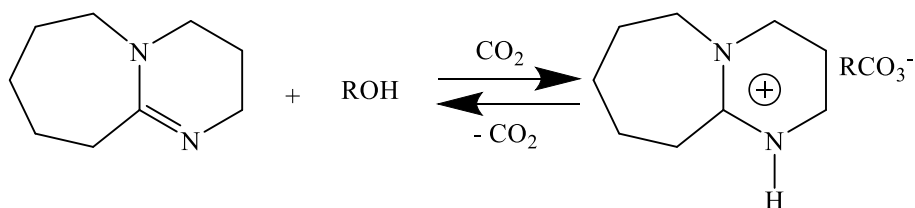
Syntheses of ionic liquids of amidine/ alcohol

Figure S1. Protonation of DBU (1,8-diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-ene) in the presence of an alcohol and carbon dioxide is reversed when CO₂ is removed (R = H or a group alkyl) (Jessop et al., 2005a)

Synthesised ionic compounds [DBUH]O₂COR] were characterised by means of nuclear magnetic resonance spectroscopy to confirm the presence of carbonate salts.

¹H spectra in solution were recorded on Bruker AC 250 or Bruker AC 300 spectrometers (Bruker, Rheinstetten, Germany) at room temperature. Deuterated chloroform was used as solvent for liquid NMR experiments, and chemical shifts were reported as δ values in parts per million relative to tetramethylsilane. The numbering system used for positions in the DBU structure is shown in figure S2.

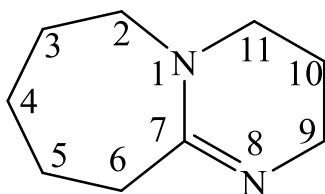


Figure S2. Numbering system for positions in the structure of DBU

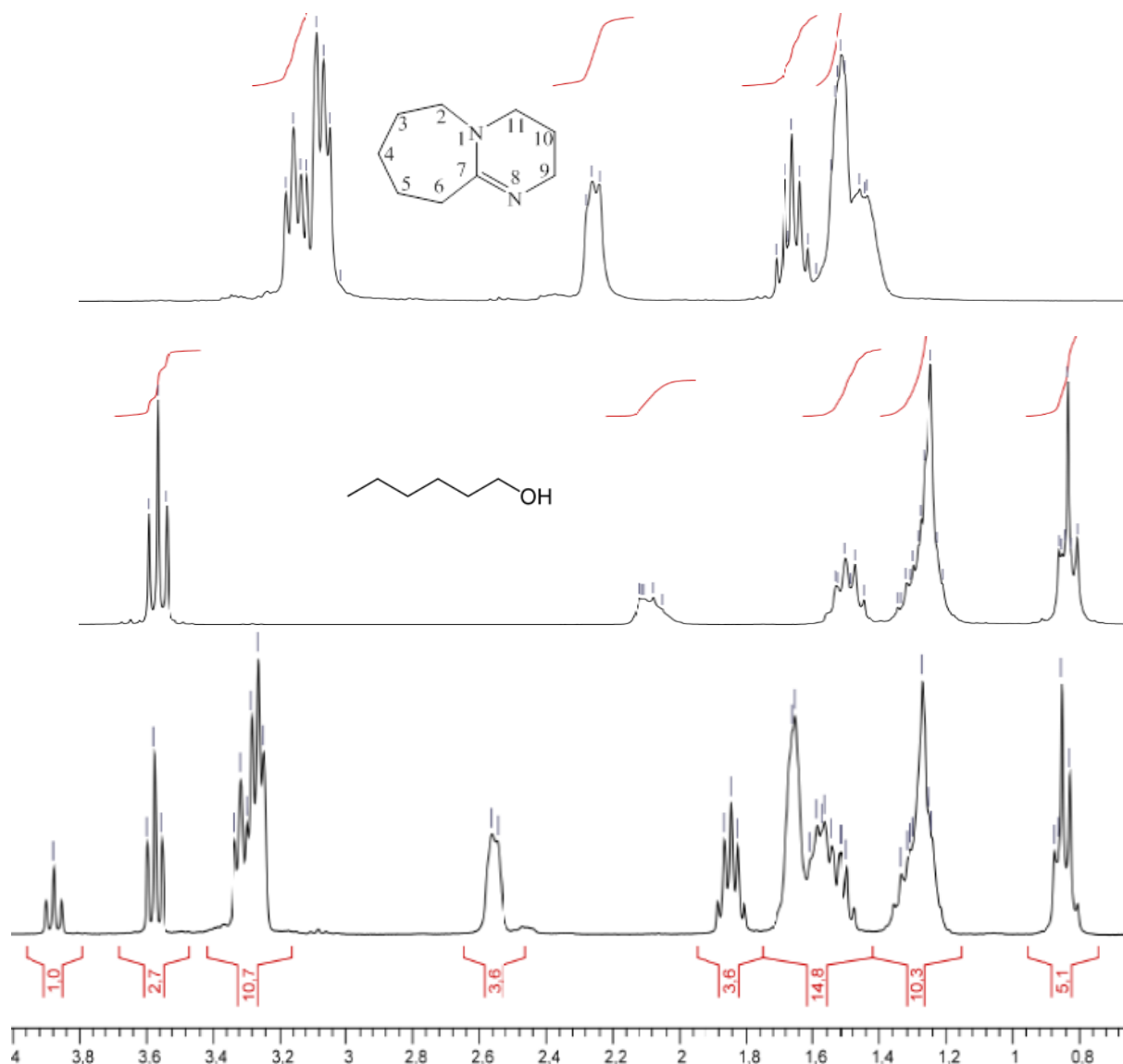


Figure S3. ^1H spectra (CDCl_3) of DBU, 1-hexanol and $[\text{DBUH}]\text{O}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$

$[\text{DBUH}]\text{O}_2\text{CO}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$: ^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm) 3,88 (t, 1H, DBUH H-8), 3,58 (t, 2H, hexyl H-1), 3,31 (m, 4H, DBUH H-11, H-2), 3,26 (m, 2H, DBUH H-9), 2,56 (br, 2H, DBUH H-6), 1,85 (quintet, 2H, DBUH H-10), 1,65-1,57 (m, 6H, DBUH H-3, H-4, H-5), 1,55 (overlap, 2H, hexyl H-2), 1,34-1,24 (m, 6H, hexyl H-3, H-4 and H-5), 0,85 (t, 3H, hexyl H-6).

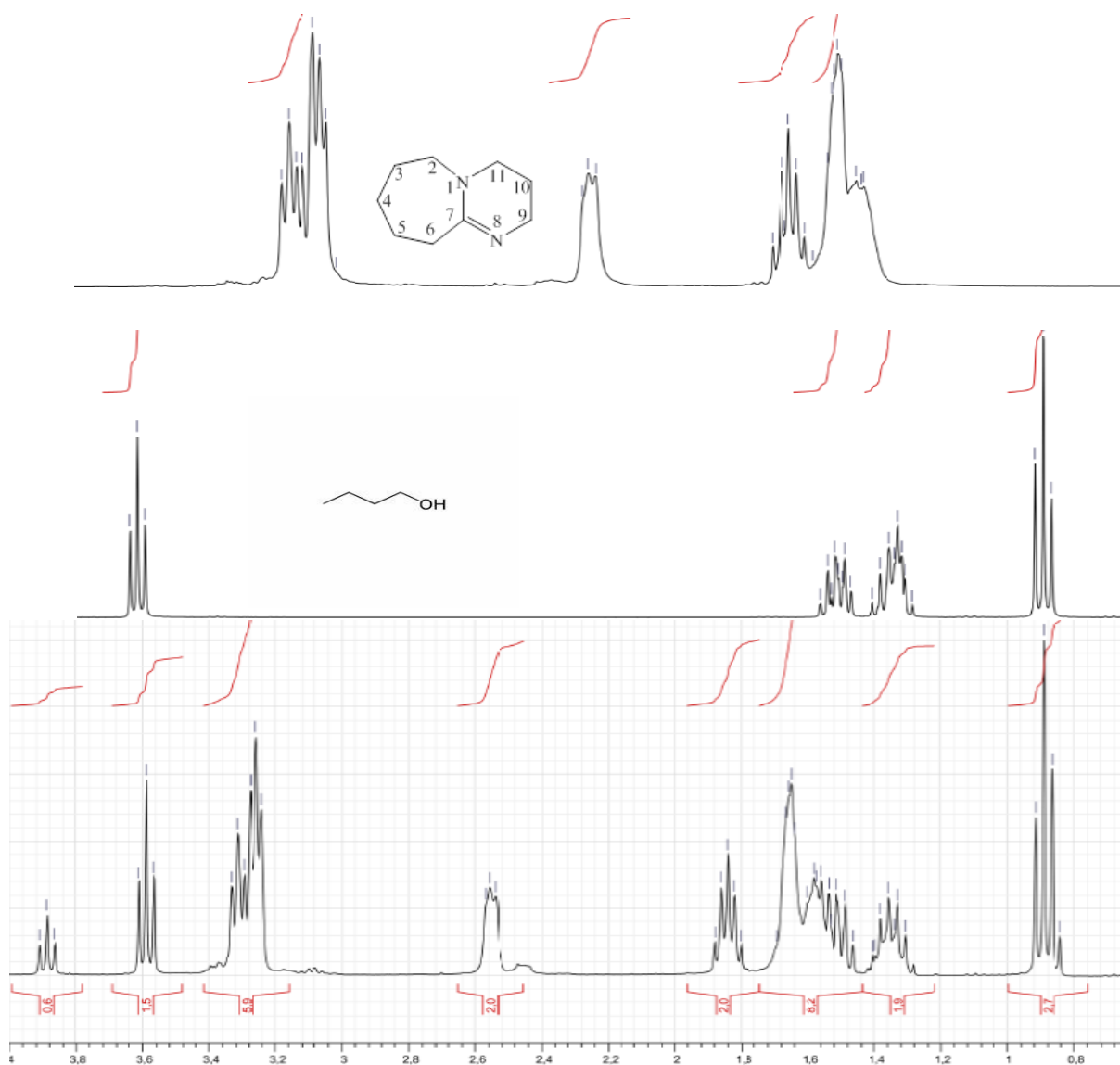


Figure S4. ¹H spectra (CDCl₃) of DBU, 1-butanol and [DBUH]O₂CO(CH₂)₃CH₃

[DBUH]O₂CO(CH₂)₃CH₃: ¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm) 3,89 (t, 1H, DBUH H-8), 3,59 (t, 2H, butyl H-1), 3,30 (m, 4H, DBUH H-11, H-2), 3,25 (m, 2H, DBUH C9), 2,56 (br, 2H, DBUH H-6), 1,85 (quintet, 2H, DBUH H-10), 1,69-1,56 (m, 6H, DBUH H-3, H-4, H-5), 1,52 (m, 2H, butyl H-2), 1,36 (m, 2H, butyl H-3), 0,88 (t, 3H, hexyl H-4).

NMR results show both DBU and alcohols samples without any impurity substances. For the spectrum of the reaction product, a peak of N-H proton of DBU appeared and protons of DBU ring moved towards the lower field, which show the 1-alkyl carbonate salts of DBU synthesis were created. Furthermore, the ¹H NMR spectrum, although broadened because of viscosity, clearly showed complete conversion to [DBUH][O₂COR], with no residual signals for free 1-hexanol/ 1-butanol or unprotonated DBU.

1.2. Extraction d'anthocyanes d'*hibiscus* pour encapsulation

Les anthocyanes sont des composés hydrophiles. Elles sont solubles dans l'eau et aussi dans l'alcool (éthanol, méthanol). À partir des travaux d'extraction assistée par micro-ondes de caroténoïdes, nous avons choisi le protocole utilisé pour l'extraction à partir de roucou, qui utilise le solvant éthanol, pour évaluer la capacité d'extraction d'anthocyane d'*Hibiscus* de trois solvants différents : eau, éthanol et méthanol.

Vingt grammes de poudre de calice d'*Hibiscus* séché ont été mélangés avec 200 ml de solvant avec la présence d'acide chlorhydrique 1 N à 1% (v/v), 1,5 minutes dans un micro-onde domestique (≈ 50 W) puis 13,5 minutes à 27 °C, 140 rpm (Agitateur Orbital Incubateur Thermoshake, Gerhardt, Allemagne). Cette étape a été répétée trois fois. Après chaque cycle d'extraction, les extraits ont été filtrés à travers un papier filtre (Whatman n°1). La teneur en solvant a été éliminée au-dessous de 50 °C sous pression réduite au moyen d'un évaporateur rotatif (Stuart RE300, Staffordshire, Royaume-Uni). La teneur d'anthocyanes a été mesurée par spectrophotométrie à différents pH. Les résultats sont présentés dans la figure 20a. Il y avait des différences significatives entre les trois solvants ($p < 0,05$). L'eau a montré le meilleur rendement d'extraction, $599,39 \pm 0,27$ (mg/100 g d'*hibiscus*) d'anthocyane totale. Elle a donc été gardée comme solvant pour l'étape suivante qui consistait à évaluer les effets de l'assistance.

Les conditions d'assistance sont citées dans le tableau 16 et les rendements d'extraction sont présentés dans la figure 20b. L'extraction assistée par micro-ondes est la plus efficace. Son rendement d'extraction est le plus élevé avec une différence significative à p value 0,05. L'extraction assistée par micro-ondes avec l'eau comme solvant a donc été utilisée pour la préparation des extraits concentrés d'anthocyanes afin de réaliser l'encapsulation.

Tableau 16. Les conditions d'extraction d'anthocyanes à partir *Hibiscus sabdariffa*

	Assistance par micro-onde	Assistance par ultrason	Sans assistance
Solvant	eau avec la présence d'acide chlorhydrique 1 N à 1% (v/v)		
Proportion (g.mL-1)	1 : 10	1 : 10	1 : 10
Cycles	3	3	3
Assistance	1,5 minute de micro-ondes puis 13,5 minutes à 27 °C, 140 rpm	15 minutes à 26 MHz, méthode discontinue	15 minutes à 27 °C, 140 rpm

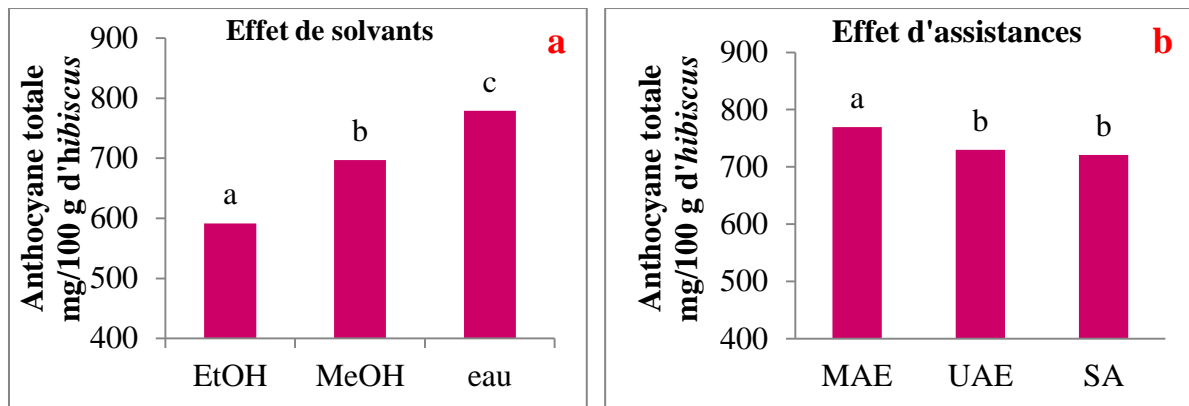


Figure 20. Effet de solvants (a) et de l'assistance (b) sur l'extraction d'anthocyanes d'hibiscus.

2. Purification et détermination structurale des caroténoïdes

Les extraits de caroténoïdes bruts obtenus à partir de roucou, de baie de Goji et de fleurs de roses d'Inde ont été utilisés pour la purification de bixine, zéaxanthine et lutéine par chromatographie sur colonne. Les caroténoïdes ont ensuite été caractérisés par résonance magnétique nucléaire (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC).

2.1. Bixine

L'extrait brut de roucou a été séparé par chromatographie sur une colonne de silice avec un système d'éluant dichlorométhane/méthanol (100:0 - 50:1). La bixine isolée est sous forme d'un cristal rouge foncé, R_f 0,3 (DCM/méthanol 20:1) et point de fusion 198 °C.

Le spectre RMN- ^1H dans le DMSO- d_6 (figure 21) montre la présence de 14 protons éthyléniques, quatre groupes méthyles et un groupe méthoxy. Le spectre RMN- ^{13}C révèle des signaux de 15 atomes de carbone dont deux C=O à δ_c 167,8 et 166,9 ppm, 18 carbones sp^2 , quatre méthyles et un groupe OMe. Ces données suggèrent une structure de caroténoïde avec neuf doubles liaisons et deux groupes carboxyles dont un est un ester méthylique.

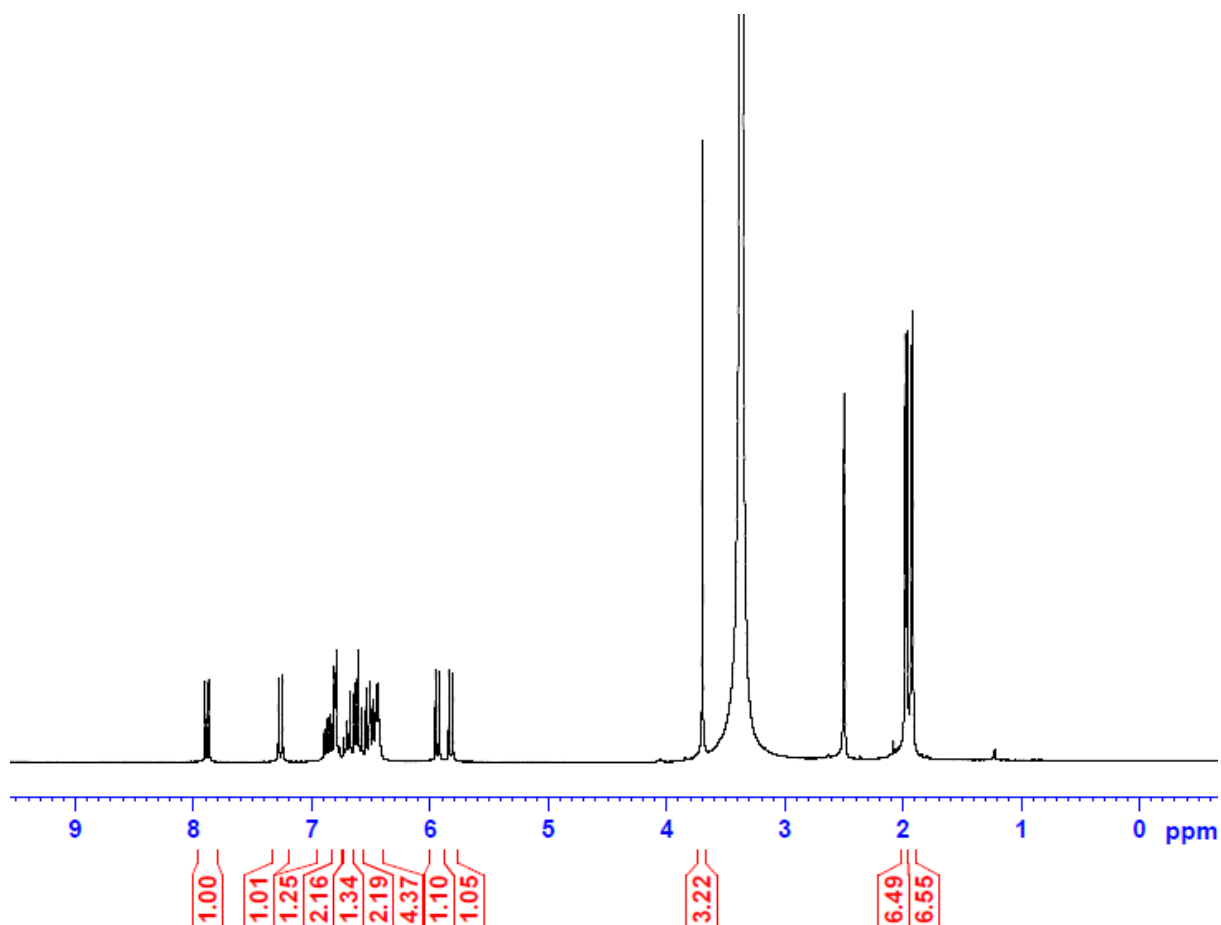


Figure 21. Spectre RMN- ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) de la bixine isolée

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les données en RMN-¹H sont cohérentes avec celles de la 9'-*cis*-bixine obtenue dans la littérature (Rehbein et al., 2007). Les déplacements chimiques en RMN ¹H et ¹³C, la nature du signal, les constantes de couplages et les attributions des signaux observés sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17. Données RMN -¹H & -¹³C de bixine isolée et reportées (Rehbein et al., 2007) *
600 MHz, acétone-*d*₆/D₂O

C		δ_C (ppm)	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ^*_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	C		δ_C (ppm)	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ^*_H (ppm), <i>J</i> (Hz)
6	C	167,8	-		6'	C	166,9		
7	CH	117,2	5,83 (d), 15,5	5,88 (d), 15,5	7'	CH	117,7	5,94 (d), 15,5	5,92 (d), 15,5
8	CH	148,2	7,27(d), 15,5	7,35 (d), 15,5	8'	CH	140,0	7,89 (d), 15,5	7,94 (d), 15,5
9	C	133,4	-		9'	C	131,5	-	
10	CH	139,1	6,66 (d), 14,5	6,64 (d), 11,5	10'	CH	138,1	6,50 (d), 14,5	6,47 (d), 11,5
11	CH	124,8	6,70 (dd), 11,0, 14,5	6,78 (dd), 11,5, 15,0	11'	CH	123,2	6,87 (dd), 12,0, 14,5	6,98 (d), 15,0, 11,5
12	CH	141,5	6,61 (d)	6,62 (d), 15,0	12'	CH	140,6	6,53 (d),	6,53 (d), 15,0
13	C	136,7	-		13'	C	136,7	-	
14	CH	134,6	6,45 (overlap)	6,47 (d), 10,6	14'	CH	134,7	6,45 (overlap)	6,47 (d), 10,6
15	CH	131,3	6,80 (overlap)	6,83 (dd), 14,2, 10,6	15'	CH	131,2	6,80 (overlap)	6,83 (dd), 14,2, 10,6
	9- CH ₃	12,5	1,92			9'- CH ₃	19,9	1,93	
	13- CH ₃	12,6	1,98			13'- CH ₃	12,7	1,97	
						6'- OCH ₃	51,4	3,37	

Les corrélations sur le spectre COSY ^1H - ^1H (figure 22) permettent de déterminer cinq systèmes de spin 7/8, 10/11/12, 14/15/15'/14', 10'/11'/12' et 7'/8'. Les pics de couplage entre H-8 (δ_{H} 7,27 ppm) et H-7 (δ_{H} 5,83 ppm), H-8' (δ_{H} 7,89 ppm) et H-7' (δ_{H} 5,94 ppm) sont observés séparément comme rapporté dans la littérature (Rehbein et al., 2007) dans le cas de la 9'-Z-bixine. En comparaison avec le spectre COSY de l'*all-E*-bixine (Rehbein et al., 2007), les protons 8 et 8' sont superposés (7,35 ppm) dont les corrélations de ces protons avec H-7 et H-7' ne sont pas séparées. La différence de configuration de double liaison $\Delta 8,9$ (*E*) et $\Delta 8',9'$ (*Z*) dans la molécule de 9'-Z-bixine conduit à la différence de déplacement chimique de H-8 et H-8'.

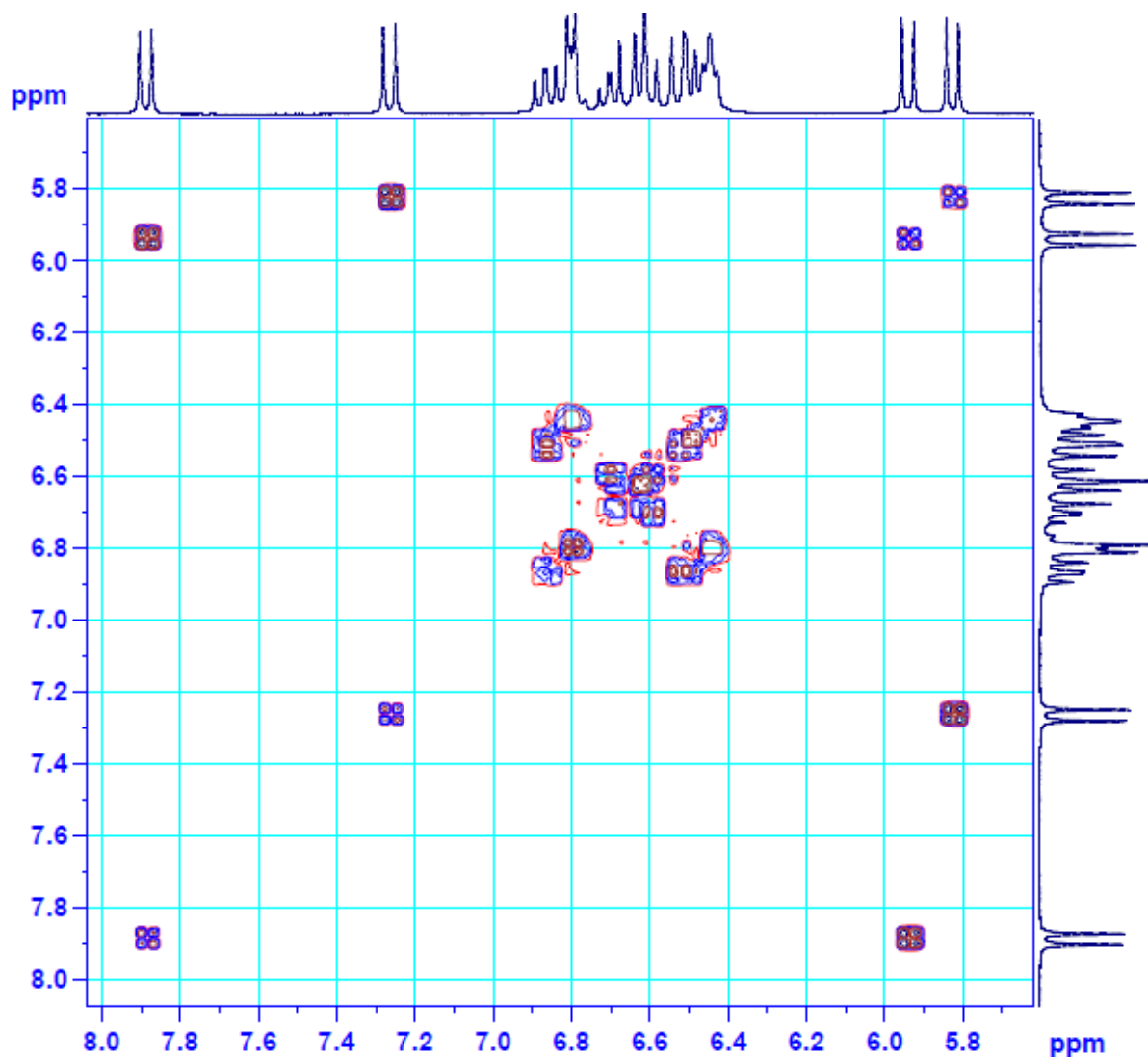


Figure 22. Spectre COSY ^1H - ^1H de la bixine isolée

La corrélation sur le spectre HMBC entre C-6' (δ_{C} 166,9 ppm) et proton OMe (δ_{H} 3,70 ppm) indique que le groupe carbonyle en position 6' est un ester méthylique. Différentes corrélations entre C-6 et H-8/H-7, C-9 et H-7/H-8, C-8 et H-10, C-14 et H-12, CH₃-9 et H-8,

C-12/C-13/C-14 et proton CH₃-13 en combinaison avec le spectre COSY permettent d'établir la chaîne carbone de C-6 à C-15 et C-14/C-15/C-15'/C-14. Il en est de même pour l'autre moitié de la molécule de C-6' à C-15'.

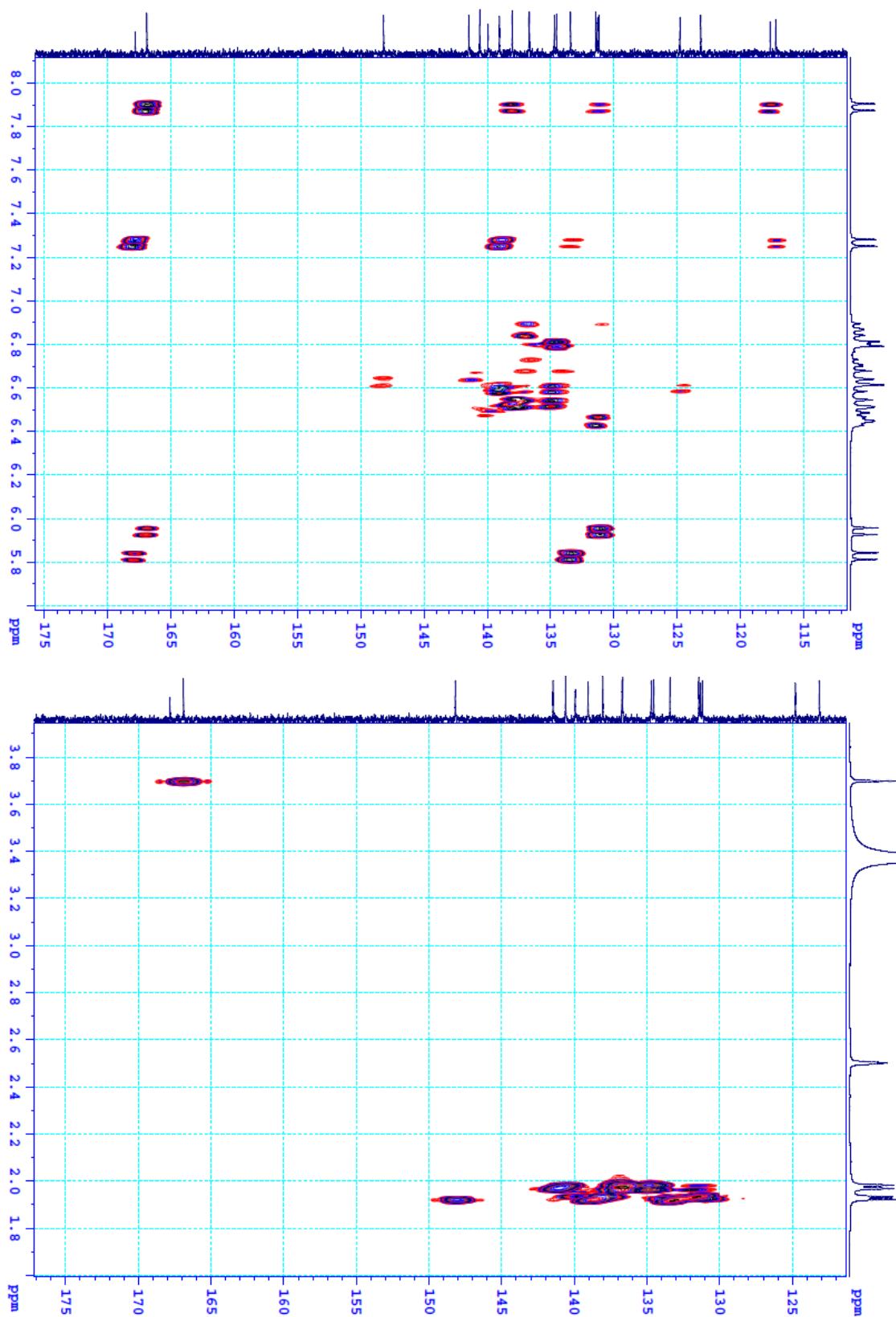


Figure 23. Les spectres HMBC du composé de bixine isolée

A partir des données de spectre RMN et de la littérature, nous avons confirmé que le composé isolé est la 9'-Z-bixine (figure 24)

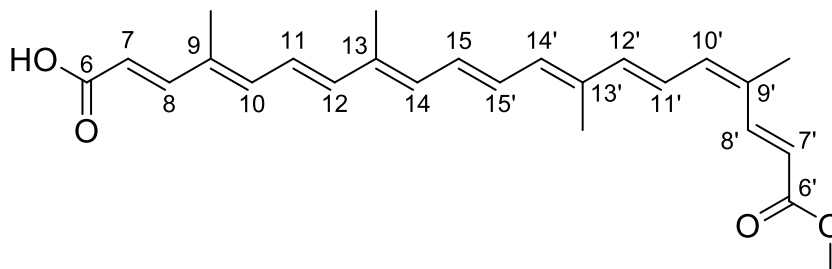


Figure 24. Structure de la 9'-Z-bixine

2.2. Lutéine

La lutéine a été isolée et purifiée à partir de l'extrait brut de roses d'Indes *Tagetes erecta* par saponification et cristallisation selon la méthode de Kumar et al (Sunil Kumar, Sherena, & Sajoy, 2004). Cette méthode consiste à ajouter une solution de KOH/isopropanol dans une fiole ballon contenant de l'extrait brut de lutéine avec un ratio de 1:0,25:3 (g/g/mL) d'extrait/KOH/isopropanol. Le mélange est agité et amené à ébullition à 70 °C pendant trois heures (dans l'obscurité, sous atmosphère de N₂). Le mélange après saponification est concentré sous pression réduite (la température ne dépassant pas 40 °C) pour évaporer l'isopropanol. Ensuite, de l'eau distillée (4:1 g/ml d'extrait/eau) est ajoutée et la lutéine est extraite avec un volume égal d'acétate d'éthyle (trois fois). L'extrait d'acétate d'éthyle est lavé avec de l'eau distillée (trois fois), filtré à travers une couche de MgSO₄, puis l'acétate d'éthyle anhydre est évaporé sous pression réduite. Enfin, la lutéine est purifiée par cristallisation froide avec une solution de dichlorométhane/hexane à 2-4 °C (répété trois fois). Le composé obtenu est sous forme de cristaux rouges avec un point de fusion de 190 °C.

Le spectre RMN-¹H dans le CDCl₃ (figure 24) présente les signaux dans la région de 5,40-6,80 ppm qui correspondent aux 15 protons éthyléniques. Les deux multiples à δ_H 4,25 ppm (broad, 1H) et 4,00 ppm (1H) sont attribués aux deux groupes CH-O (H-3' et H-3). Par l'influence de protons éthyléniques adjacents (H-4'), le signal du H-3' (4,25 ppm) devrait être plus déblindé que celui du H-3 (4,00 ppm). La forme des signaux permet de prévenir que H-3' est β et H-3 est α. Le spectre RMN-¹H montre aussi la présence de 10 singulets des 10 groupes méthyles et des signaux multiples (6H) qui peuvent être attribués aux trois groupes CH₂ (1,50-2,90 ppm) à l'aide des corrélations observées sur le spectre HSQC (figure 27). Les spectres RMN-¹³C (figure 25) et DEPT (figure 26) permettent d'observer la présence de 40 atomes de carbone dont 10 CH₃, 3 CH₂, 22 C sp² (15 CH, 7 C quaternaires), 2 CH-O et 1 CH,

2 C quaternaires aliphatiques. Toutes ces données suggèrent un caroténoïde xanthophylle non symétrique avec la formule moléculaire de $C_{40}H_{56}O_2$, qui est peut-être la lutéine.

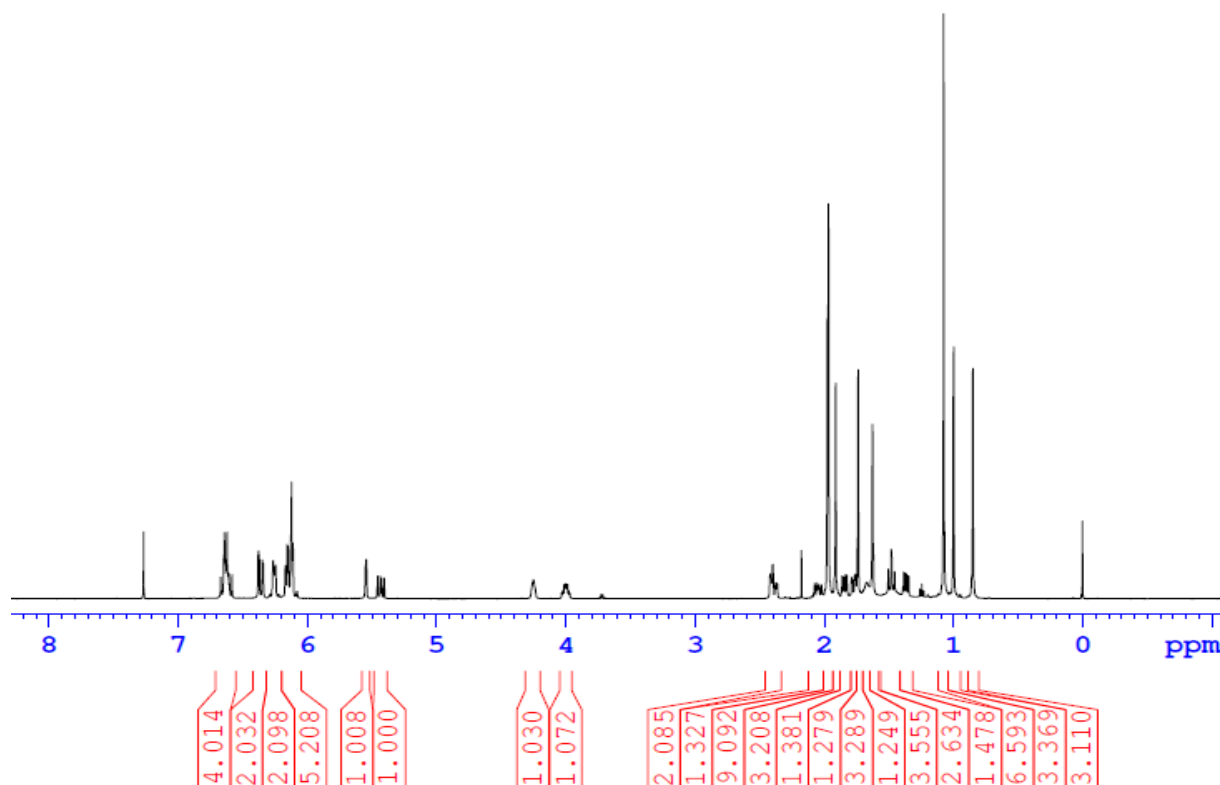


Figure 24. Spectre RMN- ^1H de la lutéine isolée

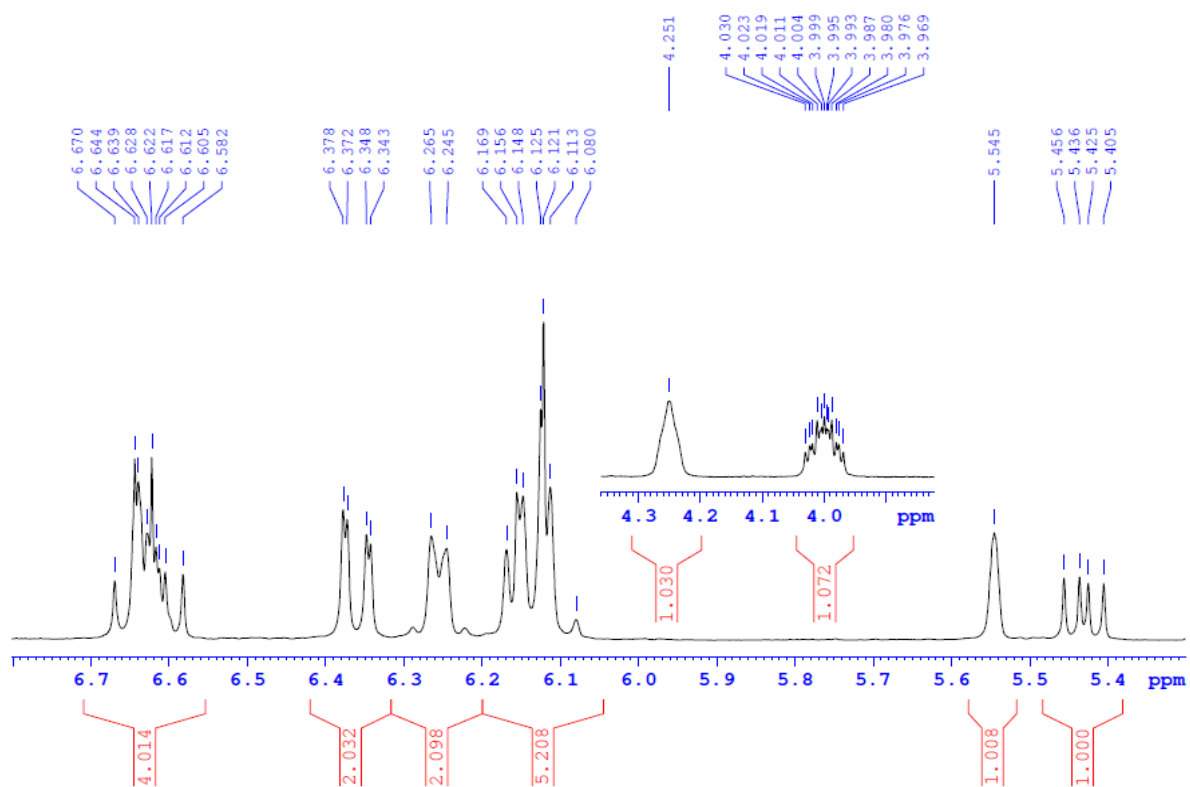


Figure 25. Le spectre RMN- ^{13}C de la lutéine isolée

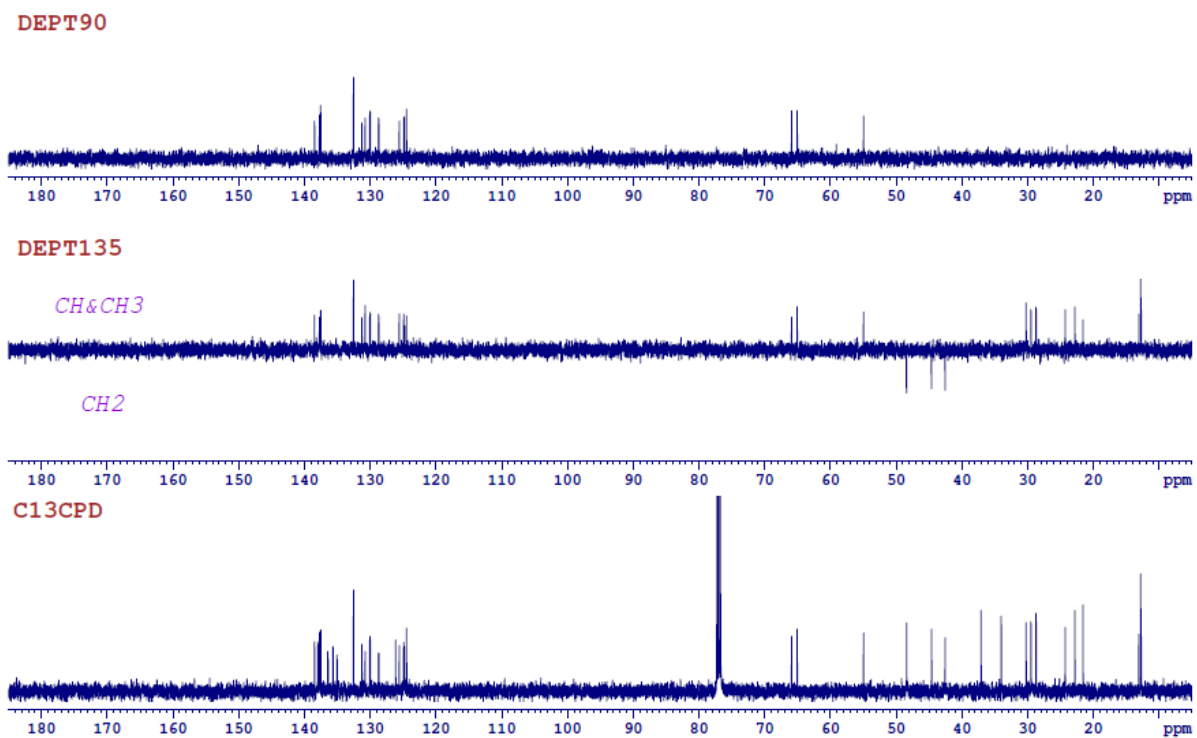


Figure 26. Les spectres DEPT de la lutéine isolée

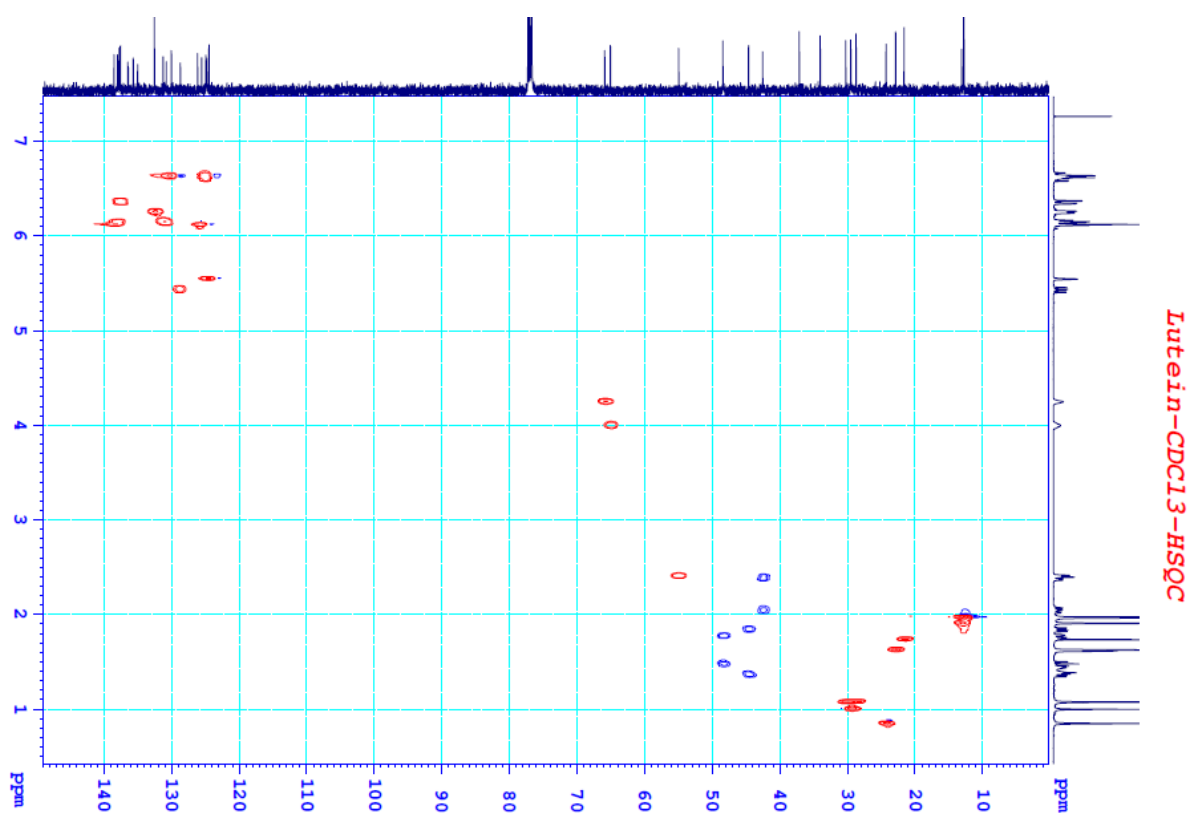


Figure 27. Le spectre HSQC de la lutéine isolée

Les systèmes de spins moléculaires ont été déterminés par le spectre COSY ^1H (figure 28): H-2/H-3/H-4, H-2'/H-3'/H-4', H-10/H-11/H-12 ou H-10'/H-11'/H-12', H-14/H-15/H-15'/H-14' et H-7'/H-8'. Les signaux d'H-7 et H-8 sont superposés. Les valeurs de constante de couplage trouvées pour H-7'/H-8' ($J = 15,5$ Hz), H-14/H-15 ou H-14'/H-15/ ($J = 10,0$ Hz), H-12/H-11 ($J = 15,0$ Hz) montrent que ces liaisons sont de configuration *trans*.

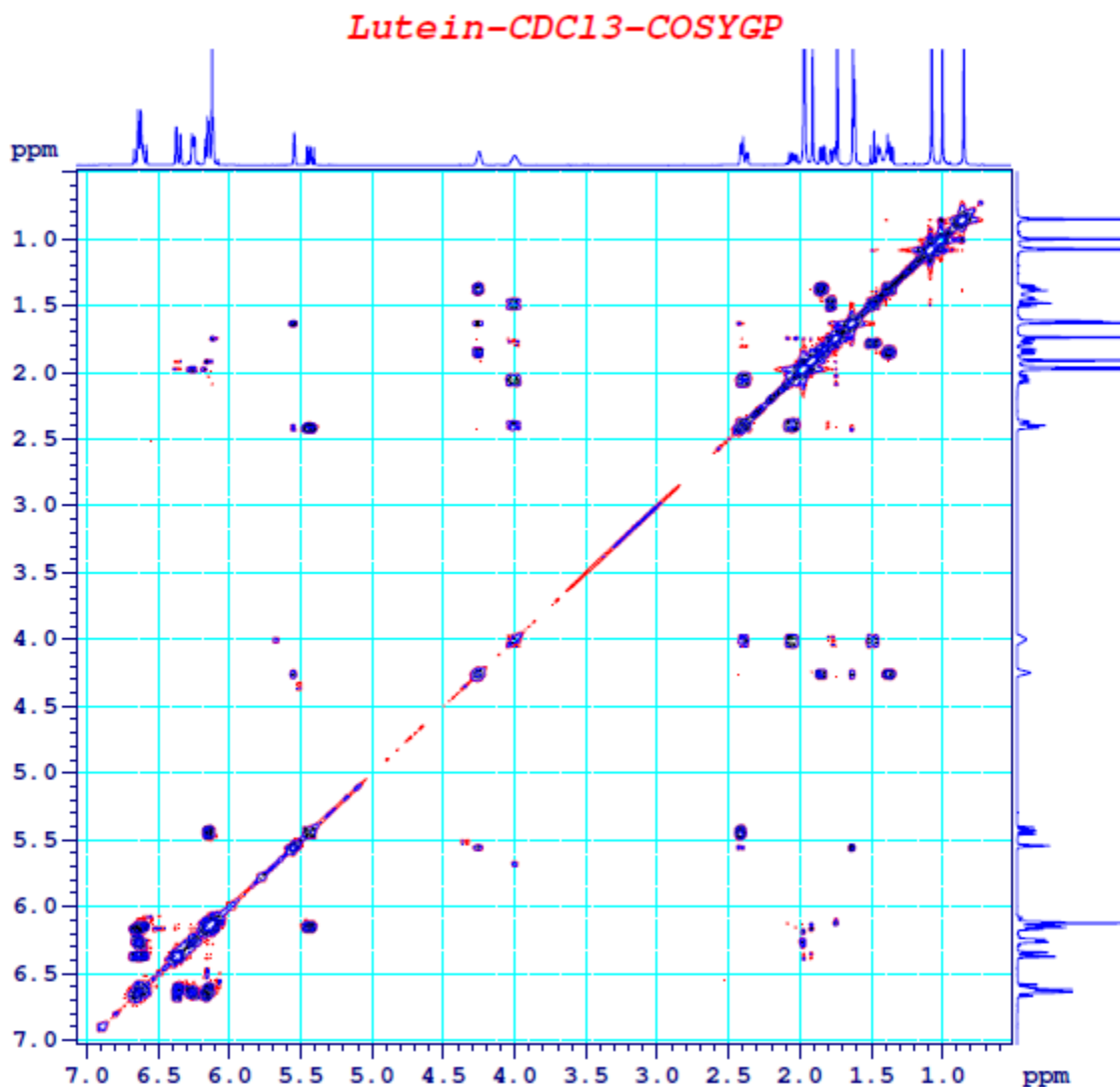


Figure 28. Le spectre COSY de la lutéine isolée

Le spectre HMBC (figure 29) montre les corrélations clés entre C-1, C-2 et C-6 avec H-16 et H-17 ; C-1', C-2' et C-6' avec H-16 et H-17' ; C-1 et C-3 avec H-2 ; C-1', C-3', C-6' avec H-2' ; C-3 avec H-4 ; C-5 et C-6 avec H-18, C-4' et C-5' avec H-18' ; C-9' avec H-19', C-9 avec H-19 ; C-9' avec H-7', C-14(14') avec H-15 (15'), H-12 (12') ; C-10' avec H-8'...

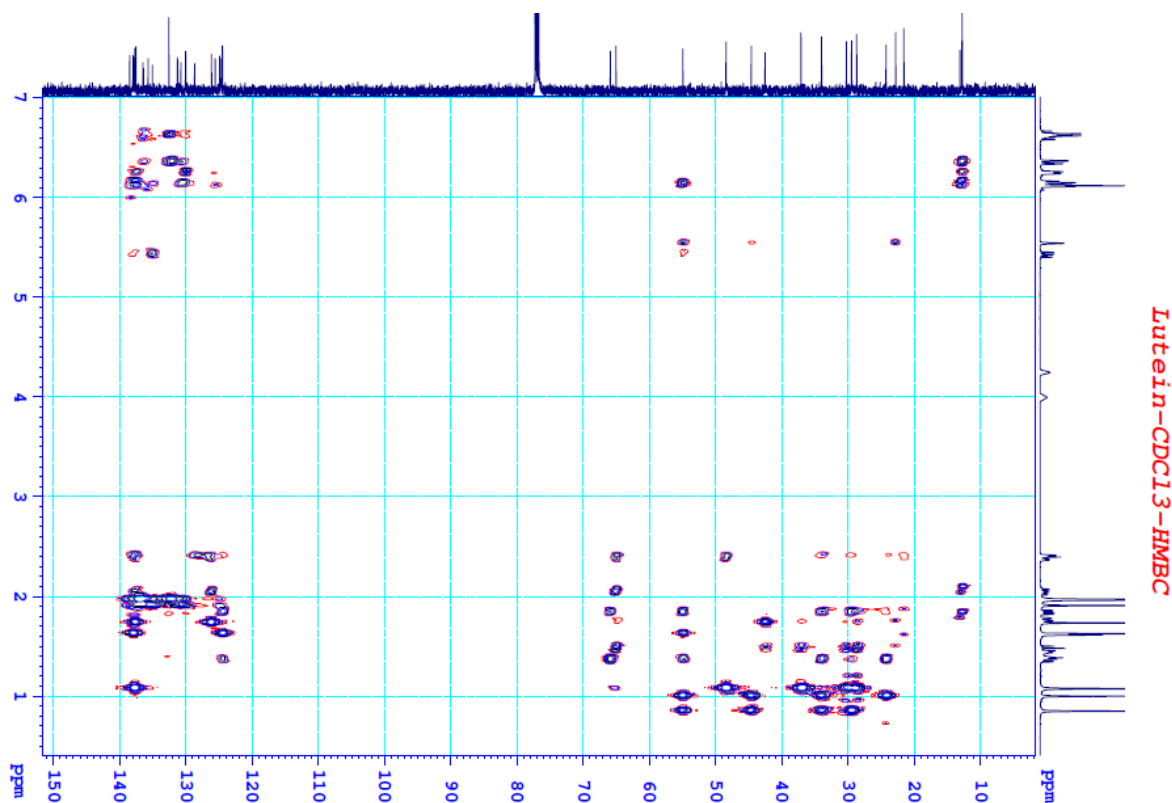


Figure 29. Le spectre HMBC de la lutéine isolée

En combinant tous les spectre RMN 1 et 2D et en comparant avec les données dans la littérature des isomères de lutéine (Moss, 1976), le composé isolé peut être identifié comme étant la *all-E-3R,3'R,6'R*-lutéine (figure 30). L'attribution des protons et carbones est donnée dans le tableau 18.

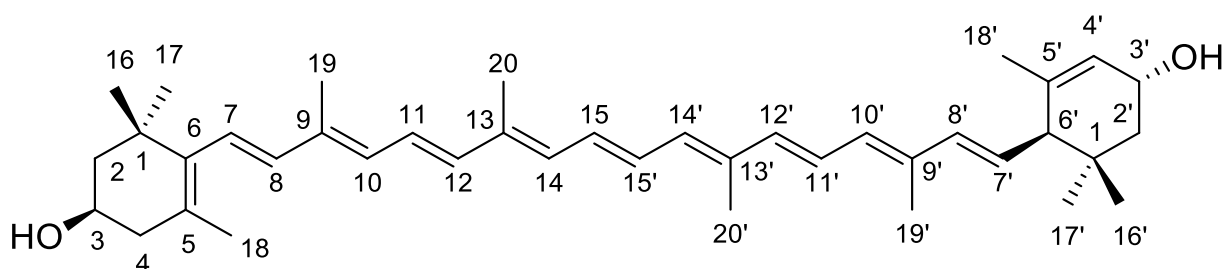


Figure 30. Structure de la *all-E-3R,3'R,6'R*-lutéine

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tableau 18. Déplacement chimique en RMN-¹H et-¹³C de la all-E-3R,3'R,6'R-lutéine isolée (mesurée dans CDCl₃) en comparant avec les données reportées* (Moss, 1976)*

C		δ_H (J, Hz)	δ_C	δ^*_C	C		δ_H (J, Hz)	δ_C	δ^*_C
1	C		37,1	37,1	1'	C		34,0	34,0
2	CH ₂	1,48 t (12,0), H _β 1,78 ddd (12; 3,5, 2,5), H _α	48,5	48,4	2'	CH ₂	1,36 dd (13,0; 7,0), H _β 1,84 dd (6,0; 13,0), H _α	44,7	44,7
3	CH OH	4,00 m 1,66 b	65,1	65,1	3'	CH OH	4,25 bs 1,66 b	65,9	65,9
4	CH ₂	2,04 dd (10,0, 17,0), H _β 2,39 overlap, H _α	42,6	42,5	4'	CH	5,55 bs	124,5	125,6
5	C		126,2	126,2	5'	C		138,0	137,8
6	C		137,7	137,6	6'		2,38 overlap	55,0	55,0
7	CH	6,11-6,17 m overlap	125,6	125,6	7'	CH	5,43 dd (15,5, 10,0)	128,7	
8	CH	6,11-6,17 m overlap	138,5	138,5	8'	CH	6,11-6,17 m overlap	137,6	
9	C		135,7	135,6	9'	C		135,1	
10	CH	6,11-6,17 m overlap	131,3	131,3	10'	CH	6,11-6,17 m overlap	130,8	
11	CH	6,58-6,67 m overlap	124,8	124,9	11'	CH	6,58-6,67 m overlap	124,9	
12	CH	6,35 dd (3,0,15,0)	137,6	137,6	12'	CH	6,35 dd (3,0,15,0)	137,8	
13	C		136,4 ou 136,5	136,5	13'	C		136,4 ou 136,5	
14	CH	6,25 bd (10,0)	132,6	132,6	14'	CH	6,25 bd (10,0)	132,6	
15	CH	6,58-6,67 m overlap	130,1	130,0	15'	CH	6,58-6,67 m overlap	130,1	
16	CH ₃	1,07 s	28,7	28,7	16'	CH ₃	0,85 s	24,3	
17	CH ₃	1,07 s	30,3	30,2	17'	CH ₃	1,00 s	29,5	
18	CH ₃	1,74 s	21,6	21,6	18'	CH ₃	1,63 s	22,9	
19	CH ₃	1,97 s	12,8	12,7	19'	CH ₃	1,91 s	13,1	
20	CH ₃	1,97 s	12,8	12,7	20'	CH ₃	1,97 s	12,8	

2.3. Zéaxanthine

Les baies de Goji ont été extraites au dichlorométhane puis les extraits bruts ont été hydrolysés dans la solution éthanolique 10% de KOH à 70 °C pendant 3 h. Ce traitement permet de transformer le dipalmitate de zéaxanthine dans l'extrait des baies de Goji en zéaxanthine sous forme libre.

La zéaxanthine a été isolée et purifiée à partir de l'extrait hydrolysé par chromatographie sur colonne de silice en utilisant du *n*-hexane/acétate d'éthyle comme système d'éluant (50:1-3:1). Cinq fractions ont été obtenues : F1-F5. La fraction F5, récupérée à l'éluant 3:1, a été ensuite évaporée pour éliminer du solvant et recristallisée dans le *n*-hexane/dichlorométhane (2:1) à 2-4 °C. Les cristaux d'aiguilles rouge orangé obtenus ont le point de fusion de 215 °C et R_f 0,2 (*n*-hexane/acétate d'éthyle 7:3). La pureté mesurée par HPLC (voir condition dans la partie « matériels et méthodes ») est de 99% (selon la surface du pic de zéaxanthine sur la surface totale des pics dans le spectre) (figure 31).

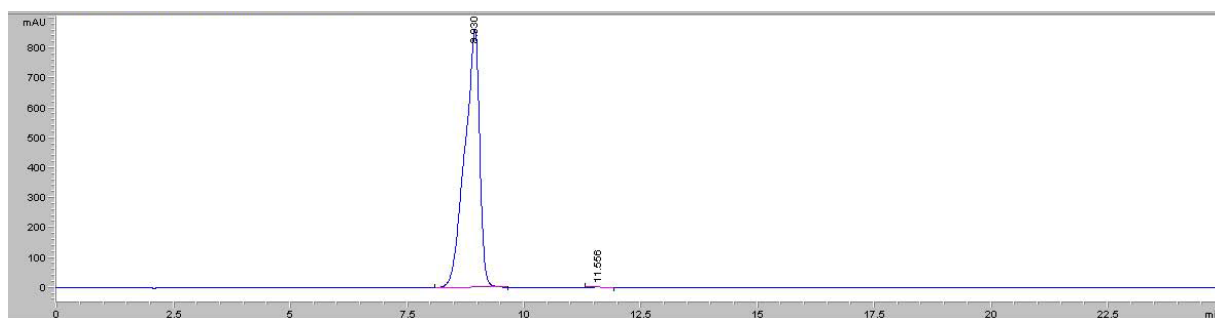


Figure 31. Chromatogramme HPLC de zéaxanthine isolée

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C montrent les signaux d'une molécule symétrique possédant 40 atomes carbones dont 10 groupes méthyles, 22 carbones sp^2 et deux carbones liés avec oxygène. Cela suggère que ce composé est une xanthophylle $\text{C}_{40}\text{H}_{56}\text{O}_2$.

Au moyen de combinaison des spectres RMN 1-, 2-D du composé isolé et en comparant avec les données d'*all-trans*-zéaxanthine dans la littérature (Moss, 1976), nous avons pu confirmer que ce composé est la *all-trans*-zéaxanthine (figure 32 et tableau 19).

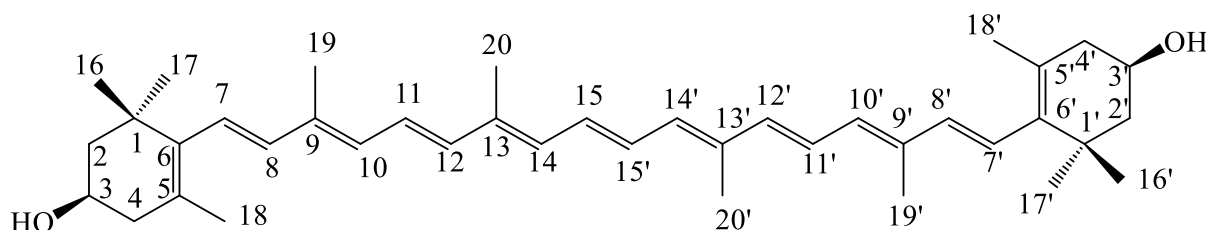


Figure 32. Structure de la zéaxanthine

Tableau 19. Déplacement chimique en RMN-¹H et-¹³C de la zéaxanthine isolée (mesuré dans CDCl₃) en comparant avec les données reportées* (Moss, 1976)

C		δ_H (J) (500 MHz, ppm, Hz)	δ_C (125 MHz, ppm)	δ^*_C (Moss, 1976)
1, 1'	C	-	37,1	37,1
2, 2'	CH ₂	1,48 H _β (t, 12,0) 1,77 H _α (ddd, 12,0, 3,5, 2,5)	48,5	48,2
3, 3'	CH OH	4,00 (m)	65,1	65,1
4, 4'	CH ₂	2,05 H _β (dd, 17,0, 10,0) 2,39 H _α (dd, 17,0, 4,5)	42,6	42,4
5, 5'	C	-	126,2	126,1
6, 6'	C	-	137,8	137,6
7, 7'	CH	6,11 ou 6,12	125,6	125,5
8, 8'	CH	6,11 ou 6,12	138,5	138,5
9, 9'	C	-	135,7	135,7
10, 10'	CH	6,16 (d, 11,5)	131,3	131,3
11, 11'	CH	6,61-6,67 (overlap)	124,9	124,9
12, 12'	CH	6,36 (d, 15,0)	137,6	137,6
13, 13'	C	-	136,5	136,5
14, 14'	CH	6,26 (d, 10,0)	132,6	132,6
15, 15'	CH	6,61-6,67 (overlap)	130,1	130,0
16, 16'	CH ₃	1,07 (overlap)	28,7	28,7
17, 17'	CH ₃	1,07 (overlap)	30,3	30,2
18, 18'	CH ₃	1,74 (s)	21,6	21,7
19, 19'	CH ₃	1,97 (s)	12,8	12,8
20, 20'	CH ₃	1,97 (s)	12,8	12,8

Les valeurs des constantes de couplages entre H-11/H-12 ($J = 15,0$ Hz), H-10/H-11 ($J = 11,5$ Hz), H-14/H15 ($J = 10$ Hz) (les signaux des protons H-7 et H-8 sont superposés), ainsi que ν_{\max} 426 (5,0080), 447 (5,1412), ν à 474 nm (5,0628) dans le spectre UV-VIS (*n*-hexane), et le point de fusion (215 °C) confirment la configuration *all-trans* de la molécule zéaxanthine isolée.

La position des doubles liaisons dans le cycle cyclohexane est déterminée par les corrélations dans le spectre HMBC de C-5, C-6 avec H-7, H-18, C-5', C-6' avec H-7', H-18'.

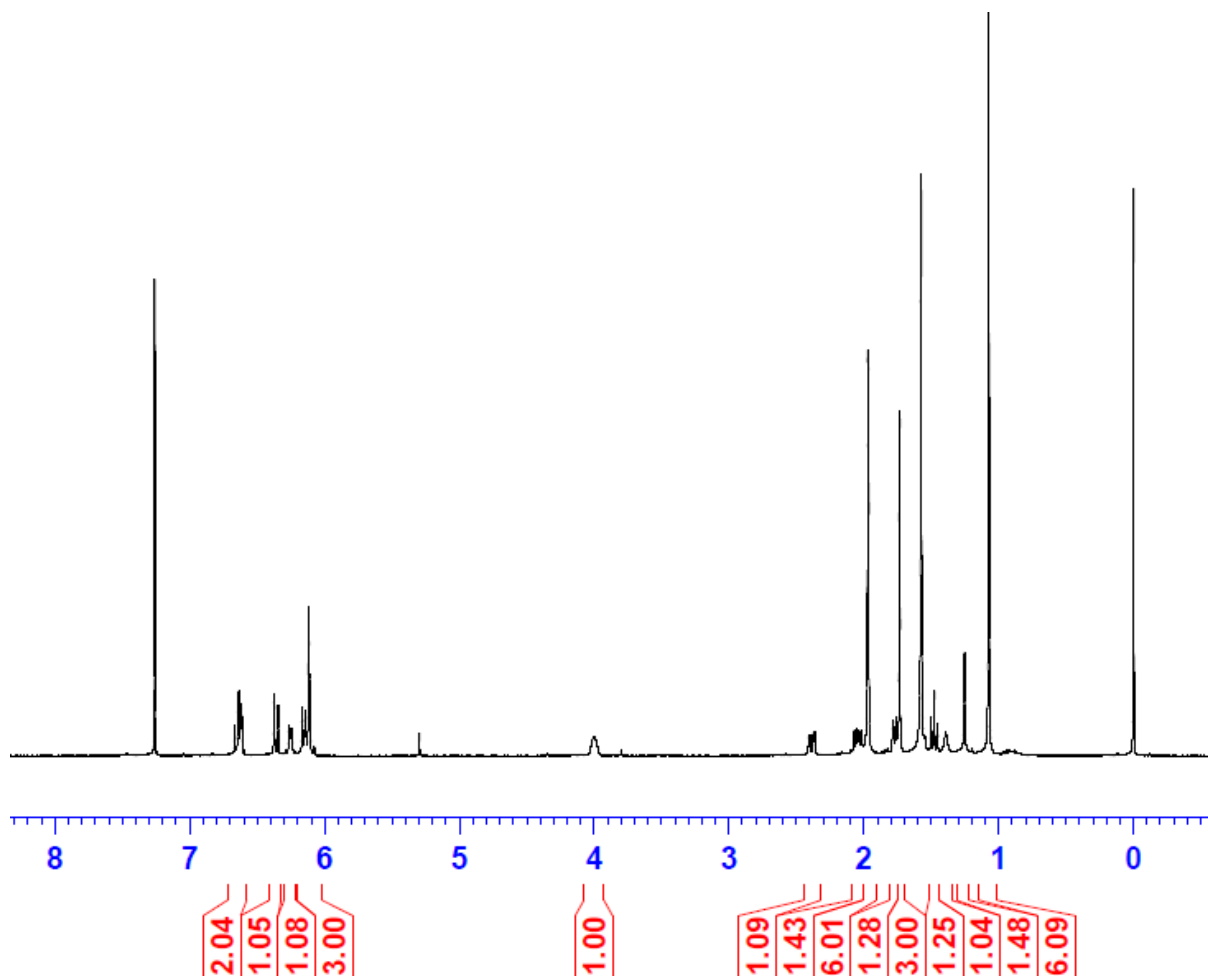


Figure 33. Le spectre RMN ^1H de la zéaxanthine isolée

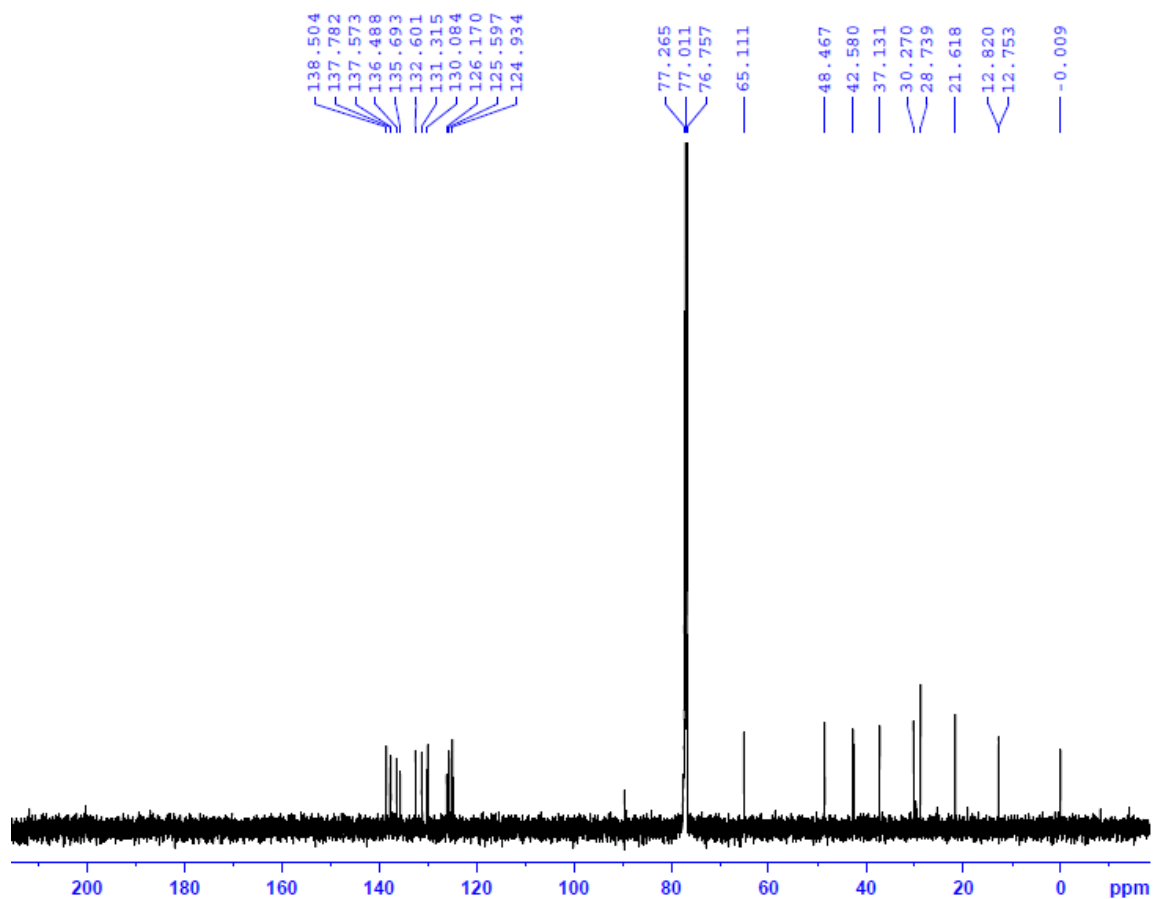


Figure 34. Le spectre RMN ^{13}C de la zéaxanthine isolée

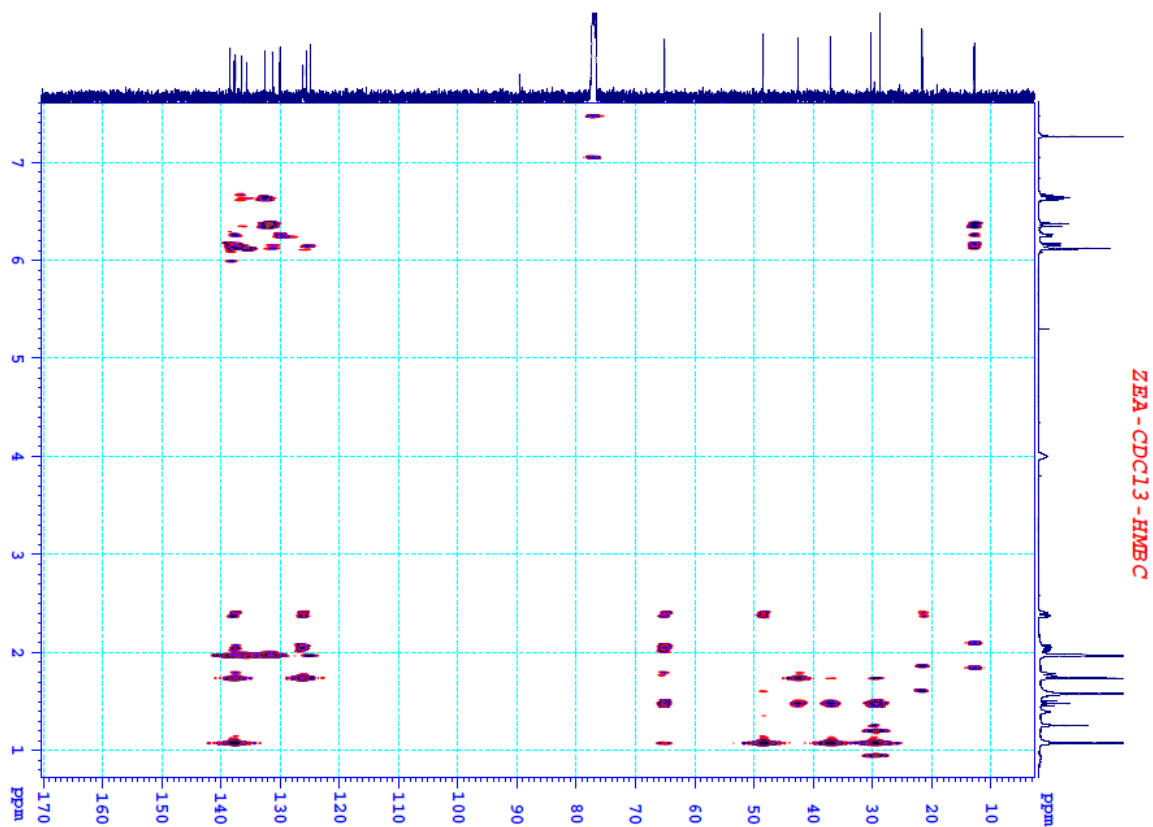


Figure 35. Le spectre HMBC de la zéaxanthine isolée

3. Encapsulation d'anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L.

Hibiscus sabdariffa, appelé également Roselle, Jamaïca ou Karkadé, est une plante typique du climat tropical. Ses fleurs sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans les pays asiatiques et africains pour leur importante quantité d'anthocyanes. Les anthocyanes représentent le plus grand groupe de pigments hydrophiles dans la plante. Ils sont très appréciés dans l'industrie alimentaire pour leurs propriétés colorantes, qui peuvent donner aux aliments diverses teintes de rouge, de bleu et de violet. De plus, les activités biologiques des anthocyanes, telles que l'activité antioxydante ou la protection contre l'athérosclérose, ont été étudiées et ont indiqué que les anthocyanes ont des effets bénéfiques dans le traitement de troubles tels que les maladies cardiovasculaires, le cancer et le diabète. Cependant, les anthocyanes isolées sont extrêmement instables et très sensibles à la dégradation par certains facteurs tels que le pH, la température, la lumière, l'oxygène etc. L'encapsulation d'anthocyanes par les levures a été choisie afin de protéger la couleur.

Dans cette partie seront présentés dans un premier temps l'étude de l'encapsulation d'anthocyane dans les levures entières (traitées par un stress thermique ou non) qui sera présentée dans l'article « **Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast** ». Puis, comme il était intéressant de garder les pigments dans la paroi des levures pour les protéger en gardant la couleur visible, des travaux sur le potentiel des écorces de levures pour l'encapsulation des anthocyanes ont été menés sur la caractérisation et l'évaluation de la stabilité des microparticules. Les résultats seront présentés dans l'article « **Microencapsulation of *Hibiscus Sabdariffa* L. calyx anthocyanins with yeast hulls** ».

3.1 Article 2 : Encapsulation d'anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L. comme colorants naturels dans la levure

Cette publication est publiée dans le journal *Food Research International*, volume 107, mai 2018, pages 275-280.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.044>

Food Research International 107 (2018) 275–280



Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast.

Résumé graphique

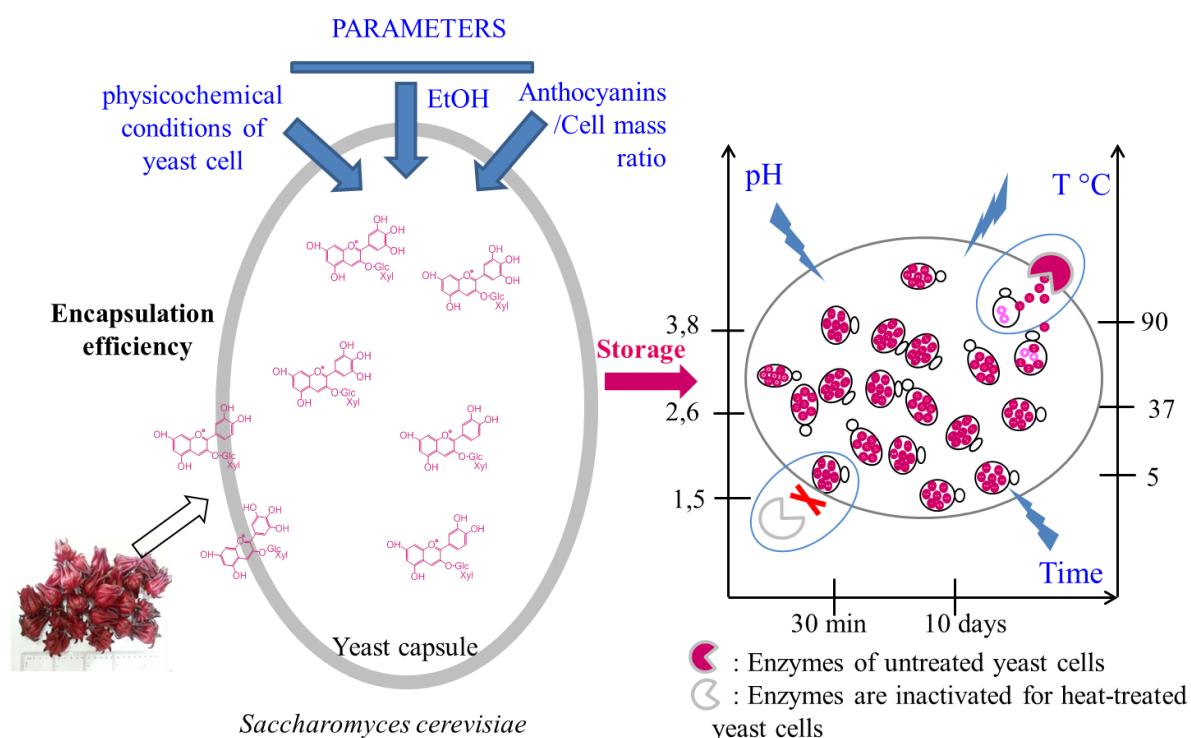


Figure 36. Effet du statut physicochimique des cellules et du ratio anthocyanes/cellules sur l'efficacité d'encapsulation dans la levure (à gauche) ; Effet des conditions de stockage et d'enzyme de levure sur la stabilité d'anthocyanes et la couleur des micropraticules (à droite).

Encapsulation d'anthocyanes d'*Hibiscus sabdariffa* L. comme colorants naturels dans la levure

T-Thu Nguyen, Hanh Phan-Thi, Bao-Ngoc Pham-Hoang, Phuong-Thao Ho, Thi Thu Thuy Tran, Yves Waché

Résumé:

L'extrait d'*Hibiscus sabdariffa*, une source riche en anthocyane, a été soumis à une encapsulation dans des cellules de levure. Un rendement d'encapsulation (EY) de 208 µg/ 100 mg de cellules et un rendement d'encapsulation (EE) de 27% ont été atteints après optimisation des ratios (0,5 g de cellules de levure humide pour 5 ml d'extraits anthocyaniques à 1 g.L-1) et avec 10% d'éthanol. La stabilité au stockage des pigments encapsulés a été étudiée dans de l'eau et un tampon à pH 1,5 à 5 et 37 °C pendant 10 jours et à 90 °C pendant 30 minutes. Le pourcentage de perte de couleur a été déterminé par des dosages colorimétriques. Les microparticules de levure avec ou sans traitement thermique présentaient différents effets protecteurs ($P < 0,01$). A 37 °C, le pourcentage de perte de couleur dans l'eau était de 2,5% pour les microparticules de levure traitées thermiquement et de 36,5% pour les levures non traitées, suggérant que les enzymes de levure seraient responsables de la perte d'anthocyane pendant le stockage. Ces résultats sont confirmés par le pourcentage de perte de couleur qui était beaucoup plus faible dans les conditions de faible activité enzymatique : 3,1% à 5 °C pour les cellules non traitées thermiquement dans l'eau. Le pH du solvant avait également un effet important sur la dégradation de l'anthocyane encapsulée. Dans un tampon pH 1,5 et à 37 °C avec les cellules non traitées thermiquement, la dégradation diminue fortement à 9,4% par rapport à 36,5% dans l'eau. Ces résultats montrent que les cellules de levure sont un bon moyen d'encapsulation de pigments à des fins colorantes et qu'elles fournissent une bonne protection aux anthocyanes tant que leurs enzymes sont inactivées.



Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast

T-Thu Nguyen^{1,2,3*}, Hanh Phan-Thi^{1,2}, Bao-Ngoc Pham-Hoang^{1,2}, Phuong-Thao Ho^{1,2},
Thi Thu Thuy Tran³, Yves Wache^{1,2}

¹ International Joint Laboratory Tropical Bioresources & Biotechnology between UMR PAM (Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France) & SBFT (Hanoi University of Science & Technology, Hanoi, Vietnam).

² The Natencaps project

³ Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

* Corresponding author at: UMR PAM, AgroSup Dijon, University of Burgundy, 21000 Dijon, France

E-mail address: nguyenthu1712@gmail.com

Keywords: Encapsulation, Colour, Anthocyanin, Yeast microparticles, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hibiscus sabdariffa* L.

ABSTRACT

Hibiscus sabdariffa extracts, a rich source of anthocyanin, were subjected to encapsulation in yeast cells. An encapsulation yield (EY) of 208 µg/ 100 mg of cells and an encapsulation efficiency (EE) of 27%, were reached after optimisation of the ratios (0.5 g wet yeast cells for 5 ml of anthocyanin extracts at 1 g.L⁻¹) and with 10% of ethanol. The storage stability of encapsulated pigments was investigated in water and buffer pH 1.5 at 5 & 37 °C for 10 days and 90 °C for 30 min. The percentage of loss of colour was determined by colourimetry assays. The microparticles made of yeast with or without heat treatment exhibited different protecting effects (P<0,01). At 37 °C, the percentage of loss of colour in water was of 2.5% for heat-treated and 36.5% for non-treated yeast microparticles, suggesting that yeast enzymes would be responsible for the loss of anthocyanin during storage. These results are confirmed by the percentage of loss of colour which was far lower in conditions of

low enzymatic activity: 3.1% at 5 °C for non-heat-treated cells in water. The pH of solvent had also an important effect on the degradation of encapsulated anthocyanin; in buffer at pH 1.5 and 37 °C with the non-heat-treated cells, the degradation decreased strongly to 9.4% compared with 36.5% in water. These results show that yeast cells are a good mean of encapsulation of pigments for a colouring purpose and that they provide anthocyanins a good protection as long as their enzymes are inactivated.

1. Introduction

The use of yeast as microparticles for the protection of food ingredients is developing quickly, especially in the field of flavouring compounds but also for pigments that can be used as bioactive compounds or as colours (Dardelle et al., 2007; Miró Specos et al., 2010; Normand, Dardelle, Bouquerand, Nicolas, & Johnston, 2005; Paramera et al., 2011a; B. Pham-Hoang et al., 2013; G. Shi et al., 2008). Yeast cells are very efficient for the protection of actives but, as preformed capsules, one of the challenges is to load the actives into the biological structures. Compared to other ingredients, the encapsulation of colouring compounds presents some specificities. First, the amount of compounds that has to be encapsulated is rather low and depends on the effect on colour, and then, the encapsulation must be rather superficial to obtain a protection by the capsule without hiding the compound. In yeast, such an encapsulation is possible if the colouring compound has an affinity for the cell wall. Contrasting with flavouring compounds that are small volatile molecules, often relatively hydrophobic and that enter spontaneously into yeast cells, pigments are usually big molecules that are more difficult to force across the cell envelop.

Anthocyanins are among the most important groups of pigments. They are visible to the human eye and responsible for the red, purple, and blue hues present in fruits, vegetables, grains, as well as products made from those materials (Delgado-Vargas et al., 2000; G. A. F. Hendry & Houghton, 1996). Recently, the biological activities of anthocyanins, such as antioxidant activity or protection against atherosclerosis, have been studied, and have indicated that anthocyanins can provide beneficial effects in the treatment of diseases such as cardiovascular disease, cancer and diabetes (Cisse et al., 2009; Jackman & Smith, 1996; Sinela et al., 2017). However, isolated anthocyanins are very sensitive to degradation by several factors such as pH, temperature, light, oxygen etc. Therefore, many efforts have been invested in the development of techniques to protect anthocyanins against damages caused by encapsulation with many different wall materials as well as maltodextrin, Gum arabic, pectin,

wey protein (Betz & Kulozik, 2011; Chranioti, Nikoloudaki, & Tzia, 2015; Flores et al., 2014; Mahdavee-Khazaei et al., 2014; Stoll et al., 2016).

Yeast for capsules can be used as inert materials but also, if they are active, as starter or technological microorganisms. The category to which it belongs has a huge impact on utilisation as, in the European regulation, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be used without additional tests as a starter, with additional tests as a technological strain, in both cases, labelling can be seen relatively positively by consumers but the impact of these active cells on the final product has to be controlled. Yeast can also be added as an inactive ingredient with a more comfortable technological use but a less positive labelling.

Our goal in the present study is to evaluate the potential of active yeasts loaded with anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* for preservation of colour. Conditions of encapsulation in the yeast surface were investigated and the protective effect of encapsulation was evaluated under different conditions. Furthermore, the difference between the protection capabilities of yeast heat-treated or not was investigated to show the enzymatic effect of yeast cells as a degradation agent on the pigment.

2. Materials and Methods

2.1. Plant material

Hibiscus sabdariffa L. fruits (Fig. 1) were collected from Tam Dao province in the north of Viet Nam in December, 2014. After removing capsules, the calyces were dried in a dryer at 40 °C for 48 h. Dried calyces were crushed and stored in a freezer at -40 °C until use.

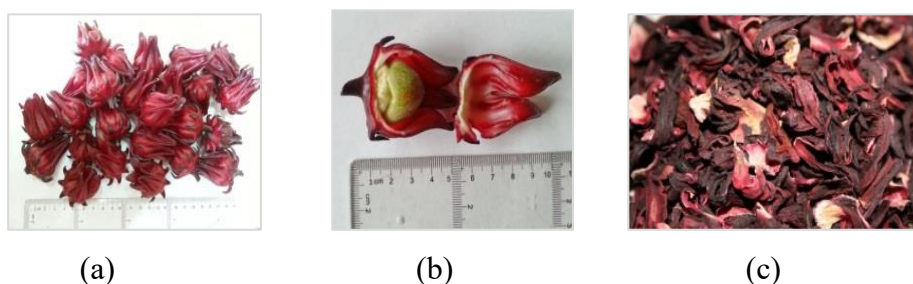


Fig. 1. a: fruit (calyces), b: fruit (capsule), c: dried calyces.

2.2. Extraction of anthocyanins

Dry calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. were extracted to get the two main anthocyanins, delphinidine 3-sambubioside and cyanidine 3-sambubioside. According to Cisse et al. (2009), these two anthocyanins account for 71 and 29% of total anthocyanins, respectively. Twenty grams of calyces were mixed for 20 min in 200 ml of ethanol/potassium chlorate buffer pH 1.5 (v/v: 90/10) at room temperature. This step was repeated until the flower sample has lost its red colour. After extraction, ethanol was evaporated under reduced

pressure at 35 °C. The obtained extract was filtered through a filter paper (Whatman no.1). The solvent content was removed at 35 °C under reduced pressure by a rotary evaporator (Stuart RE300, Staffordshire, UK). The condensed extract was recovered and stored at -20 °C.

2.3. Yeast strain and culture

The strain *Saccharomyces cerevisiae* (by4247 or Y10000 from Euroscarf) was used in this study. Stock cultures were prepared with subsequent storage at -80 °C. Cells from thawed stock cultures were seeded onto Petri dishes containing YPDA medium (yeast extract 10 g.L⁻¹; Peptone: 20 g.L⁻¹; Dextrose: 20 g.L⁻¹ and agar: 20 g.L⁻¹) for 48 h at 27 °C. After this culture, cells were used to inoculate (at OD₆₀₀ = 0.2) the liquids medium YPD (YPDA without agar) and grown at 27 °C, 140 rpm (Thermoshake Incubating Orbital Shaker, Gerhardt, Germany) in baffled Erlenmeyer flasks. Cells were harvested in the mid-logarithmic growth phase and washed (Centrifugation: 4000 rpm, 10 min) three times with sterile physiological water (pH₂O).

Heat treatment: 200 ml of yeast culture at OD₆₀₀ = 0.2 were incubated for 48 h at 27 °C, 140 rpm. Cells were then harvested and washed three times following the conditions above. Yeast cells were suspended in 50 ml of pH₂O and heated at 75 °C for 5 minutes then recovered by centrifugation (4000 rpm, 10 min) for further encapsulation.

2.4. Encapsulation

The washed yeast cells were mixed with an anthocyanin extract (1 g.L⁻¹ in chlorate buffer at pH 1.5). The mixture was then stirred in a 15 mL-tube at 140 rpm and 27 °C for 1 h using the Thermoshake Incubating Orbital Shaker. The loaded yeasts were harvested by centrifugation (4000 rpm, 10 min). Encapsulation parameters such as the cell water status (wet / dry), the cell mass used (0.5, 1, or 2 g) and the presence of alcohol in the extract (0 or 10%) were tested to select the optimum conditions at which the quantity of anthocyanins was the highest.

2.5. Determination of the encapsulation yield (EY) and encapsulation efficiency (EE)

2.5.1. UV-Vis spectrometry

The absorbance of anthocyanins was measured in an UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, UV-1650 C, Tokyo, Japan) between 490 and 550 nm at sampling intervals of 1 nm with a medium scan rate. The total concentration of anthocyanins was calculated according to the Beer-Lambert law:

$$\text{Concentration of anthocyanins} = \frac{\text{Abs} * M * D * 10^3}{\epsilon * l}$$

Abs: Absorbance of the diluted solution ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$)

M: Molecular weight: 465.2 (g.mol⁻¹)

D: Dilution Factor

ϵ : (*Delphinidin-3-glucosides*): 23,700 (L.mole⁻¹ cm⁻¹) (Heredia, Francia-Aricha, Rivas-Gonzalo, Vicario, & Santos-Buelga, 1998)

l: Length of the optical path in the cuvette (1 cm)

2.5.2. Calculation of EY and EE

Five hundred milligrams of microparticles were suspended in 10 ml of chlorate buffer at pH 1.5 and then stirred in a 15 mL-tube at 140 rpm at 27 °C for 1 h. The mixture was finally centrifuged (4000 rpm, 10 min) and the absorbance of anthocyanin extract was measured at 520 nm. The amount of anthocyanin was calculated as described above.

The EY and EE of anthocyanins were calculated by the equation below:

$$EE (\%) = \frac{Q_E}{Q_T} * 100 ; EY (\mu g/100mg) = \frac{Q_E * 100}{Q_M} * 10^3$$

Where Q_E was the amount (g) of anthocyanins encapsulated, Q_T (g) was the total amount of anthocyanins used; Q_M (g) was the total amount of cells.

2.6. Storage conditions

Five hundred milligrams of microparticles were suspended in 10 ml of water or chlorate buffer at pH 1.5 in a 15 mL-tube and stored at different temperatures (5, 37) for 10 days and at 90 °C for 30 mins. One millilitre of anthocyanin extracts 1 g.L⁻¹ was dissolved in 10 ml of water as the control sample. Five hundred milligrams of cells in 10 ml of the various solutions and of water were used as the white samples.

2.7. Colorimetry assays

Colour properties of anthocyanins solutions were measured using a colourimeter Chroma meter CR-400 (Konica Minolta, Japan) which refers to the colour space CIE L*, a*, b*, with a D light source, standard 65° viewer and 8 mm light beam diameter. Colour measurements were obtained by placing anthocyanins solution samples in a glass container with an optically clear bottom. For determination of degree of difference of colour between sample and the standard white, ΔE^* -values were calculated:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

Where L* represents lightness, a*, redness, b*, yellowness and ΔL^* , Δa^* , Δb^* represent the difference between each parameter for samples and white samples.

The stability of the anthocyanins encapsulated was evaluated by the loss of colour which is the ratio (%) between the ΔE^* values of the sample after and before storage.

2.8. Statistical analysis

All analyses were carried out at least in triplicate and results were expressed as means \pm standard deviation. Differences between variables were tested for significance using a one way ANOVA.

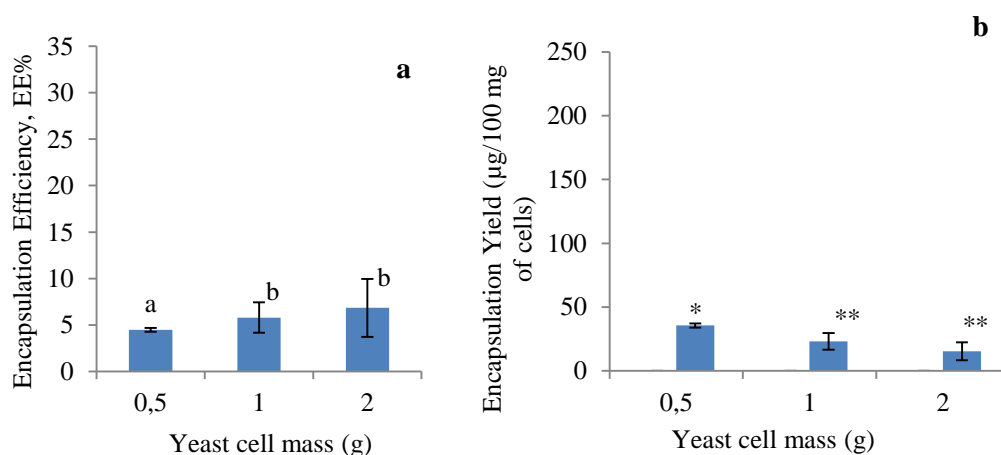
3. Results

3.1. Development of anthocyanin encapsulation in yeast

As a first step in our study, the process of encapsulation of anthocyanin in yeast has been developed taking into account the active/cell ratio as well as the physicochemical conditions of yeast cell.

3.1.1. Effect of yeast cell mass

Fig. 2 depicts the EE as well as the EY values of anthocyanins loaded into yeast cells. Different cell masses were used, and the other parameters were fixed: 1 g.L⁻¹ anthocyanins in a buffer at pH 1.5, without alcohol, for one hour of encapsulation. As the cell mass increases, the interface between anthocyanins and cells increases. So we anticipated that the EE% value increases. However, the cell mass had no significant effect on the efficiency of encapsulation. The use of twice as much cells yielded only 1% EE. This is compatible with the results of Miro Specos et al. (2010). On the other hand, there was a significant difference in the yield of anthocyanins in yeasts in the 0.5 g of cells experiment compared to the other two cell masses. The concentration of anthocyanins encapsulated in $\mu\text{g}/100$ mg of cells in the case 0.5 g test was the highest with 36 μg of anthocyanins.



Similar letters (or number of asterisks) do not differ significantly, $p < 0.05$

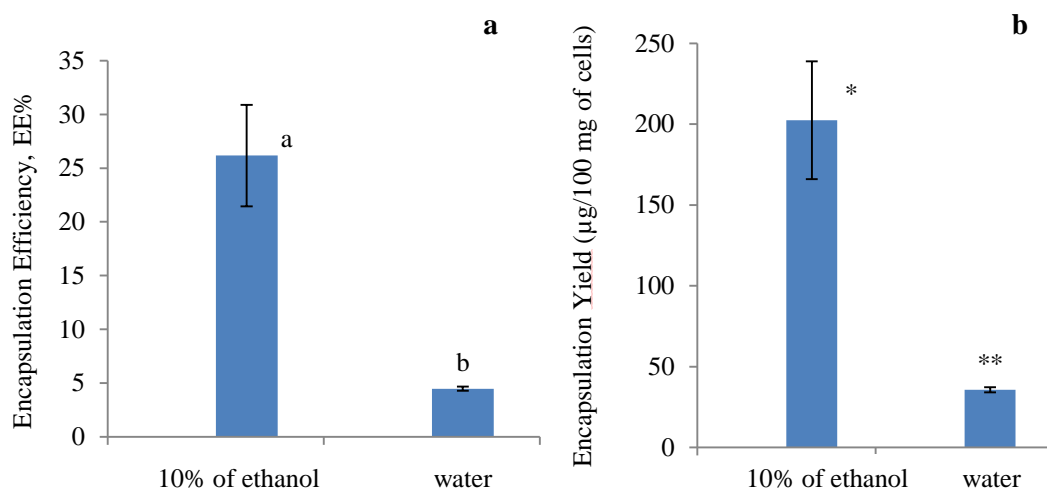
Fig. 2. EE (%) (a) and EY ($\mu\text{g}/100$ mg of cells) of anthocyanins microparticles with different cell masses.

3.1.2. Effect of ethanol

The effect of ethanol on membrane lipids can be measured using molecular simulations. Under the effect of ethanol, the lipid bilayer undergoes a phase transition making interdigitating areas appear on both layers, significantly reducing its thickness. Ethanol

therefore modifies the area and the thickness of the lipid layer. The area of a lipid is increased by an average of 6%, and the thickness is slightly decreased. The total volume occupied by a lipid is not substantially modified, but the increase of the area of a lipid can have important consequences on the membrane function (Patra et al., 2006). This phenomenon, as well as an increase in membrane fluidity, is responsible for increased permeability of the lipid bilayer to polar molecules and a decrease in membrane protein activity (Patra et al., 2006).

Using 10% of ethanol in the anthocyanin extract to be encapsulated led to a specific effect of ethanol on the effectiveness of the encapsulation (Fig. 3). Ethanol increased 5 times the effectiveness of encapsulation and also the amount of anthocyanin in 100 mg of cells compared to the extract without alcohol whereas Paramera et al. (2011) showed a negative effect of 50% of ethanol in the encapsulation of curcumin. However, both the molecules and the ethanol concentrations were different. In our study, the solubility of anthocyanin was almost similar and it is likely that the 10% ethanol had only an effect on the cell whereas for Paramera et al. (2011), the best conditions were surprisingly the conditions of low curcumin solubility suggesting that the best encapsulation occurred for aggregates.

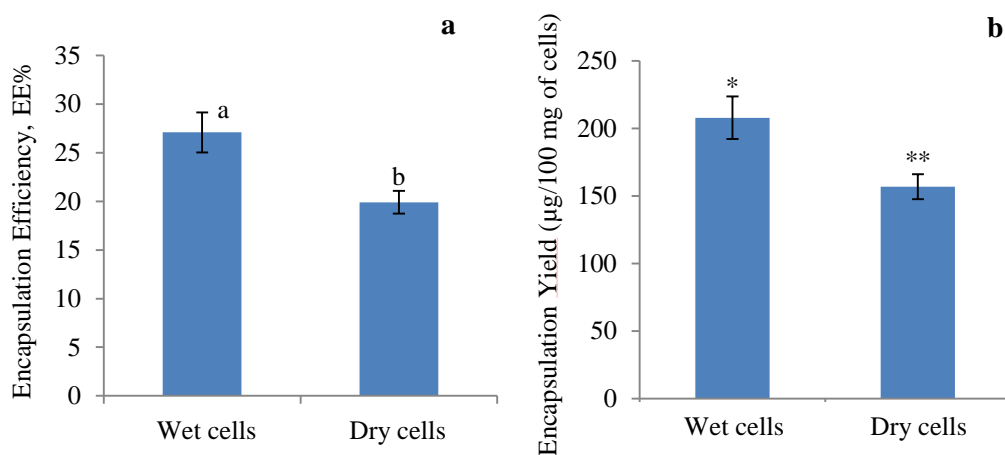


Similar letters (or number of asterisks) do not differ significantly, $p < 0.05$

Fig. 3. Effect of ethanol on EE (%) (a) and EY ($\mu\text{g}/100\text{ mg}$) (b) of anthocyanins microparticles.

3.1.3. Effect of cell water status (dry or wet)

Water is always an important factor. Cell water status (wet or dry cells) may affect the capacity of transfer of anthocyanins into cells. Emptied of water cells could bring more anthocyanin than full cells. Fig. 4 shows the comparison of the efficiency of the encapsulation of anthocyanins in the wet and dry cells with the parameters already chosen above (0.5 g of wet cells, 10% of alcohol in the extract). The dry cell mass was 25% of the wet cell mass so that their cell numbers were equivalent. The dried cells tested had been lyophilized.



Similar letters (or number of asterisks) do not differ significantly, $p < 0.05$

Fig. 4. Effect of cell water status (dry or wet) on EE (%) (a) and EY ($\mu\text{g}/100\text{ mg}$) (b) of anthocyanins microparticles.

The results show that the change of wet cell to dry cell did not improve the efficiency of encapsulation of anthocyanins. In contrast, dry cells significantly decreased the EE% value from 27% (EE) to 20%. The yield of anthocyanins encapsulated by the wet cells was also higher than by the dry cells. Anthocyanins are hydrophilic molecules, if the water content is low, the permeability of yeasts to anthocyanins could be decreased. This transfer phenomenon as a function of the water content is observed for hydrophilic and hydrophobic molecules and for different types of capsules (Morillon, Debeaufort, Blond, Capelle, & Voilley, 2002). Furthermore, the structure of the cell envelope can be modified after freeze-drying. Indeed, Normand et al. (2005) found for dry yeast cells that a layer of parietal proteins was formed and prevented any transfer through the cell membrane.

We have deduced the appropriate parameters for the encapsulation of *Hibiscus* anthocyanins in yeast cells which were the use of wet cells at 0.5 g of cell mass for 5 ml of anthocyanin extracts at 1 g.L⁻¹ with 10% of ethanol. After encapsulation, the microparticles that contain hibiscus anthocyanins exhibited a red-violet colour compared to the initial colour of the cells that was white (Fig. 5).



Fig. 5. Yeast cells before (left) and after (right) the encapsulation of anthocyanins from *Hibiscus*.

3.2. Storage stability

One of the purposes of microencapsulation is to enhance the stability of active compounds. For extracts dispersed in solution, the evaluation of the concentration of anthocyanins was made difficult by the presence of aggregates that solubilised at 37 °C or even more at 90 °C, increasing thereby the detected concentration. By evaluating the evolution of the colour, instead of observing the degradation alone, the result of solubilisation and of degradation was taken into account.

The impact of temperature on the stability of encapsulated anthocyanins is presented in Fig. 6 by comparing the percentage of loss of colour (%) after storage at 5 and 37 °C. For microparticles in water, a strong degradation was observed at 37 °C. This degradation can be explained by the effect of temperature, because the high temperature, which favours the cleavage of intramolecular bonds of anthocyanins resulting in colourless smaller molecules (G. A. F. Hendry & Houghton, 1996; Sinela et al., 2017), has been more active in the extracts than in the cells. For example, coumarin glycoside has long been identified as a common product of thermal degradation of anthocyanidin 3,5-diglycosides (G. A. F. Hendry & Houghton, 1996). More specifically, the study of Fulcrand & Dornier (2017) on hibiscus anthocyanins degradation has shown that, at 37 °C, delphinidine 3-sambubioside and cyanidine 3-sambubioside led to the formation of gallic acid and protocatechuic acid, which are colourless molecules. They also showed that the rate constants (k) increased 38-fold from $0.24 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 4 °C to $9.2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 37 °C for delphinidine 3-sambubioside and from $0.39 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 4 °C to $8.4 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 37 °C for cyanidine 3-sambubioside. However, temperature is not the only factor that affects this degradation. The colour of anthocyanins was degraded and this could result from the activity of yeast enzymes as it has already been shown (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009). We have therefore tried to inactivate these enzymes by bleaching the yeast through a heat treatment of 5 min at 75 °C. For a 37 °C exposure, the percentage of loss of colour was only of 2.5% for heat treated yeast compared to 36.5% in the case of the untreated yeasts. This very markedly lower degradation ($p < 0,01$) highly suggested that the degradation effect was enzyme-driven.

We wanted then to study the effect of pH as the stability of anthocyanins is very dependent on this parameter (G. A. F. Hendry & Houghton, 1996). It can be noted that the extraction solution of anthocyanins was acid and that the pH of the aqueous suspension of the microparticles made of yeast with or without heat treatment was of 3.8 and 2.6, respectively. This shows that heat treatment affects the cell structure of the yeast. This difference is significant between treated cells that make the pH grow and untreated ones that maintain

acidic conditions. Although the reason has not been investigated yet, a remaining physiological activity for untreated cells would not explain the increase in pH for heated cells. The increase in pH could thus be due to a conformational change resulting in the accessibility of previously masked pH active groups. For their part, the pH of both microparticles in chlorate buffer at pH 1.5 was the same. Working in this buffer at pH 1.5 and 37 °C with the non-heat-treated cells, the degradation decreased strongly compared to similar conditions in water (Fig. 6). We can think that this pH had an effect on the cells to inhibit enzyme activity and had directly impacted the anthocyanins present on the wall of the cells (which contribute a lot to the colour). However, a slight negative pH effect was observed when keeping a more acidic pH for the microparticles with heat-treated yeasts. The percentage of loss of the colour in acid solution was of 5%, whereas it was of 2.5% in the case of water. According to [Hendry & Houghton \(1996\)](#), in highly acidic media (i.e. < pH 2, corresponding to the case of both microparticles in chlorate buffer pH 1.5) the red flavylium cation (AH^+) is the main anthocyanin species present. With an increase in pH the flavylium cation yields the quinonoidal base (A) through a rapid loss of a proton, a mixture of flavylium cations and quinonoidal bases exists at pH values of 2-4. It is possible that chlorate anions in buffer reacted with flavylium cations and caused a loss in the red colour of anthocyanin.

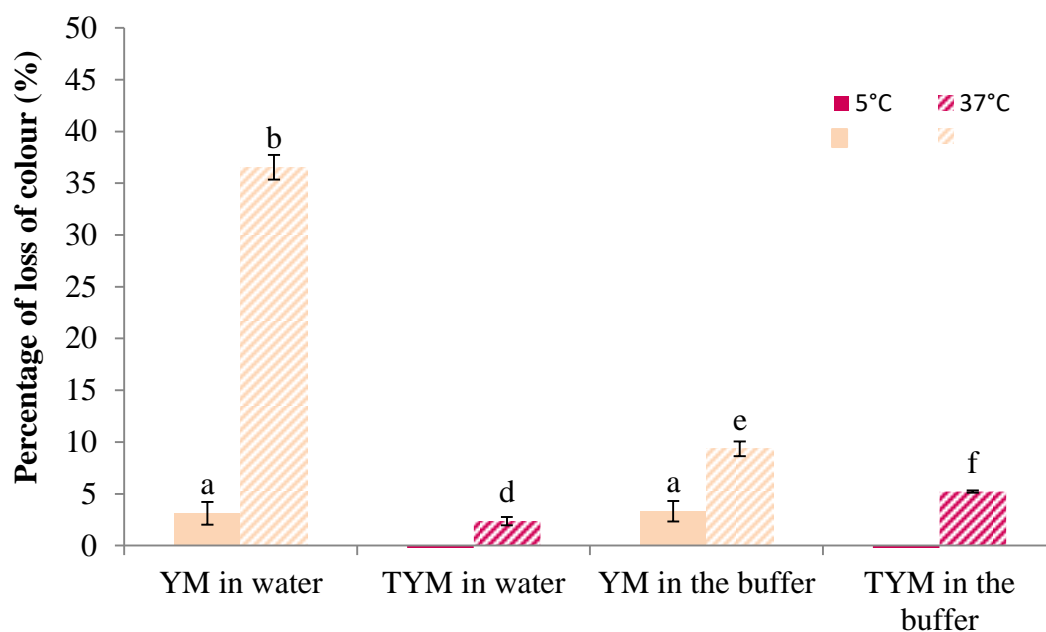
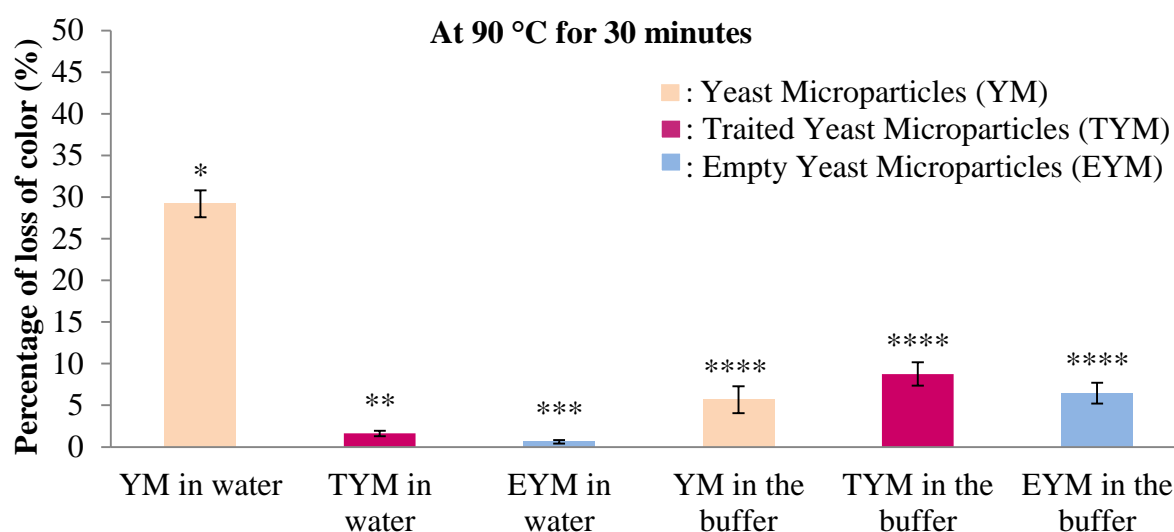


Fig. 6. Percentage of loss of colour (%) of the yeast microparticles ■ (YM) and treated yeast microparticles ■ (TYM) after 10 days at 5 °C and 37 °C (stripe).

To better understand the degradation phenomenon at high temperature, we studied the anthocyanin protective capacity of microparticles at 90 degrees (T° for which the enzyme are

inactivated). Besides the control and the heat-treated cells, we also studied anthocyanin microparticles made of empty yeasts (after emptying the cytoplasm). At 90 °C (Fig. 7), the loss of colour was significant in non-heat treated cells whereas it was very low for treated cells. This suggests another effect such as, for example, a structural change due to the heat treatment or the autolysis procedure with possibly a deeper or more protective encapsulation of the anthocyanins. As observed above, the degradation was higher for microparticles in the buffer environment. However, for untreated cells, the degradation, which was similar to other conditions in the buffer, was very low compared to the one observed for microparticles in water.



Similar letters not differ significantly, $p < 0.001$

Fig. 7. Percentage of loss of colour (%) of the different microparticles after 30 mins at 90 °C

4. Conclusion

Yeast cells microparticles have shown to be a good material for the encapsulation of anthocyanins as long as certain precautions are taken. First of all, inactivation of yeast enzymes has to be performed prior encapsulation. Our results showed that heat-treated yeasts exhibited less anthocyanin degradation during treatment than non-heat-treated yeast microparticles. Then, although encapsulation can exhibit good protective properties, anthocyanins that contribute to colour and are present on the surface of yeast are sensitive to the solvent which has to be chosen accordingly. Acidic solutions showed a higher protecting effect during storage than water.

Acknowledgements

This study was funded by the “Agence universitaire de la francophonie” and BPI (OSEO A1108002D) in the frame of the Natencaps project.

References

- Betz, M., & Kulozik, U. (2011). Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia Food Science*, *1*, 2047-2056.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113* (4), 859-871.
- Chranioti, C., Nikoloudaki, A., & Tzia, C. (2015). Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. *Carbohydrate Polymers*, *127*, 252-263.
- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, R., & Sock, O. (2009). *Le bissap (Hibiscus sabdariffa L.) : composition et principales utilisations* (Vol. 64).
- Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P.-E., Chevalier, M., & Baumgartner, P. (2007). Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloids*, *21* (5), 953-960.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40* (3), 173-289.
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2014). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry*, *153*, 272-278.
- Hendry, G. A. F., & Houghton, J. D. (1996). Natural Food Colorants. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.): Springer US.
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chemistry*, *63* (4), 491-498.
- Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 244-309). Boston, MA: Springer US.
- Mahdavee-Khazaei, K., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Hemmati Kakhki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's

- anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105, 57-62.
- Miró Specos, M. M., Escobar, G., Marino, P., Puggia, C., Defain Tesoriero, M. V., & Hermida, L. (2010). Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques. *Journal of Industrial Textiles*, 40 (1), 13-32.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors Affecting the Moisture Permeability of Lipid-Based Edible Films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1), 67-89.
- Normand, V., Dardelle, G., Bouquerand, P.-E., Nicolas, L., & Johnston, D. J. (2005). Flavor Encapsulation in Yeasts: Limonene Used as a Model System for Characterization of the Release Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (19), 7532-7543.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., & Karathanos, V. T. (2011). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 125 (3), 892-902.
- Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Holopainen, J., & Karttunen, M. (2006). Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 90 (4), 1121-1135.
- Pham-Hoang, B., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Waché, Y. (2013). Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (15), 6635-6645.
- Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H., & Ji, R. (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *International Journal of Pharmaceutics*, 349 (1-2), 83-93.
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234-241.
- Stoll, L., Costa, T. M. H., Jablonski, A., Flôres, S. H., & de Oliveira Rios, A. (2016). Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its Application in Active Biodegradable Films. *Food and Bioprocess Technology*, 9 (1), 172-181.
-

Supplementary materials

For the colour loss study, the red colour, which is directly related to the anthocyanin content, is one of the important factors for the evaluation of the quality of the anthocyanins

encapsulated. Tables 19 and 20 present results of colour measurement with the values of the colorimetric parameters a^* , b^* , L^* , as well as calculated ΔE^* for the initial time and after 10 days storage at 5 and 37 °C or after 30 min at 90 °C.

Table S1. Colour indices (a^* , b^* , L^* , and ΔE^*) in different microcapsules after production (0) and after 10 days storage (t) at 5 and 37 °C.

Conditions and Samples		a^*			b^*			L^*			ΔE^*	
		a_c^*	a_0^*	a_t^*	b_c^*	b_0^*	b_t^*	L_c^*	L_0^*	L_t^*	ΔE_0^*	ΔE_t^*
5 °C	YM in water	-1,17	19,35	18,70	0,74	1,70	-1,72	42,70	34,02	34,60	22,30	21,59
	TYM in water	-1,74	23,26	23,80	0,17	5,71	5,09	48,20	25,99	25,52	33,90	34,50
	YM in the buffer	-1,35	20,06	18,36	0,13	4,12	1,26	42,69	29,14	27,66	25,66	24,81
	TYM in the buffer	-1,13	21,53	21,76	-0,34	6,07	5,64	46,35	24,89	24,09	31,86	32,49
37 °C	YM in water	-1,17	19,48	7,95	0,74	1,38	1,35	42,70	33,26	31,55	22,71	14,41
	TYM in water	-1,74	23,14	23,21	0,17	5,69	6,13	48,20	25,88	27,31	33,88	33,08
	YM in the buffer	-1,35	20,04	16,28	0,13	4,02	4,42	42,69	28,65	27,84	25,88	23,45
	TYM in the buffer	-1,13	21,30	17,61	-0,34	6,01	6,06	46,35	24,52	23,46	31,94	30,28

Yeast Microparticles (YM); Treated Yeast Microparticles (TYM)

Table S2: Colour indices (a^* , b^* , L^* , and ΔE^*) in different microcapsules after production (0) and after 30 min at 90 °C.

	a^*			b^*			L^*			ΔE^*	
	a_c^*	a_0^*	a_t^*	b_c^*	b_0^*	b_t^*	L_c^*	L_0^*	L_t^*	ΔE_0^*	ΔE_t^*
YM in water	-1,17	20,53	14,94	0,74	-0,09	3,21	42,70	32,33	37,68	24,06	17,05
TYM in water	-1,74	21,7	21,44	0,17	5,06	7,37	48,20	25,72	26,87	32,84	32,31
EYM in water	-2,92	15,58	16,82	5,10	3,75	6,26	49,52	23,58	25,57	21,99	31,80
YM in the buffer	-1,35	19,38	15,14	0,13	3,30	5,99	42,69	28,05	26,25	25,58	24,02
TYM in the buffer	-1,13	21,01	13,72	-0,34	5,62	5,14	46,35	24,68	24,14	31,56	28,79
EYM in the buffer	-2,88	16,72	16,09	5,53	5,32	6,74	49,47	23,56	22,31	32,59	30,48

Yeast Microparticles (YM); Treated Yeast Microparticles (TYM); Empty Yeast Microparticles (EYM)

3.2. Article 3 : *Microencapsulation of Hibiscus Sabdariffa L. calyx anthocyanins with yeast hulls*

Cette publication est soumise pour *Journal Food Science and technology* sous le numéro JFST-D-18-00317

J Food Sci Technol



ORIGINAL ARTICLE

Microencapsulation d'anthocyanes d'*Hibiscus Sabdariffa L.* calyx dans des écorces de levure

T-Thu Nguyen, Andrée Voilley, Tran Thi Thu Thuy, Yves Waché

Résumé:

Les écorces de levure, en raison de leur couche mince de mannoprotéines spécifiques et de leur teneur élevée en β -glucane, constituent un matériau prometteur pour l'encapsulation et en particulier pour stabiliser la couleur des anthocyanes. Cette étude évalue le potentiel des enveloppes de levure sur l'encapsulation par lyophilisation d'extraits riches en anthocyanes de *Hibiscus Sabdariffa L.* par rapport aux microcapsules de maltodextrine. La teneur en eau (5,28-16,38%), l'activité de l'eau ($<0,039-0,307$) et l'hygroscopicité (17,50-25,99 g/ 100 g) des poudres obtenues ont été mesurées. La stabilité des anthocyanes encapsulées, contrôlée par la teneur totale d'anthocyanes, a été évaluée avec la méthode spectrophotométrique à différents pH après la production et après un stockage de 10 semaines dans différentes conditions de température (5/ 37 °C), humidité (45/ 85% HR), en présence ou en l'absence de lumière. Les paramètres de couleur (a , b^* , L^* , C^* , H° , ΔE^*) des poudres ont également été mesurés. Les résultats ont indiqué que les écorces de levure présentaient une bonne capacité à protéger les anthocyanes contre l'influence de la température, de la lumière et de l'humidité par rapport aux extraits riches en anthocyanes lyophilisés ($p < 0,05$). Les écorces de levure protègent mieux les anthocyanes que la maltodextrine dans des conditions d'humidité élevées ($p < 0,05$).

Microencapsulation of *Hibiscus Sabdariffa* L. calyx anthocyanins with yeast hulls

T-Thu Nguyen^{1,2,3*}, Andrée Voilley¹, Tran Thi Thu Thuy³, Yves Waché^{1,2}

¹International Joint Laboratory Tropical Bioresources & Biotechnology between UMR PAM (Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France) & SBFT (Hanoi University of Science & Technology, Hanoi, Vietnam).

²The Natencaps project

³Institute of Natural Products Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

* Corresponding author at: UMR PAM, AgroSup Dijon, University of Burgundy, 21000 Dijon, France; E-mail address: nguyenthul712@gmail.com

Keywords: Encapsulation, Anthocyanin, Yeast hulls, Maltodextrin, *Hibiscus sabdariffa* L.

Abstract

Yeast hulls, because of their specific thin mannoprotein layer and high content of β -glucan, constitute a promising material for bioactive encapsulation and particularly to stabilise the colour of anthocyanins. This study evaluates the potential of yeast hulls on the freeze-drying encapsulation of anthocyanins-rich extract from *Hibiscus Sabdariffa* L. calyx with comparison to maltodextrin microcapsules. The moisture content (5,28-16,38%), water activity (< 0,039-0,307) and hygroscopicity (17,50-25,99 g/ 100 g) of obtained powders were measured. The stability of encapsulated anthocyanins, monitored through the total anthocyanin content, was evaluated with the pH differential method immediately after production and after a 10-week storage under different conditions of temperature (5/37 °C), humidity (45/85% RH), in presence or absence of light. The colour parameters (a, b*, L*, C*, H°, ΔE^*) of powders were also measured. The results indicated that yeast-hulls showed a good ability to protect anthocyanin against the influence of temperature, light, moisture compared to freeze-dried anthocyanins-rich extracts (p < 0,05). Yeast hulls protected anthocyanin better than maltodextrin under high humidity conditions (p < 0,05).

Introduction

Hibiscus sabdariffa extracts are commonly known as a rich source of anthocyanins, which are responsible for the bright red colour of the flower or buds. Due to their high colour density and antioxidant capacity, this plant has been used from times as a traditional medicine (Ali et al., 2005), infusion (Mahadevan, Shivali., & Kamboj, 2009), colorant or dye (Bridle & Timberlake, 1997). The hibiscus colour is used worldwide in the production of foods, beverages, pharmaceuticals and cosmetics (Grajeda-Iglesias, Salas, Barouh, Baréa, & Figueroa-Espinoza, 2017; Wong et al., 2002). However, *Hibiscus* has a rather poor colour stability because of anthocyanin weakness. The most frequent anthocyanins of *H. sabdariffa* calyces are cyanidin-3-sambubioside and delphinidin-3-sambubioside (Sinela et al., 2017; Wong et al., 2002).

Anthocyanins possess a highly reactive polyphenolic nature, resulting in their high antioxidant activity, but also in their high sensitivity, which can lead to denaturation. Previous investigations emphasised the effect of temperature, light, moisture and time on anthocyanin degradation (Akhavan-Mahdavi et al., 2016; Jackman & Smith, 1996; Sinela et al., 2017).

Microencapsulation, a technique to package active compounds in the form of micro-particles, can protect sensitive materials from moisture, heat, light or oxidation. In strategies for the selection of materials, the interaction between encapsulation material and active needs careful consideration (Mishra, 2015). Yeast hulls or walls (YH) are widely used in the oenological industry. They are usually added to improve either technological processes or the sensory characteristics of wines. Grape pigments, in particular anthocyanins, are adsorbed by YH during winemaking, and this could have some effects on the sensory characteristics of wines (Caridi, 2007). The use of YH has thus been proposed to stabilize the colour of red wines (Francois, Alexandre, Granes, & Feuillat, 2007). However, the mechanisms of sorption of anthocyanins on YH are unknown. This sorption has been shown to occur together with the one of other phenolic compounds responsible for off-flavour (Palomero, Ntanos, Morata, Benito, & Suárez-Lepe, 2011) and for these later compounds, sorption depends on the structure and composition of the cell wall. For instance, sorption is different on intact, dried or autolysed cells (Chassagne, Guilloux-Benatier, Alexandre, & Voilley, 2005). In particular the drying process has been shown to increase cell hydrophobicity and thereby the sorption of small phenolic compounds (Pradelles, Vichi, Alexandre, & Chassagne, 2009). However, except in some specific cases like the sorption of 4-ethylphenol which decreases when the Gas1-mannoprotein-encoding genes is deleted (Pradelles, Alexandre, Ortiz-Julien, & Chassagne, 2008), no sorption to a specific molecule has been detected. For anthocyanins, it

has been shown that the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* can adsorb them to different degrees depending on the strain (Morata, Gómez-Cordovés, Colomo, & Suárez, 2005). The cell wall of *S. cerevisiae* is composed of β -glucans, forming a central layer with a thickness of about 130 nm, surrounded by a mannoprotein-rich layer, around 15 nm-thick, and surrounding a small amount of chitin (Normand et al., 2005) and it is likely that anthocyanins interact with the cell-wall-network depending on its porosity, moisture and structure. It has been demonstrated that the cell wall let molecules with weight up to 400 kDa diffuse freely (De-Nobel et al., 1990). Hence, some researchers have introduced recently YH as a novel wall materials for encapsulation, for example for the encapsulation of probiotics (Mokhtari, Jafari, Khomeiri, Maghsoudlou, & Ghorbani, 2017) and of carvacrol (Da-Silva-Lima, Maciel, Mendonça, & Costa-Junior, 2017). However, there are no studies currently using YH to encapsulate anthocyanins. We have recently used yeast cells to encapsulate anthocyanins as colouring materials, showing a good protective effect of yeast cell walls but a rather low Encapsulation Efficiency (208 mg/100 g) (T. T. Nguyen et al., 2018). By using YH instead of whole cells, the amount of encapsulating materials could be decreased and thus the Encapsulation Efficiency increased, while the protective performance of yeast walls could be maintained.

The objective of this work was to evaluate the potential of YH for encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins by characterising and evaluating the stability of YH microparticles, their capacity of protection of anthocyanins and the colour of yeast hulls microparticles in comparison with maltodextrin (MD) microparticles.

Materials and methods

A detailed description of chemicals and used sample can be found as supplementary material.

Microencapsulation of hibiscus anthocyanins

MD was dissolved in distilled water to obtain a 40%-total solid concentration. The solution was kept in the refrigerator for complete hydration for 24 h. Then, the extract of anthocyanins from *H. sabdariffa* (5 g total anthocyanins/l) and wall materials were mixed, in a ratio of 5:1 (v/w) extract:yeast-hull and 3:5 (v/v) extract:MD, at 140 rpm, 27 °C during 1 hour. The solutions were lyophilized for 48 h using a freeze-dryer (Thermo Fisher Scientific–Powerdry PL 6000-Tehovec, Mukarov, Czech Republic) with a condenser temperature of -55 °C and a pressure of 0,03 hPa. Dried materials were ground and stored at -18 °C until use.

For preparation of control sample, the concentrated *Hibiscus* extract (HE) without wall materials was freeze-dried in conditions similar to other samples.

Determination of the physical properties of the final powders

Water activity (a_w) of powders was determined using an AquaLab-water-activity meters (Series 3 TE, USA). Temperature was maintained at 25 ± 0.1 °C during the tests. The moisture was determined using the AOAC method (AOAC, 2005), where the mass loss was determined after 1 g of powder was placed in an oven-dryer at 105 °C for 24 h. Hygroscopicity was determined according to the method proposed by (Mahdavee-Khazaei et al., 2014), with some modifications. Approximately 2 g of the powder was distributed evenly in a glass disk and placed in a hermetic box containing a NaCl-saturated solution and placed in a 25 °C incubator (MIR – 162, Sanyo, Japan). After 1 week, the samples were weighed and the hygroscopicity was expressed as gram of absorbed moisture per 100 g dry solids (g/100g).

Measurement of total anthocyanins content

Total monomeric anthocyanins were measured using pH differentials following the method described by Giusti and Wrolstad (Giusti & Wrolstad, 2001). Absorbance was measured at 520 nm and 700 nm. Total anthocyanin content was calculated as gram of cyanidin-3-glucoside per kilogram dry weight basis, using an extinction coefficient of $26.900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ and a molecular mass of $449,2 \text{ g.mol}^{-1}$. Triplicate analyses were performed for each treatment.

Evaluation of the stability of encapsulated anthocyanins during storage

The degradation of anthocyanins was monitored for 10 weeks and the anthocyanin content was analysed as described in section 2.5.

Two grams of microcapsules in glass disk were stored in presence of a saturated potassium chloride (KCl, $a_w \approx 0,85$) solution or potassium carbonate (K_2CO_3 , $a_w \approx 0,45$) at refrigeration (5 °C) or tropical (37 °C) temperature, in presence or absence of light (at 37 °C) for 10 weeks. The light illumination was obtained from OSRAM Cool daylight with power of 23 W and luminous flux of 1600 lm (LEDVANCE GmbH, Germany) equipped in an incubator (AL654/135 liter, Aqualytic, Germany).

Colour analysis of samples

Two hundreds milligrams of microcapsules were suspended in 10 ml of water. The mixture was then stirred for 1 h in a 15 ml-tube at 140 rpm and 27 °C using a Thermoshake Incubating Orbital Shaker (Gerhardt, Germany).

Colour properties of anthocyanins solutions were measured using a colourimeter Chroma meter CR-400 (Konica Minolta, Japan) which refers to the colour space CIE L^* , a^* , b^* , with a D-light source, standard 65°-viewer and 8-mm-light-beam diameter. Colour measurements were obtained by placing anthocyanins solutions in a glass container with an

optically-clear bottom. Values of chroma (C^*), hue angle (H°) and total colour difference (ΔE^*) were calculated and the mean of three replicates were reported.

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}; \quad C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}; \quad H^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Where L^* represents lightness, a^* represents redness, b^* represents yellowness and ΔL^* , Δa^* , Δb^* represent the difference between each parameter for the sample after and before storage.

Factorial design and statistical analysis

All analyses were carried out at least in triplicate and results were expressed as means \pm standard deviation. Differences between variables were tested for significance using a one way ANOVA with a p value < 0.05 . Effects and interactions between factors on the colour change were evaluated using complete factorial designs.

Results and discussion

Physical properties of encapsulated anthocyanin powders

[Table 1](#) presents some physical properties of encapsulated anthocyanin powders obtained with the different carriers. There were significant differences among samples concerning all properties tested ($p < 0,05$). The a_w of powders in the presence of a material wall was low; especially with YH. In contrast, the HE powder had the highest a_w (0,307) which was 5 times higher than the a_w of the MD powder. HE samples had also the highest hygroscopicity and moisture content. This is explained by the sugar groups present in the anthocyanins and the sugars present in the hibiscus extract such as glucose and fructose which are hygroscopic materials ([Barbosa-Cánovas & Vega-Mercado, 1996](#)) present both at 1,1-1,3 g/100 g as reported by Wong et al ([Wong et al., 2002](#)). The difference in hygroscopicity as well as in moisture between YH and MD powders was low with a slightly higher value in YH samples.. In addition, the cell wall of *S. cerevisiae* consists in around 50% of β -glucan ([Normand et al., 2005](#); [Pengkumsri et al., 2017](#)) which is a polysaccharide of D-glucose monomers, linked by glycosidic bonds. Mannoproteins constitute about 30–50% of the dry weight and maintain the porosity of the cell wall ([Normand et al., 2005](#)), which facilitates water penetration. Moreover, the anthocyanin content in YH powder was also higher than in MD powder. Therefore, the moisture absorption of YH powder may be due to glucan and/or to the anthocyanin content.

Table 1: Physical properties of encapsulated anthocyanin powders

	Moisture (%)	Hygroscopicity at 75 % RH (g/100g)	a_w	Anthocyanins content (mg/100g)
YH	$5.95 \pm 0,02^a$	20.47 ± 0.11^a	$<0,039^a$	515 ± 3
MD	$5.28 \pm 0,04^b$	$17.50 \pm 0,03^b$	$0,065 \pm 0,004^b$	425 ± 6
HE	$16.38 \pm 0,03^c$	25.99 ± 0.10^c	$0.307 \pm 0,003^c$	1308 ± 11

Different letters differ significantly for each column, $p < 0,05$

Stability of encapsulated anthocyanins during storage

As most natural bioactives, anthocyanins suffer from instability. They can be degraded by many factors (Jackman & Smith, 1996). To evaluate the stability, immediately after freeze drying the encapsulated powders were stored in different conditions to study effects of temperature, light, and humidity on the stability of anthocyanin powder.

Fig. 1 shows pictures of freeze-dried powders after a 10-week storage under various conditions. Important differences can be observed between the samples. The control powder (HE) melted under all conditions. The MD powder also melted at 85% RH while the YH powder remained in initial shape. Maltodextrin samples has also been reported to become pasty at 90 and 75% RH after a short life-span of 4 to 6 days (Raja, Sankarikutty, Sreekumar, Jayalekshmy, & Narayanan, 1989). We analysed thus anthocyanin retention and change of colour of powders to better understand the protection capacity of microcapsules.

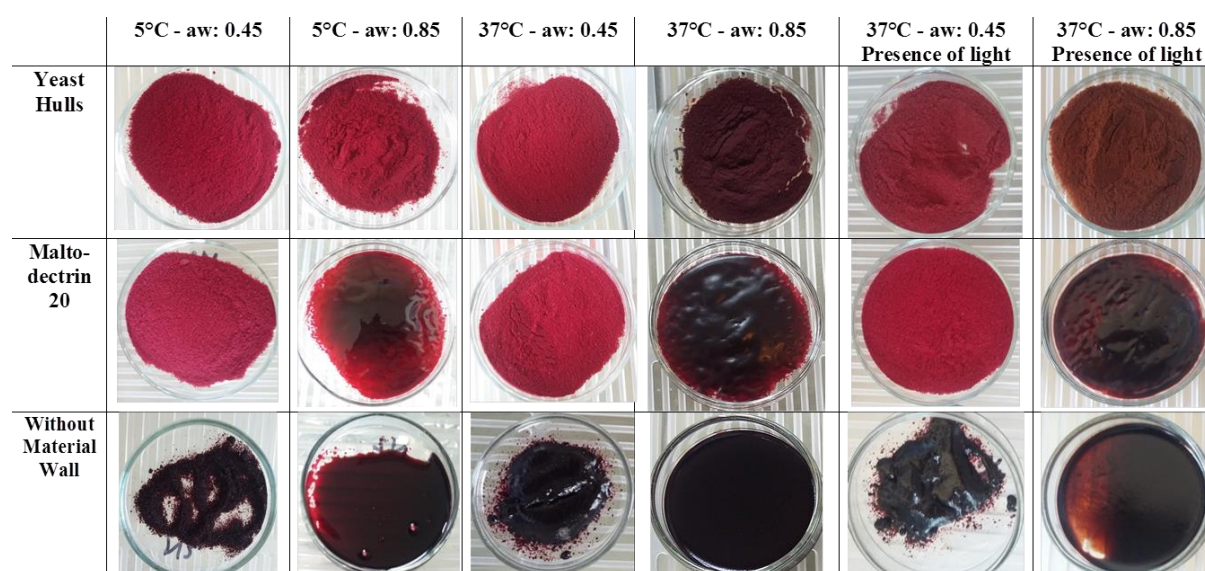


Fig. 1. Freeze dried microencapsulated powders with different wall materials and control (without material wall) after 10 weeks of storage under different conditions

a) Effect of moisture, temperature and of the moisture-temperature interaction

The hygroscopicity was pointed out as one of the major problems related to stability of spray-dried hibiscus powder (Al-Kahtani & Hassan, 1990). The study by Normand et al (Normand et al., 2005) on limonene yeast-cell capsules showed that the transfer of aroma from the cell interior to the external medium takes place only when a_w is higher than 0.7. This is also in agreement with the study by Chassagne et al (Chassagne et al., 2005) who observed a better sorption of phenolic compounds to yeast lees than to dry yeasts. In the present study, the powders are placed in two different a_w conditions, 0.45 or 0.85, and two different temperatures, 5 or 37 °C. The effect of moisture and temperature is shown in Fig. 2.

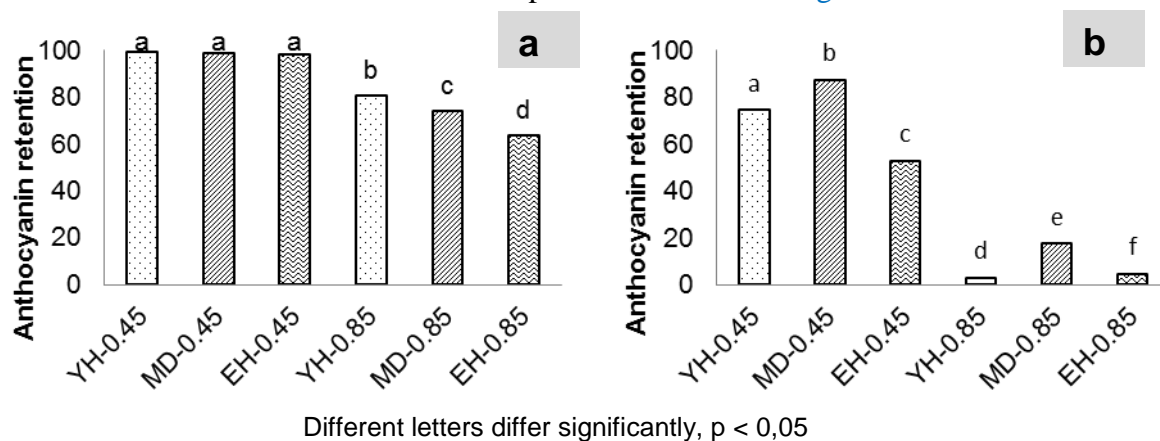


Fig. 2. Anthocyanin retention (%) of encapsulated anthocyanins with different wall materials (YH, MD) and control (EH) after 10 weeks, at 5 °C (A) and at 37 °C (B)

The degradation of total anthocyanins in control samples during storage at 37 °C was significant ($p < 0,05$) in almost all conditions except in combination of 5 °C and 0.45 a_w for which differences were not significant ($p < 0,05$). The degradation of anthocyanin content in all samples was lower than 1%.

Both materials, yeast hull and maltodextrin, showed a significantly different protection of anthocyanins of *Hibiscus* extracts. However, under the influence of high moisture, anthocyanins were better protected in YH than in MD. 0,85 a_w was too high to keep the powder structure for MD. Fig. 1 also confirmed a change in the structure of the MD powder at 0,85 a_w . This result is consistent with the study of Rocha-Parra et al (Rocha-Parra, Lanari, Zamora, & Chirife, 2016). At a combination of 38 °C and 0,58 a_w , the amorphous structure collapsed and caking was observed by scanning electron microscopy. This was related to a dramatic loss of malvidin 3-G as well as losses of the other phenolic compounds and it explains the strong impact of moisture on the stability of anthocyanin encapsulated by MD.

The thermal stability of a product is always interesting. The temperature impact on the stability of encapsulated-anthocyanins evaluated by monitoring the anthocyanin retention after storage is presented in Fig. 2. The protection by the microcapsules was significant ($p < 0,05$) at high temperature. Anthocyanin retention in YH and MD powders decreased from 99 to 75 and 88% respectively when temperatures rose from 5 to 37 °C. According to Sinela et al (Sinela et al., 2017), this degradation can be explained by the sensitivity of *H. sabdariffa* anthocyanins to temperature. Their reaction kinetic constant for isothermal degradation increased 38-fold from $0.24 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 4 °C to $9.2 \cdot 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ at 37 °C. After 60 days, 11% of delphinidin 3-O-sambubioside from the hibiscus extract were lost at 4 °C and 99% at 37 °C. Based on the different endothermic peaks on differential scanning calorimetry thermograms, an interaction between wall materials and the freeze-dried anthocyanins was observed, as a consequence, changes in physical properties, and also a chemical interaction between the compounds and the formation of complex (Pereira-Souza et al., 2017). On the other hand, an interaction between quercetin and yeast cells was also observed by the differences in fluorescence lifetime between quercetin capsules and quercetin in buffers (B.-N. Pham-Hoang et al., 2017). These types of interactions have contributed to the stability of the encapsulated anthocyanins and the different interaction mechanisms of the wall materials provide different protections.

b) Effect of light

Exposure to light can cause foods to spoil faster. Both natural and artificial lights can cause photo-degradation. Exposure to sunlight for 15 days caused the gradual fading of strawberry juice colour in glass bottles wrapped in black paper or not (Z. Wang, Zhang, & Wu, 2015). According to (Pereira-Souza et al., 2017), the effect of a light chamber with four ultraviolet lights (40 W, $0,286 \text{ W m}^2$) at 25 °C was responsible for the degradation of 77% of anthocyanins while the anthocyanin encapsulated by MD showed a protection with a degradation limited to 9%. Besides, a protective effect of yeast cells against light stress was also reported on resveratrol (G. Shi et al., 2008).

Evaluation of the stability of anthocyanins submitted to a temperature of 37 °C in the presence or absence of an artificial cool daylight (23 W, 1600 lm) showed that samples exposed to light in the presence of wall materials presented higher anthocyanin retention ($p < 0,05$). This confirms that encapsulation process could successfully stabilize anthocyanins against light (Fig. 3).

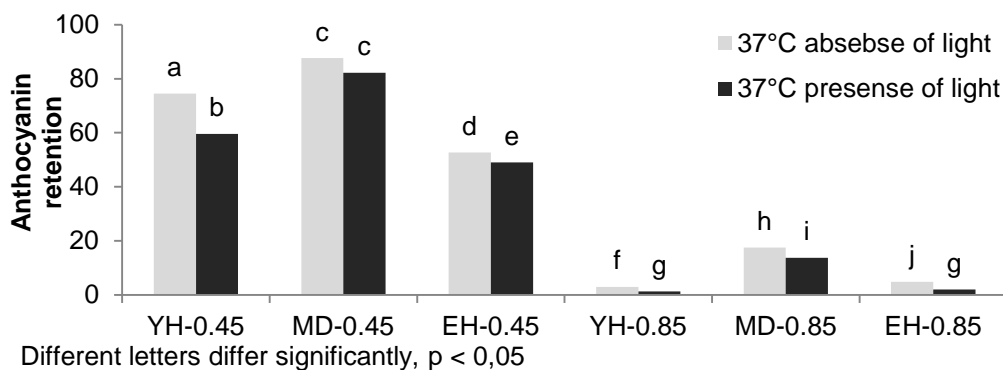


Fig. 3. Anthocyanin retention (%) of encapsulated anthocyanins with different wall materials (YH, MD) and control (EH) after 10 weeks at 37 °C in presence (strip) and absence of light.

Colour evaluation

The red colour, which is directly related to the anthocyanin content, is one of the important factors in evaluating the quality of powders. [Table 2](#) presents results of colour measurement with the values of the colorimetric parameters a^* , b^* , L^* , as well as calculated C^* , H° and ΔE^* for the initial time and after 10 weeks. Because of the collapse and melting of MD powders at 0,85 a_w , the colour measurement could not be performed for these samples. The attractive red colour of the powder was due to the presence of the anthocyanins. The colour parameter a^* (redness) decreased strongly in the combination of 37 °C and 0,85 a_w due to anthocyanin degradation. An increase in L^* was also observed confirming that the parameters L^* and a^* were more sensitive to the retention of anthocyanins ([Jiménez-Aguilar et al., 2011](#)). Overall, modifications at 0,45 a_w or at 5 °C were not significant. Combination of 37 °C and 0,85 a_w , with a decreased a^* and an increased L^* resulted in a lower tone (H°) value. “Hue” is the quality that distinguishes one family of colour from another ([Sikri, 2010](#)), and the strong decrease in H° could be associated with the change in colour tone. According to ([Jiménez-Aguilar et al., 2011](#)), the hue value of all samples were $<10^\circ$ making them described as red samples. Chroma (C^*) is the saturation, intensity or strength of the Hue. The decrease in the chroma value might be related to the degradation of anthocyanins in powders. The increase may be explained by the confounding factors that chroma will increase with the increase in the pigment concentration to a maximum, and then decrease as the colour darkens; therefore, a pink and a dark red colour can have identical chroma values ([Sui, Bary, & Zhou, 2016](#)).

The total colour difference (ΔE^*) increased with increasing temperature or a_w , and were in the range of 0,27 to 5,28. [Fig. 4](#) presents the effects of different factors on ΔE^* using a two-level factorial experiments. For YH, the water activity had a strong influence on the change in colour at 37 °C, but not at 5 °C. The interaction between a_w and temperature was more active than the interaction between a_w and light. Meanwhile, at lower 0,45 a_w , the effect of

temperature and light were weak. According to (Normand et al., 2005), the structure of YH is composed of a thin protein layer and from a a_w around 0,7, there is a change of structure resulting in a breakdown of the cell protection that creates spaces for exchanges with external medium (i.e. air, water...). For MD powder, the weak effects of light and temperature were also observed at 0,45 a_w . Other effects could not be measured because of the collapse at 0,85 a_w which made the collect of ΔE^* not possible.

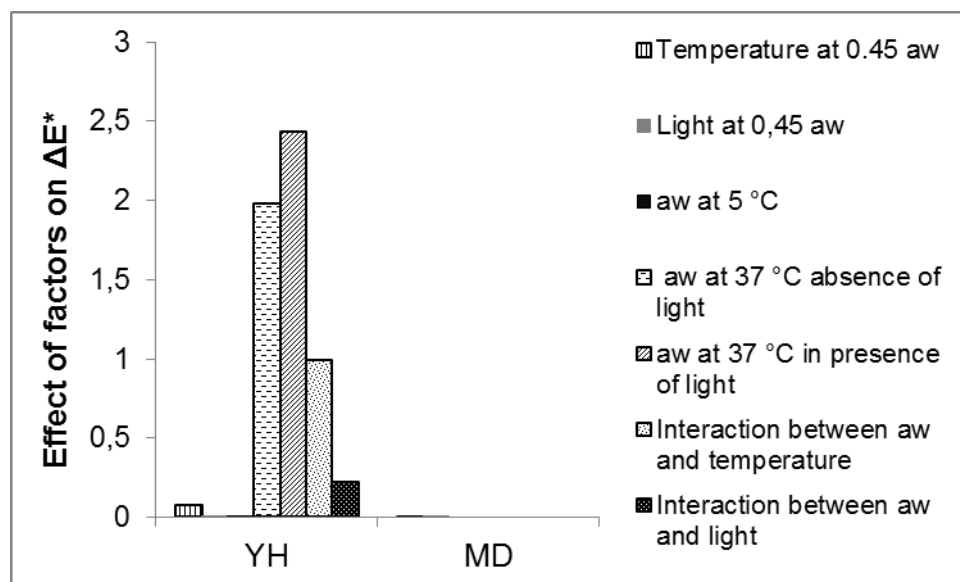


Fig. 4. Effect of temperature, water activity and light on the total colour difference of anthocyanins encapsulated with different wall materials, between before and after 10 weeks at 37 °C

Conclusion

Yeast hulls have been shown to be a good material for protection with a EE% increased by 150% compared to the use of whole yeast cells (T. T. Nguyen et al., 2018). The results of the stability of encapsulated anthocyanins during storage showed that YH powder had a higher resistance to moisture than MD powder. However, in low humidity and high temperatures, YH powder presented a lower protective effect on anthocyanin than MD powder ($p < 0,05$) with a small degradation of the colour. However, in general, YH showed an ability to protect anthocyanins against the influence of temperature, light and moisture, which was comparable to MD making this material a good alternative for MD in humid environments.

Acknowledgements

This study was funded by BPI (OSEO A1108002D) in the frame of the Natencaps project and supported by the Regional Council of Bourgogne – Franche Comté, the “Fonds Européen de DEveloppement Régional (FEDER)”. Thu NGUYEN was funded by the “Agence universitaire de la francophonie” and the association “Rencontre du Vietnam”. The authors

are thankful to C. Rojas for technical support. This paper is dedicated to the memory of David Chassagne.

References

- Akhavan-Mahdavi S, Jafari SM, Assadpour E, Ghorbani M (2016) Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation *Journal of Food Engineering* 181:59-66 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.003>
- Al-Kahtani HA, Hassan BH (1990) Spray Drying of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract *Journal of Food Science* 55:1073-1076 doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb01601.x
- Ali BH, Wabel NA, Blunden G (2005) Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review *Phytotherapy Research* 19:369-375 doi:10.1002/ptr.1628
- AOAC (2005) Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists AOAC, Gaithersburg, MD, USA 18th ed.
- Barbosa-Cánovas GV, Vega-Mercado H (1996) Dehydration of Foods. Springer,
- Bridle P, Timberlake CF (1997) Anthocyanins as natural food colours--selected aspects *Food Chemistry* 58:103-109 doi:10.1016/s0308-8146(96)00222-1
- Caridi A (2007) New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity *International Journal of Food Microbiology* 120:167-172 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.032>
- Chassagne D, Guilloux-Benatier M, Alexandre H, Voilley A (2005) Sorption of wine volatile phenols by yeast lees *Food Chemistry* 91:39-44 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.044>
- da-Silva-Lima A, Maciel A-P, Mendonça C-d-J-S, Costa-Junior LM (2017) Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) *Industrial Crops and Products* 108:190-194 doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.037>
- De-Nobel JG, Klis FM, Munnik T, Priem J, Van-Den-Ende H (1990) An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe* *Yeast* 6:483-490 doi:10.1002/yea.320060605
- Francois J-M, Hervé Alexandre, Granes D, Feuillat M (2007) Vers une meilleure connaissance des produits dérivés de levures *revue des oenologues* 122:9-12
- Giusti MM, Wrolstad RE (2001) Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/0471142913.faf0102s00

- Grajeda-Iglesias C, Salas E, Barouh N, Baréa B, Figueroa-Espinoza MC (2017) Lipophilization and MS characterization of the main anthocyanins purified from hibiscus flowers Food Chemistry 230:189-194 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.140>
- Jackman RL, Smith JL (1996) Anthocyanins and betalains. In: Hendry GAF, Houghton JD (eds) Natural Food Colorants. Springer US, Boston, MA, pp 244-309. doi:10.1007/978-1-4615-2155-6_8
- Jiménez-Aguilar DM, Ortega-Regules AE, Lozada-Ramírez JD, Pérez-Pérez MCI, Vernon-Carter EJ, Welti-Chanes J (2011) Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material Journal of Food Composition and Analysis 24:889-894 doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.04.012>
- Mahadevan N, Shivali., Kamboj P (2009) *Hibiscus sabdariffa* Linn.-An overview Natural Product Radiance 8:77-83
- Mahdavee-Khazaei K, Jafari SM, Ghorbani M, Hemmati Kakhki A (2014) Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color Carbohydrate Polymers 105:57-62 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.042>
- Mishra M (2015) Handbook of Encapsulation and Controlled Release. Taylor & Francis,
- Mokhtari S, Jafari SM, Khomeiri M, Maghsoudlou Y, Ghorbani M (2017) The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics Food Research International 96:19-26 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.014>
- Morata A, Gómez-Cordovés MC, Colomo B, Suárez JA (2005) Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes European Food Research and Technology 220:341-346 doi:10.1007/s00217-004-1053-8
- Nguyen TT, Phan-Thi H, Pham-Hoang B-N, Ho P-T, Tran TTT, Waché Y (2018) Encapsulation of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins as natural colours in yeast Food Research International doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.044>
- Normand V, Dardelle G, Bouquerand P-E, Nicolas L, Johnston DJ (2005) Flavor Encapsulation in Yeasts: Limonene Used as a Model System for Characterization of the Release Mechanism Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:7532-7543 doi:10.1021/jf0507893
- Palomero F, Ntanos K, Morata A, Benito S, Suárez-Lepe JA (2011) Reduction of wine 4-ethylphenol concentration using lyophilised yeast as a bioadsorbent: Influence on anthocyanin content and chromatic variables vol 232. doi:10.1007/s00217-011-1470-4

- Pengkumsri N, Sivamaruthi BS, Sitolun S, Peerajan S, Kesika P, Chaiyasut K, Chaiyasut C (2017) Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice Food Science and Technology 37:124-130
- Pereira-Souza A-C, Deyse-Gurak P, Damasceno-Ferreira-Marczak L (2017) Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace Food and Bioprocess Processing 102:186-194 doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.12.012>
- Pham-Hoang B-N, Winckler P, Waché Y (2017) Fluorescence Lifetime and UV-Vis Spectroscopy to Evaluate the Interactions Between Quercetin and Its Yeast Microcapsule Biotechnology Journal:1700389-n/a doi:10.1002/biot.201700389
- Pradelles R, Vichi S, Alexandre H, Chassagne D (2009) Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine International Journal of Food Microbiology 135:152-157 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.019>
- Raja KCM, Sankarikutty B, Sreekumar M, Jayalekshmy A, Narayanan CS (1989) Material Characterization Studies of Maltodextrin Samples for the Use of Wall Material Starch - Stärke 41:298-303 doi:10.1002/star.19890410805
- Rocha-Parra DF, Lanari MC, Zamora MC, Chirife J (2016) “Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine” LWT - Food Science and Technology 70:162-170 doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.038>
- Shi G, Rao L, Yu H, Xiang H, Yang H, Ji R (2008) Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell International Journal of Pharmaceutics 349:83-93 doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.07.044>
- Sikri VK (2010) Color: Implications in dentistry Journal of Conservative Dentistry : JCD 13:249-255 doi:10.4103/0972-0707.73381
- Sinela A, Rawat N, Mertz C, Achir N, Fulcrand H, Dornier M (2017) Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products Food Chemistry 214:234-241 doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071>
- Sui X, Bary S, Zhou W (2016) Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage Food Chemistry 192:516-524 doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.021>

Wang Z, Zhang M, Wu Q (2015) Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage LWT - Food Science and Technology 60:1174-1178 doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.015>

Wong PK, Yusof S, Ghazali HM, Che Man YB (2002) Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Nutrition & Food Science 32:68-73 doi:[doi:10.1108/00346650210416994](https://doi.org/10.1108/00346650210416994)

Supplementary materials

Materials

Hibiscus sabdariffa fruits were collected from Tam Dao - Vietnam, in December, 2014. After removing capsules, calyces were dried in a drier at 40 °C during 48 h. Dried calyx were crashed and stored in a freezer at -40 °C until use.

Yeast hulls, Springer Cell 8001, were provided by Fermentis (LESAFFRE Group, France). These are the insoluble part obtained after autolysis of *Saccharomyces cerevisiae*.

Pea starch Maltodextrin, LAB 4118, DE=17, was purchased from Roquette (Lestrem–France). Distilled water was used for preparation of all solutions. All chemicals used in this study were of analytical and HPLC grade.

Preparation of concentrated anthocyanins

The dried calyx hibiscus powder was extracted using a domestic oven microwave (Proline SM 117). In every experiment, 20 g of *H. sabdariffa* were mixed with 200 ml of 1% (v/v) hydrochloric acid 1 N, 1,5 min in oven microwave (≈ 50 W) then 13,5 min at 27 °C, 140 rpm (Thermoshake Incubating Orbital Shaker, Gerhardt, Germany). This step was repeated 3 times. After each extraction cycle, the extracts were filtered through a filter paper (Whatman no.1). The solvent content was removed below 50 °C under reduced pressure by a rotary evaporator (Stuart RE300, Staffordshire, UK). The condensed extract was recovered and stored at -20 °C.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les caroténoïdes et les anthocyanes sont des phytonutriments très couramment rencontrés dans les fruits, les fleurs et les légumes. Malgré leurs structures très différentes, ils partagent un certain nombre de caractéristiques : une implication dans la couleur des fruits et légumes ; des propriétés antioxydantes ; des propriétés protectrices contre certaines maladies dégénératives, des cancers et des maladies cardiovasculaires. Les deux familles de composés sont intéressantes pour les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique pour leur nature colorée et leur activité biologique.

L'objectif de ce travail était l'extraction et l'encapsulation de pigments naturels, caroténoïdes et anthocyanes, issus de plantes vietnamiennes. On a cherché des procédés d'extraction utilisant des techniques douces et des procédés d'encapsulation efficaces pour protéger les composés actifs.

L'extraction des caroténoïdes a tout d'abord été réalisée à partir de cinq plantes tropicales. Parmi elles, les graines de roucou, les baies de Goji et les fleurs de roses d'Inde ont été sélectionnées en raison de la présence d'un caroténoïde majoritaire dans l'extrait. Les résultats ont confirmé l'efficacité des méthodes d'assistance par micro-ondes (MAE) et ultrasons (UAE) ($p < 0,05$). En général, le rendement d'extraction a été significativement amélioré surtout avec l'aide de l'assistance par micro-ondes. Dans nos exemples, MAE était toujours un système rapide avec des résultats après trois cycles qui n'étaient pas significativement différents de ceux d'extraction complète obtenue après 10 ou 12 cycles ($p < 0,05$). Pourtant, l'efficacité de l'étape d'assistance dépend de la relation entre l'effet physique des méthodes d'assistance et les propriétés de la matrice des matières premières. L'effet des bulles de cavitation de l'UAE a été plus efficace sur les graines de roucou que sur les baies de Goji. Ce résultat peut être lié au fait que l'explosion de bulles de cavitation se fait à la surface de la matrice végétale, et que, pour le roucou, la couche de pigment rouge se situe précisément sur la surface des grains. Pour l'extraction des anthocyanes d'*Hibiscus*, la plus grande efficacité de MAE que d'UAE et que de l'extraction classique sans assistance a été confirmée. L'eau s'est montrée le solvant le plus adapté pour extraire des anthocyanes.

En parallèle, les caroténoïdes ont été extraits par les liquides ioniques utilisés comme solvant. Cette technique a d'abord été utilisée avec les LI classiques. Les résultats préliminaires ont montré qu'ils ne sont pas adaptés pour récupérer des pigments qui sont habituellement non volatils et thermosensibles. Les liquides ioniques réversibles sont préférables, mais doivent être soigneusement conçus pour la meilleure affinité pour l'actif et la viscosité la plus faible donnant une diffusivité acceptable. D'après nos résultats, il semble que

les liquides ioniques, en dépit d'une foule de propriétés intéressantes qui peuvent en faire un jour une famille de solvants pour l'extraction, nécessitent encore des progrès technologiques d'optimisation pour l'extraction des pigments. Dans ce contexte et compte tenu du fait que très peu de procédés industriels sont actuellement basés sur les LI (Martins et al., 2017), l'assistance est une bonne alternative à court et moyen terme pour atteindre une extraction plus verte.

A partir des extraits bruts, les caroténoïdes majoritaires ont ensuite été purifiés pour être utilisés comme un standard et aussi pour augmenter leur concentration dans le produit final. La bixine et la zéaxanthine ont été isolées par chromatographie sur colonne et la lutéine a été isolée par saponification et cristallisation. La structure chimique des composés isolés a été vérifiée par résonance magnétique nucléaire (^1H , ^{13}C , COSY, HMBC, HSQC). Nos résultats ont montré que les caroténoïdes majoritaires de roucou, rose d'Inde et baie de Goji sont bien respectivement la bixine, la lutéine et la zéaxanthine.

L'encapsulation des pigments, non seulement stabilise et protège les pigments, mais améliore également la facilité d'utilisation et d'application dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. L'encapsulation d'anthocyanes par les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* a été étudiée. Un processus d'encapsulation d'anthocyanes dans la levure a été développé. Un rendement d'encapsulation (EY) de 208 $\mu\text{g}/100\text{ mg}$ de cellules et une efficacité d'encapsulation (EE) de 27% ont été atteints après optimisation des ratios (0,5 g de cellules de levure humide pour 5 ml d'extraits anthocyaniques à 1 g.L⁻¹) et avec 10% d'éthanol. Il a été aussi démontré que les cellules de levure étaient un bon matériau pour l'encapsulation des anthocyanes, à condition de prendre certaines précautions. Tout d'abord, l'inactivation des enzymes de levure doit être réalisée avant encapsulation. Nos résultats ont montré que les levures traitées thermiquement présentaient moins de dégradation des anthocyanes au cours du traitement que les microparticules de levure non traitées thermiquement. Les enzymes de levure ont provoqué une perte de couleur indésirable des anthocyanes pendant le stockage. Ensuite, bien que l'encapsulation puisse présenter de bonnes propriétés protectrices, les anthocyanes qui contribuent à la coloration et sont présentes à la surface de la levure sont sensibles au solvant qui doit être choisi en conséquence. Les solutions acides ont montré un effet protecteur plus élevé pendant le stockage que l'eau.

À partir des résultats de l'encapsulation dans les levures, nous avons continué nos études en utilisant des écorces de levure dont les enzymes avaient été désactivées par autolyse. En utilisant des écorces de levure au lieu de cellules entières, la quantité de matériaux d'encapsulation pourrait être diminuée et ainsi l'efficacité d'encapsulation

augmentée, tandis que la performance protectrice des parois de levure pourrait être maintenue. En effet, les écorces de levure se sont révélées être un bon matériau pour l'encapsulation d'anthocyanes avec un pourcentage d'efficacité de l'encapsulation augmenté de 150% par rapport à l'utilisation de cellules de levure entières. Les résultats de la stabilité des anthocyanes encapsulées au cours du stockage ont montré que les microparticules des écorces de levure avaient une résistance à l'humidité plus élevée que les celles de maltodextrine. Les microparticules lyophilisées de maltodextrine après un stockage de 10 semaines ont fondu à 85% HR alors que les microparticules des écorces de levure sont restées en forme initiale. À faible humidité et hautes températures, les écorces de levure présentaient un effet protecteur des anthocyanes inférieur par rapport à la maltodextrine ($p < 0,05$) avec une légère dégradation de la couleur. Cependant, en général, les écorces de levure ont montré une capacité à protéger les anthocyanes contre l'influence de la température, de la lumière et de l'humidité comparable à la maltodextrine voire supérieure dans des environnements humides, ce qui en fait une bonne alternative à la maltodextrine.

PERPECTIVES

Pour compléter ce travail et développer de nouvelles actions à plus long terme, quelques pistes prometteuses peuvent être envisagées.

Partie extraction :

Tout d'abord, l'étude sur d'autres liquides ioniques réversibles serait intéressante pour améliorer la diffusivité du solvant dans les tissus. Par exemple, les liquides ioniques de Guanidine/alcools sont synthétisés selon les mêmes principes que les DBU/alcools. Les sels d'alkyl-carbonates de 2-butyl-1,1,3,3-tétraméthylguanidinium préparés en faisant barboter du CO₂ à travers des solutions équimolaires de 2-butyl-1,1,3,3-tétraméthylguanidine (TMBG) et de méthanol, 1-butanol, 1-hexanol, 1-octanol, ou 1-dodécanol, donnent des liquides qui peuvent être visqueux à température ambiante, mais moins que les sels de DBU. Le tableau 21 présente le point de fusion des LI réversibles (Phan et al., 2008).

Tableau 21. Points de fusion des liquides ioniques réversibles de base/ ROH/ CO₂.

n-Alcool	T _m (sel de DBU) °C	T _m (sel de TMBG) °C
Methanol	59	-24.5
Ethanol	34	nd*
Propanol	5	nd
Butanol	6	-23
Hexanol	22	nd
Octanol	30	-17.5
Decanol	37	nd
Dodecanol	nd	-10.5

* : nd – non déterminé

Ensuite, une perspective pourrait consister à travailler sur d'autres procédés d'extraction assistés par exemple par assistance enzymatique (EAE). L'utilisation d'enzymes (cellulases et pectinases) permet en général de rehausser le rendement d'extraction en facilitant la libération des composés par déstructuration du tissu végétal. La cellulase hydrolyse les liaisons 1,4-β-d-glycosidiques de la cellulose présente dans la paroi cellulaire primaire des cellules végétales. De même, la pectinase décompose les substances pectiques et la pectine trouvées dans la lamelle moyenne et les parois cellulaires primaires (Strati, Gogou, & Oreopoulou, 2015). Les rendements d'extraction des caroténoïdes totaux et lycopènes ont

été augmentés respectivement 6 et 10 fois par l'utilisation d'enzymes pectinase et cellulase, en comparaison avec le procédé d'extraction par solvant non-enzymatique (Strati et al., 2015).

Partie encapsulation :

La protection des anthocyanes encapsulées dans des écorces de levure était inférieur par rapport celles de la maltodextrine à faible humidité et hautes températures. Il serait donc intéressant d'étudier l'interaction entre les matériaux d'encapsulation et les composés actifs. Les différents mécanismes d'interaction des matériaux d'encapsulation fournissent différentes protections. De plus, l'addition d'une couche polymérique à l'extérieur des microparticules pour renforcer la protection pour les composés actifs encapsulés serait également une bonne solution. Par exemple, une couche supplémentaire d'alginate offrait un moyen important de protéger les cellules bactériennes (Mokhtari et al., 2017).

En parallèle, la stabilité de la couleur des anthocyanes encapsulées dans des produits alimentaires et cosmétiques doit être vérifiée. Par exemple, il serait intéressant d'utiliser les poudres des anthocyanes lyophilisées pour colorer des crèmes desserts et des sels de bain, puis évaluer la stabilité de la couleur du produit pendant le stockage par des analyses physico-chimiques ou sensorielles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Absalan, G., Akhond, M., & Sheikhan, L. (2008). Extraction and high performance liquid chromatographic determination of 3-indole butyric acid in pea plants by using imidazolium-based ionic liquids as extractant. *Talanta*, 77 (1), 407-411.
- Akhavan-Mahdavi, S., Jafari, S. M., Assadpour, E., & Ghorbani, M. (2016). Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, 181, 59-66.
- Al-Kahtani, H. A., & Hassan, B. H. (1990). Spray Drying of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract. *Journal of Food Science*, 55 (4), 1073-1076.
- Ali, B. H., Wabel, N. A., & Blunden, G. (2005). Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. *Phytotherapy Research*, 19 (5), 369-375.
- Anastas, P. T. (2013). Handbook of Green Chemistry. In W. Leither & P. G. Jessop (Eds.), (Vol. 4, pp. 508).
- Andarwulan, N., Kurniasih, D., Apriady, R. A., Rahmat, H., Roto, A. V., & Bolling, B. W. (2012). Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4 (1), 339-347.
- Anugwom, I., Mäki-Arvela, P., Virtanen, P., Willför, S., Sjöholm, R., & Mikkola, J. P. (2012). Selective extraction of hemicelluloses from spruce using switchable ionic liquids. *Carbohydrate Polymers*, 87 (3), 2005-2011.
- AOAC. (2005). Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis of the Association Analytical Chemists. *AOAC, Gaithersburg, MD, USA, 18th ed.*
- Arvayo-Enriquez, H., Mondaca-Fernandez, I., Gortarez-Moroyoqui, P., Lopez-Cervantes, J., & Rodriguez-Ramirez, R. (2013). Carotenoids extraction and quantification: a review. *Analytical Methods*, 5 (12), 2916-2924.
- Bae, S.-H., & Suh, H.-J. (2007). Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 40 (6), 955-962.
- Barbosa-Cánovas, G. V., & Vega-Mercado, H. (1996). *Dehydration of Foods*: Springer.
- Benoît, J.-P., Richard, J., & Venier-Julienne, M.-C. (2013). Microencapsulation. <https://www.techniques-ingenieur.fr>.
- Berg, S., Bretz, M., Hubbermann, E. M., & Schwarz, K. (2012). Influence of different pectins on powder characteristics of microencapsulated anthocyanins and their impact on drug retention of shellac coated granulate. *Journal of Food Engineering*, 108 (1), 158-165.

- Betz, M., & Kulozik, U. (2011). Microencapsulation of bioactive bilberry anthocyanins by means of whey protein gels. *Procedia Food Science*, *1*, 2047-2056.
- Bilal, M., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Ali, J., Baig, J. A., Arain, M. B., & Khan, M. (2017). A new tunable dispersive liquid-liquid micro extraction method developed for the simultaneous preconcentration of lead and cadmium from lakes water: a multivariate study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *183* (Supplement C), 417-424.
- Block, G., Dietrich, M., P Norkus, E., D Morrow, J., Hudes, M., Caan, B., & Packer, L. (2002). *Factors Associated with Oxidative Stress in Human Populations* (Vol. 156).
- Boon, C. S., McClements, D., Weiss, J., & A Decker, E. (2010). *Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods* (Vol. 50).
- Borrás-Linares, I., Fernández-Arroyo, S., Arráez-Roman, D., Palmeros-Suárez, P. A., Del Val-Díaz, R., Andrade-González, I., Fernández-Gutiérrez, A., Gómez-Leyva, J. F., & Segura-Carretero, A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). *Industrial Crops and Products*, *69*, 385-394.
- Bosser, A., & Marc Belin, J. (1994). *Synthesis of β -Ionone in an Aldehyde/Xanthine Oxidase/ β -Carotene System Involving Free Radical Formation* (Vol. 10).
- Bosser, A., Paplorey, E., & Belin, J.-M. (1995). A Simple Way to (\pm)-Dihydroactinidiolide from β -Ionone Related to the Enzymic Co-oxidation of β -Carotene in Aqueous Solution. *Biotechnology Progress*, *11* (6), 689-692.
- Bridle, P., & Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours--selected aspects. *Food Chemistry*, *58* (1), 103-109.
- Cao-Hoang, L., Fougère, R., & Waché, Y. (2011). Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. *Food Chemistry*, *124* (1), 42-49.
- Cao-Hoang, L., Phan-Thi, H., Osorio-Puentes, F. J., & Waché, Y. (2011). Stability of carotenoid extracts of gâc (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation — Protective effect of lycopene on β -carotene. *Food Research International*, *44* (7), 2252-2257.
- Cao-Hoang, L., & Waché, Y. (2009). *carotene dispersion in liquid media*. New York: Nova science publishers.
- Cao, J., Peng, L.-Q., Du, L.-J., Zhang, Q.-D., & Xu, J.-J. (2017). Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in

- dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis. *Analytica Chimica Acta*, 963, 24-32.
- Cao, Y., Wu, J., Zhang, J., Li, H., Zhang, Y., & He, J. (2009). Room temperature ionic liquids (RTILs): A new and versatile platform for cellulose processing and derivatization. *Chemical Engineering Journal*, 147 (1), 13-21.
- Caridi, A. (2007). New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *International Journal of Food Microbiology*, 120 (1-2), 167-172.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. d. L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113 (4), 859-871.
- Cavassilas, M. (2012). Clés et codes du packaging. In H. s. p. Lavoisier (Ed.).
- Ceballos, A. M., Giraldo, G. I., & Orrego, C. E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. *Journal of Food Engineering*, 111 (2), 360-365.
- Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., & Voilley, A. (2005). Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*, 91 (1), 39-44.
- Chemat, F. (2011). éco-extraction du végétal - procédés innovants et solvants alternatifs. In Paris Dunod.
- Chemat, F., Zill e, H., & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18 (4), 813-835.
- Chewonarin, T., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimochi, H., Kuwahara, T., Vinitketkumnuen, U., & Ohnishi, Y. (1999). Effects of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.), a Thai Medicinal Plant, on the Mutagenicity of Various Known Mutagens in Salmonella typhimurium and on Formation of Aberrant Crypt Foci Induced by the Colon Carcinogens Azoxymethane and 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 37 (6), 591-601.
- Chiang, A.-N., Wu, H.-L., Yeh, H.-I., Chu, C.-S., Lin, H.-C., & Lee, W.-C. (2006). *Antioxidant effects of black rice extract through the induction of superoxide dismutase and catalase activities* (Vol. 41).
- Chranioti, C., Nikoloudaki, A., & Tzia, C. (2015). Saffron and beetroot extracts encapsulated in maltodextrin, gum Arabic, modified starch and chitosan: Incorporation in a chewing gum system. *Carbohydrate Polymers*, 127, 252-263.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cisse, M., Dornier, M., Sakho, M., Ndiaye, A., Reynes, R., & Sock, O. (2009). *Le bissap (Hibiscus sabdariffa L.) : composition et principales utilisations* (Vol. 64).
- D. Holbrey, J., & R. Seddon, K. (1999). The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions* (13), 2133-2140.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, 165 (0), 424-443.
- Da-Silva-Lima, A., Maciel, A.-P., Mendonça, C.-d.-J.-S., & Costa-Junior, L. M. (2017). Use of encapsulated carvacrol with yeast cell walls to control resistant strains of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Industrial Crops and Products*, 108 (Supplement C), 190-194.
- Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P.-E., Chevalier, M., & Baumgartner, P. (2007). Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloids*, 21 (5), 953-960.
- De-Nobel, J. G., Klis, F. M., Munnik, T., Priem, J., & Van-Den-Ende, H. (1990). An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 6 (6), 483-490.
- de Câmara, A. A., Dupont, S., Beney, L., Gervais, P., Rosenthal, A., Correia, R. T. P., & Pedrini, M. R. d. S. (2016). Fisetin yeast-based bio-capsules via osmoporation: effects of process variables on the encapsulation efficiency and internalized fisetin content. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (12), 5547-5558.
- de Moura, S. C. S. R., Berling, C. L., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., & Hubinger, M. D. (2018). Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*, 241 (Supplement C), 317-327.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40 (3), 173-289.
- Díaz-Bandera, D., Villanueva-Carvajal, A., Dublán-García, O., Quintero-Salazar, B., & Dominguez-Lopez, A. (2015). Assessing release kinetics and dissolution of spray-dried Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract encapsulated with different carrier agents. *LWT - Food Science and Technology*, 64 (2), 693-698.

- Dranca, F., & Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, *31*, 637-646.
- Drewnowski, A., Henderson, S. A., & Barratt-Fornell, A. (2001). Genetic Taste Markers and Food Preferences. *Drug Metabolism and Disposition*, *29* (4), 535-538.
- Du, F.-Y., Xiao, X.-H., Luo, X.-J., & Li, G.-K. (2009). Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. *Talanta*, *78* (3), 1177-1184.
- Eslaminejad, T., & Zakaria, M. (2011). Morphological characteristics and pathogenicity of fungi associated with Roselle (*Hibiscus Sabdariffa*) diseases in Penang, Malaysia. *Microbial Pathogenesis*, *51* (5), 325-337.
- European Food Safety, A., & Tard, A. (2017). Exposure assessment of annatto colouring principles bixin and norbixin (E 160b) when used as food additives. *EFSA Journal*, *15* (8), e04966-n/a.
- Faure, H., Fayol, V., Galabert, C., Grolier, P., Le Moël, G., Steghens, J.-P., Kappel, A. V., & Nabet, F. (1999). Les caroténoïdes : 1. Métabolisme *Annales de Biologie Clinique*, *57*, 169-183.
- Flores, F. P., Singh, R. K., Kerr, W. L., Pegg, R. B., & Kong, F. (2014). Total phenolics content and antioxidant capacities of microencapsulated blueberry anthocyanins during in vitro digestion. *Food Chemistry*, *153*, 272-278.
- Fontanals, N., Borrull, F., & Marcé, R. M. (2012). Ionic liquids in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *41*, 15-26.
- Francois, J.-M., Alexandre, H., Granes, D., & Feuillat, M. (2007). Vers une meilleure connaissance des produits dérivés de levures. *revue des oenologues*, *122*, 9-12.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, *40* (9), 1107-1121.
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Inc.
- Goodwin, T. W. (1980). *The biochemistry of the carotenoids* (Vol. 1. plant; 2. animals). London: Chapman & Hall.
- Gordon, C. M. (2001). New developments in catalysis using ionic liquids. *Applied Catalysis A: General*, *222* (1), 101-117.

- Gowd, V., Jia, Z., & Chen, W. (2017). Anthocyanins as promising molecules and dietary bioactive components against diabetes – A review of recent advances. *Trends in Food Science & Technology*, 68, 1-13.
- Grajeda-Iglesias, C., Salas, E., Barouh, N., Baréa, B., & Figueroa-Espinoza, M. C. (2017). Lipophilization and MS characterization of the main anthocyanins purified from hibiscus flowers. *Food Chemistry*, 230 (Supplement C), 189-194.
- Gupta, P., Sreelakshmi, Y., & Sharma, R. (2015). A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant Methods*, 11, 5.
- Hagiwara, A., Imai, N., Ichihara, T., Sano, M., Tamano, S., Aoki, H., Yasuhara, K., Koda, T., Nakamura, M., & Shirai, T. (2003). A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague–Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 41 (8), 1157-1164.
- Han, X., & Armstrong, D. W. (2007). Ionic Liquids in Separations. *Accounts of Chemical Research*, 40 (11), 1079-1086.
- Harborne, J. B. (1967). Comparative biochemistry of the flavonoids-VI.: Flavonoid patterns in the bignoniaceae and the gesneriaceae. *Phytochemistry*, 6 (12), 1643-1651.
- Hendry, B. S. (1996). Natural food colours. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 40-79). Boston, MA: Springer US.
- Hendry, G. A. F., & Houghton, J. D. (1996). Natural Food Colorants. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.): Springer US.
- Heredia, F. J., Francia-Aricha, E. M., Rivas-Gonzalo, J. C., Vicario, I. M., & Santos-Buelga, C. (1998). Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes—I. pH effect. *Food Chemistry*, 63 (4), 491-498.
- Hu, P., Reuben, D. B., Crimmins, E. M., Harris, T. B., Huang, M.-H., & Seeman, T. E. (2004). The Effects of Serum Beta-Carotene Concentration and Burden of Inflammation on All-Cause Mortality Risk in High-Functioning Older Persons: MacArthur Studies of Successful Aging. *The Journals of Gerontology: Series A*, 59 (8), M849-M854.
- Huong Ly, M., Cao Hoang, L., Belin, J.-M., & Waché, Y. (2008). Improved co-oxidation of β -carotene to β -ionone using xanthine oxidase-generated reactive oxygen species in a multiphasic system (Vol. 3).
- Hutchings, J. B. (2011). *Food Colour and Appearance*: Springer US.

- Jackman, R. L., & Smith, J. L. (1996). Anthocyanins and betalains. In G. A. F. Hendry & J. D. Houghton (Eds.), *Natural Food Colorants* (pp. 244-309). Boston, MA: Springer US.
- Jacquot, M., Voilley, A., & Fagot, P. (2011). *La couleur des Aliments, de la théorie à la pratique*.
- Jafari, S.-M., Mahdavi-Khazaei, K., & Hemmati-Kakhki, A. (2016). Microencapsulation of saffron petal anthocyanins with cress seed gum compared with Arabic gum through freeze drying. *Carbohydrate Polymers*, 140, 20-25.
- Jayaprakasam, B., Olson, L., E Schutzki, R., Tai, M.-H., & Nair, M. (2006). *Amelioration of Obesity and Glucose Intolerance in High-Fat-Fed C57BL/6 Mice by Anthocyanins and Ursolic Acid in Cornelian Cherry (Cornus mas)* (Vol. 54).
- Jessop, P. G., Heldebrant, D. J., Li, X., Eckert, C. A., & Liotta, C. L. (2005a). Green chemistry: Reversible nonpolar-to-polar solvent. *Nature*, 436 (7054), 1102-1102.
- Jessop, P. G., Heldebrant, D. J., Li, X., Eckert, C. A., & Liotta, C. L. (2005b). Reversible nonpolar-to-polar solvent. *Nature*, 436, 1102.
- Jiménez-Aguilar, D. M., Ortega-Regules, A. E., Lozada-Ramírez, J. D., Pérez-Pérez, M. C. I., Vernon-Carter, E. J., & Welte-Chanes, J. (2011). Color and chemical stability of spray-dried blueberry extract using mesquite gum as wall material. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (6), 889-894.
- Junghans, A., Sies, H., & Stahl, W. (2001). Macular Pigments Lutein and Zeaxanthin as Blue Light Filters Studied in Liposomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391 (2), 160-164.
- Kacew, S., & Lee, B. M. (2012). *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment, Sixth Edition*: Taylor & Francis.
- Karthikeyan, K., Bai, B. R. S., & Devaraj, S. N. (2007). Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *International Journal of Cardiology*, 115 (3), 326-333.
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13 (2), 105-113.
- Kazibwe, Z., Kim, D.-H., Chun, S., & Gopal, J. (2017). Ultrasonication assisted ultrafast extraction of *Tagetes erecta* in water: cannonading antimicrobial, antioxidant components. *Journal of Molecular Liquids*, 229 (Supplement C), 453-458.

- Keskin, S., Kayrak-Talay, D., Akman, U., & Hortaçsu, Ö. (2007). A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 43 (1), 150-180.
- Klipstein-Grobusch, K., Launer, L. J., Geleijnse, J. M., Boeing, H., Hofman, A., & Witteman, J. C. M. (2000). Serum carotenoids and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 148 (1), 49-56.
- Konwarh, R., Pramanik, S., Kalita, D., Mahanta, C. L., & Karak, N. (2012). Ultrasonication – A complementary ‘green chemistry’ tool to biocatalysis: A laboratory-scale study of lycopene extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19 (2), 292-299.
- Le-Anh, D., Dinh-Nga, T., & Phan- Thi, S. (2008). The extraction red pigment of *Bixa orellana*. L from Vietnam. *National conference organic chemistry*, 2, 264-268.
- Lee, J., Rae Kim, Y., Gyu Song, I., Ha, S.-J., Eon Kim, Y., Baek, N.-I., & Kee Hong, E. (2014). *Cyanidin-3-glucoside isolated from mulberry fruit protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis* (Vol. 35).
- Leong, S. Y., Burritt, D. J., & Oey, I. (2016). Evaluation of the anthocyanin release and health-promoting properties of Pinot Noir grape juices after pulsed electric fields. *Food Chemistry*, 196, 833-841.
- Li, L., Wang, L., Wu, Z., Yao, L., Wu, Y., Huang, L., Liu, K., Zhou, X., & Gou, D. (2014). Anthocyanin-rich fractions from red raspberries attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Scientific Reports*, 4, 6234.
- Liang, Y., Chen, J., Zuo, Y., Ma, K. Y., Jiang, Y., Huang, Y., & Chen, Z.-Y. (2013). Blueberry anthocyanins at doses of 0.5 and 1 % lowered plasma cholesterol by increasing fecal excretion of acidic and neutral sterols in hamsters fed a cholesterol-enriched diet. *European Journal of Nutrition*, 52 (3), 869-875.
- Linnewiel-Hermoni, K., Paran, E., & Wolak, T. (2016). Chapter 34 - Carotenoid Supplements and Consumption: Implications for Healthy Aging A2 - Malavolta, Marco. In E. Mocchegiani (Ed.), *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp. 473-489). San Diego: Academic Press.
- Lu, Y., Ma, W., Hu, R., Dai, X., & Pan, Y. (2008). Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of phenolic alkaloids from the medicinal plant *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Journal of Chromatography A*, 1208 (1), 42-46.
- Ma, W., Lu, Y., Hu, R., Chen, J., Zhang, Z., & Pan, Y. (2010). Application of ionic liquids based microwave-assisted extraction of three alkaloids N-nornuciferine, O-nornuciferine, and nuciferine from lotus leaf. *Talanta*, 80 (3), 1292-1297.

- Mahadevan, N., Shivali., & Kamboj, P. (2009). *Hibiscus sabdariffa* Linn.-An overview. *Natural Product Radiance*, 8 (1), 77-83.
- Mahdavee-Khazaei, K., Jafari, S. M., Ghorbani, M., & Hemmati Kakhki, A. (2014). Application of maltodextrin and gum Arabic in microencapsulation of saffron petal's anthocyanins and evaluating their storage stability and color. *Carbohydrate Polymers*, 105, 57-62.
- Martins, P. L. G., Braga, A. R., & De Rosso, V. V. (2017). Can ionic liquid solvents be applied in the food industry? *Trends in Food Science & Technology*, 66, 117-124.
- Meng, L., Lozano, Y., Bombarda, I., Gaydou, E. M., & Li, B. (2009). Polyphenol extraction from eight *Perilla frutescens* cultivars. *Comptes Rendus Chimie*, 12 (5), 602-611.
- Minemoto, Y., Adachi, S., & Matsuno, R. (1997). Comparison of Oxidation of Methyl Linoleate Encapsulated with Gum Arabic by Hot-Air-Drying and Freeze-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (12), 4530-4534.
- Miró Specos, M. M., Escobar, G., Marino, P., Puggia, C., Defain Tesoriero, M. V., & Hermida, L. (2010). Aroma Finishing of Cotton Fabrics by Means of Microencapsulation Techniques. *Journal of Industrial Textiles*, 40 (1), 13-32.
- Mishra, M. (2015). *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*: Taylor & Francis.
- Mohammad Fauzi, A. H., & Amin, N. A. S. (2012). An overview of ionic liquids as solvents in biodiesel synthesis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16 (8), 5770-5786.
- Mokhtari, S., Jafari, S. M., Khomeiri, M., Maghsoudlou, Y., & Ghorbani, M. (2017). The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel wall material for encapsulation of probiotics. *Food Research International*, 96 (Supplement C), 19-26.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *European Food Research and Technology*, 220 (3), 341-346.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors Affecting the Moisture Permeability of Lipid-Based Edible Films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1), 67-89.
- Moss, G. P. (1976). CARBON-13 NMR SPECTRA OF CAROTENOIDS A2 - Weedon, B.C.L. In *Carotenoids-4* (pp. 97-102): Pergamon.
- Moutiers, G., & Billard, I. (2005). Les liquides ioniques: des solvants pour l'industrie. *Techniques de l'ingénieur. Sciences fondamentales, AFP4* (AF6712).

- Muñoz-Espada, A. C., Wood, K. V., Bordelon, B., & Watkins, B. A. (2004). Anthocyanin Quantification and Radical Scavenging Capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (22), 6779-6786.
- Nelson, G. (2002). Application of microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (1), 55-62.
- Nguyen-Thi, T., Hoang-Thi, H. A., & Nguyen-Quyet, C. (2007). isolation and purification zeaxanthin from the lycium barbarum for used as the standard in HPLC. *journal chemistry, vietnam*, 45 (6A), 231 - 236.
- Nguyen, A. T.-B., Winckler, P., Loison, P., Wache, Y., & Chambin, O. (2014). Physico-chemical state influences in vitro release profile of curcumin from pectin beads. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 290-298.
- Nguyen, T. T., Phan-Thi, H., Pham-Hoang, B.-N., Ho, P.-T., Tran, T. T. T., & Waché, Y. (2018). Encapsulation of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins as natural colours in yeast. *Food Research International*, 107, 275-280.
- Nguyen Xuan, D., Pham, V. K., Do, D. N., Tran, M. H., Ninh, K. B., Leclercq, P. A., Muselli, A., Bighelli, A., & Casanova, J. (1999). Composition of the Seed Oil of *Hibiscus abelmoschus* L. (Malvaceae) Growing in Vietnam. *Journal of Essential Oil Research*, 11 (4), 447-452.
- Normand, V., Dardelle, G., Bouquerand, P.-E., Nicolas, L., & Johnston, D. J. (2005). Flavor Encapsulation in Yeasts: Limonene Used as a Model System for Characterization of the Release Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (19), 7532-7543.
- Ojeda, D., Jiménez-Ferrer, E., Zamilpa, A., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., & Alvarez, L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*, 127 (1), 7-10.
- Olson, J. (1989). *Provitamin A function of carotenoids: The conversion of β -carotene into vitamin A* (Vol. 119).
- Ooi, S. M., & Heng, W. S. P. (2018 *in press*). Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Bioactives – A Southeast Asia Perspective. In R. Cachon, P. Girardon & A. Voilley (Eds.), *Gases in Agro-Food Processes*: Academic Press.

- Oppermann, S., Stein, F., & Kragl, U. (2011). Ionic liquids for two-phase systems and their application for purification, extraction and biocatalysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (3), 493-499.
- Palomero, F., Ntanos, K., Morata, A., Benito, S., & Suárez-Lepe, J. A. (2011). *Reduction of wine 4-ethylphenol concentration using lyophilised yeast as a bioadsorbent: Influence on anthocyanin content and chromatic variables* (Vol. 232).
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., & Karathanos, V. T. (2011a). Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chemistry*, 125 (3), 892-902.
- Paramera, E. I., Konteles, S. J., & Karathanos, V. T. (2011b). Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food Chemistry*, 125 (3), 913-922.
- Patel, S. (2014). *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4 (1), 23-27.
- Patra, M., Salonen, E., Terama, E., Vattulainen, I., Faller, R., Lee, B. W., Holopainen, J., & Karttunen, M. (2006). Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers. *Biophysical Journal*, 90 (4), 1121-1135.
- Paul, H. (1995). "*Hibiscus sabdariffa*" L.
- Pengkumsri, N., Sivamaruthi, B. S., Sitalun, S., Peerajan, S., Kesika, P., Chaiyasut, K., & Chaiyasut, C. (2017). Extraction of β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of different extraction methods and in vivo assessment of immunomodulatory effect in mice. *Food Science and Technology*, 37, 124-130.
- Pereira-Souza, A.-C., Deyse-Gurak, P., & Damasceno-Ferreira-Marczak, L. (2017). Maltodextrin, pectin and soy protein isolate as carrier agents in the encapsulation of anthocyanins-rich extract from jaboticaba pomace. *Food and Bioproducts Processing*, 102 (Supplement C), 186-194.
- Perino, S., Makerrri, C., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2016). Extraction d'actifs cosmétiques. In.
- Pham-Hoang, B.-N., Winckler, P., & Waché, Y. (2017). Fluorescence Lifetime and UV-Vis Spectroscopy to Evaluate the Interactions Between Quercetin and Its Yeast Microcapsule. *Biotechnology Journal*, 1700389-n/a.
- Pham-Hoang, B., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Waché, Y. (2013). Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97 (15), 6635-6645.

- Pham-Hoang, B. N., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H., & Waché, Y. (2018). Strategies to improve carotene entry into cells of *Yarrowia lipolytica* in a goal of encapsulation. *Journal of Food Engineering*, 224, 88-94.
- Pham-hoang, B. N., Voilley, A., & Waché, Y. (2016). Molecule structural factors influencing the loading of flavoring compounds in a natural-preformed capsule: Yeast cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 148, 220-228.
- Phan-Thi, H., & Waché, Y. (2014). Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker. *Food Chemistry*, 156, 58-63.
- Phan, L., Chiu, D., Heldebrant, D. J., Huttenhower, H., John, E., Li, X., Pollet, P., Wang, R., Eckert, C. A., Liotta, C. L., & Jessop, P. G. (2008). Switchable Solvents Consisting of Amidine/Alcohol or Guanidine/Alcohol Mixtures. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47 (3), 539-545.
- Pradelles, R., Alexandre, H., Ortiz-Julien, A., & Chassagne, D. (2008). Effects of Yeast Cell-Wall Characteristics on 4-Ethylphenol Sorption Capacity in Model Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (24), 11854-11861.
- Pradelles, R., Vichi, S., Alexandre, H., & Chassagne, D. (2009). Influence of the drying processes of yeasts on their volatile phenol sorption capacity in model wine. *International Journal of Food Microbiology*, 135 (2), 152-157.
- Puah, C. W., Choo, Y. M., Ma, A. N., & Chuah, C. H. (2005). Supercritical Fluid Extraction of Palm Carotenoids
American Journal of Environmental Sciences, 4 (1), 264-269.
- Qin, H., Zhou, G., Peng, G., Li, J., & Chen, J. (2015). Application of Ionic Liquid-Based Ultrasound-Assisted Extraction of Five Phenolic Compounds from Fig (*Ficus carica* L.) for HPLC-UV. *Food Analytical Methods*, 8 (7), 1673-1681.
- Qin, L., Zhang, J., & Qin, M. (2013). Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats. *Neuroscience Letters*, 534, 285-288.
- Quan, N., Do Tan, K., Thi Dep, L., Minh, T., Nakagoshi, N., & Dang Xuan, T. (2016). *The Potential Use of a Food-Dyeing Plant Peristrophe bivalvis (L.) Merr. in Northern Vietnam* (Vol. 4).

- Raja, K. C. M., Sankarikutty, B., Sreekumar, M., Jayalekshmy, A., & Narayanan, C. S. (1989). Material Characterization Studies of Maltodextrin Samples for the Use of Wall Material. *Starch - Stärke*, 41 (8), 298-303.
- Rehbein, J., Dietrich, B., Grynbaum, M. D., Hentschel, P., Holtin, K., Kuehnle, M., Schuler, P., Bayer, M., & Albert, K. (2007). Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. *Journal of Separation Science*, 30 (15), 2382-2390.
- Rios, A. d. O., Borsarelli, C. D., & Mercadante, A. Z. (2005). Thermal Degradation Kinetics of Bixin in an Aqueous Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 2307-2311.
- Riso, P., Klimis-Zacas, D., Del Bo', C., Martini, D., Campolo, J., Vendrame, S., Møller, P., Loft, S., De Maria, R., & Porrini, M. (2013). Effect of a wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) drink intervention on markers of oxidative stress, inflammation and endothelial function in humans with cardiovascular risk factors. *European Journal of Nutrition*, 52 (3), 949-961.
- Robert W. Burnham, I.-S. C. C. (1963). Color, a guide to basic facts and concepts. In the University of Michigan: Wiley.
- Rocha-Parra, D. F., Lanari, M. C., Zamora, M. C., & Chirife, J. (2016). "Influence of storage conditions on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and colour of freeze-dried encapsulated red wine". *LWT - Food Science and Technology*, 70 (Supplement C), 162-170.
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*: ILSI Press.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., & Costa, H. S. (2006). Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19 (2-3), 97-111.
- Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90-103.
- Samorì, C., Torri, C., Samorì, G., Fabbri, D., Galletti, P., Guerrini, F., Pistocchi, R., & Tagliavini, E. (2010). Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource Technology*, 101 (9), 3274-3279.
- Santos, D. T., Albarelli, J. Q., Beppu, M. M., & Meireles, M. A. A. (2013). Stabilization of anthocyanin extract from jaboticaba skins by encapsulation using supercritical CO₂ as solvent. *Food Research International*, 50 (2), 617-624.
- Schagen, S. K., Zampeli, V. A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Discovering the link between nutrition and skin aging. *Dermato-endocrinology*, 4 (3), 298-307.

- Shaddel, R., Hesari, J., Azadmard-Damirchi, S., Hamishehkar, H., Fathi-Achachlouei, B., & Huang, Q. (2017). Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Pen, G., Long, S., & Yang, C. (2007). Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant. *Journal of Food Engineering*, 80 (4), 1060-1067.
- Shi, G., Rao, L., Yu, H., Xiang, H., Yang, H., & Ji, R. (2008). Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *International Journal of Pharmaceutics*, 349 (1–2), 83-93.
- Shi, J., Le Maguer, M., Bryan, M., & Kakuda, Y. (2003). KINETICS OF LYCOPENE DEGRADATION IN TOMATO PUREE BY HEAT AND LIGHT IRRADIATION. *Journal of Food Process Engineering*, 25 (6), 485-498.
- Sikri, V. K. (2010). Color: Implications in dentistry. *Journal of Conservative Dentistry : JCD*, 13 (4), 249-255.
- Sindi, H. A., Marshall, L. J., & Morgan, M. R. A. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry*, 164, 23-29.
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., & Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chemistry*, 214, 234-241.
- Sinha, K., Chowdhury, S., Saha, P. D., & Datta, S. (2013). Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye from seeds of *Bixa orellana* (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). *Industrial Crops and Products*, 41 (0), 165-171.
- Sinquin, a., Gorner, T., & Dellacherie, E. (1993). L'utilisation des micro-ondes en chimie analytique. *Analisis*, 21, 1-10.
- Siti Azima, A. M., Noriham, A., & Manshoor, N. (2017). Phenolics, antioxidants and color properties of aqueous pigmented plant extracts: *Ardisia colorata* var. *elliptica*, *Clitoria ternatea*, *Garcinia mangostana* and *Syzygium cumini*. *Journal of Functional Foods*, 38 (Part A), 232-241.
- Sowbhagya, H. B., Sampathu, S. R., & Krishnamurthy, N. (2004). Natural Colorant from Marigold-Chemistry and Technology. *Food Reviews International*, 20 (1), 33-50.
- Stoll, L., Costa, T. M. H., Jablonski, A., Flôres, S. H., & de Oliveira Rios, A. (2016). Microencapsulation of Anthocyanins with Different Wall Materials and Its

- Application in Active Biodegradable Films. *Food and Bioprocess Technology*, 9 (1), 172-181.
- Strati, I. F., Gogou, E., & Oreopoulou, V. (2015). Enzyme and high pressure assisted extraction of carotenoids from tomato waste. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 668-674.
- Sui, X., Bary, S., & Zhou, W. (2016). Changes in the color, chemical stability and antioxidant capacity of thermally treated anthocyanin aqueous solution over storage. *Food Chemistry*, 192 (Supplement C), 516-524.
- Sunil Kumar, T. K., Sherena, P. A., & Sajoy, S. (2004). Process for the preparation of xanthophyll crystals. In: Google Patents.
- Teng, H., Fang, T., Lin, Q., Song, H., Liu, B., & Chen, L. (2017). Red raspberry and its anthocyanins: Bioactivity beyond antioxidant capacity. *Trends in Food Science & Technology*, 66, 153-165.
- Tian, M., Yan, H., & Row, K. H. (2009). Solid-Phase Extraction of Caffeine and Theophylline from Green Tea by a New Ionic Liquid-Modified Functional Polymer Sorbent. *Analytical Letters*, 43 (1), 110-118.
- Toledo Hijo, A. A. C., Maximo, G. J., Costa, M. C., Batista, E. A. C., & Meirelles, A. J. A. (2016). Applications of Ionic Liquids in the Food and Bioproducts Industries. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4 (10), 5347-5369.
- Trujillo-Rodríguez, M. J., Rocío-Bautista, P., Pino, V., & Afonso, A. M. (2013). Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 51, 87-106.
- Trung tâm dinh dưỡng, H. C. M. C. (2001). *Thành phần dinh dưỡng 400 thức ăn thông dụng*: Nhà xuất bản Y học.
- Vandamme, T., Poncelet, D., & Subra_Paternault, P. (2007). *Microencapsulation : des sciences aux technologies*: Ed. Tec & Doc.
- Waché, Y., Bosser-De Ratuld, A., & Belin, J.-M. (2006). Dispersion of β -carotene in processes of production of β -ionone by cooxidation using enzyme-generated reactive oxygen species. *Process Biochemistry*, 41 (11), 2337-2341.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Lhuguenot, J.-C., & Belin, J.-M. (2003). Effect of cis/trans isomerism of beta-carotene on the ratios of volatile compounds produced during oxidative degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (7), 1984-1987.

- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Ly, H. M., & Belin, J.-M. (2002). Co-oxidation of β -carotene in biphasic media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20 (Supplement C), 197-201.
- Wada, L., & Ou, B. (2002). Antioxidant Activity and Phenolic Content of Oregon Caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (12), 3495-3500.
- Walter, M., Marchesan, E., Massoni, P. F. S., da Silva, L. P., Sartori, G. M. S., & Ferreira, R. B. (2013). Antioxidant properties of rice grains with light brown, red and black pericarp colors and the effect of processing. *Food Research International*, 50 (2), 698-703.
- Wang, C. C., Chang, S. C., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2010). Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 120 (1), 184-192.
- Wang, S., Marcone, M. F., Barbut, S., & Lim, L.-T. (2013). Electrospun soy protein isolate-based fiber fortified with anthocyanin-rich red raspberry (*Rubus strigosus*) extracts. *Food Research International*, 52 (2), 467-472.
- Wang, Z., Zhang, M., & Wu, Q. (2015). Effects of temperature, pH, and sunlight exposure on the color stability of strawberry juice during processing and storage. *LWT - Food Science and Technology*, 60 (2, Part 2), 1174-1178.
- Waranyoupalin, R., Wongnawa, S., Wongnawa, M., Pakawatchai, C., Panichayupakaranant, P., & Sherdshoopongse, P. (2009). Studies on complex formation between curcumin and Hg(II) ion by spectrophotometric method: A new approach to overcome peak overlap. *Central European Journal of Chemistry*, 7 (3), 388-394.
- Wilkes, J. S. (2002). *A short history of ionic liquids - From molten salts to neoteric solvents* (Vol. 4).
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Che Man, Y. B. (2002). Physicochemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science*, 32 (2), 68-73.
- Wu, C.-H., Huang, C.-C., Hung, C.-H., Yao, F.-Y., Wang, C.-J., & Chang, Y.-C. (2016). Delphinidin-rich extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. trigger mitochondria-derived autophagy and necrosis through reactive oxygen species in human breast cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 25, 279-290.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2006). Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and

- Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (11), 4069-4075.
- Xie, H., Li, S., & Zhang, S. (2005). Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers. *Green Chemistry*, 7 (8), 606-608.
- Yahia, E. M., & Ornelas-Paz, J. d. J. (2009). Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. In *Fruit and Vegetable Phytochemicals* (pp. 177-222): Wiley-Blackwell.
- Yan, F., & Zheng, X. (2017). Anthocyanin-rich mulberry fruit improves insulin resistance and protects hepatocytes against oxidative stress during hyperglycemia by regulating AMPK/ACC/mTOR pathway. *Journal of Functional Foods*, 30, 270-281.
- Yan, X., Wu, L., Li, B., Meng, X., Dai, H., Zheng, Y., & Fu, J. (2015). Cyanidin-3-O-glucoside attenuates acute lung injury in sepsis rats. *Journal of Surgical Research*, 199 (2), 592-600.
- Yang, L., Sun, X., Yang, F., Zhao, C., Zhang, L., & Zu, Y. (2012). Application of Ionic Liquids in the Microwave-Assisted Extraction of Proanthocyanidins from *Larix gmelinii* Bark. *International Journal of Molecular Sciences*, 13 (4), 5163-5178.
- Yang, S.-Y., Hong, C.-o., Lee, H., Park, S.-y., Park, B.-g., & Lee, K.-W. (2012). Protective effect of extracts of *Perilla frutescens* treated with sucrose on tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative hepatotoxicity in vitro and in vivo. *Food Chemistry*, 133 (2), 337-343.
- Yoo, C. G., Pu, Y., & Ragauskas, A. J. (2017). Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 5, 5-11.
- Young, S., Dea, S., & Nitin, N. (2017). Vacuum facilitated infusion of bioactives into yeast microcarriers: Evaluation of a novel encapsulation approach. *Food Research International*, 100 (Part 2), 100-112.
- Zaidel, D. N. A., Sahat, N. S., Jusoh, Y. M. M., & Muhamad, I. I. (2014). Encapsulation of Anthocyanin from Roselle and Red Cabbage for Stabilization of Water-in-Oil Emulsion. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2 (Supplement C), 82-89.
- Zepka, L. Q., Garruti, D. S., Sampaio, K. L., Mercadante, A. Z., & Da Silva, M. A. A. P. (2014). Aroma compounds derived from the thermal degradation of carotenoids in a cashew apple juice model. *Food Research International*, 56, 108-114.
- Zhang, T., Lv, C., Chen, L., Bai, G., Zhao, G., & Xu, C. (2014). Encapsulation of anthocyanin molecules within a ferritin nanocage increases their stability and cell uptake efficiency. *Food Research International*, 62, 183-192.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhou, Y., Wu, D., Cai, P., Cheng, G., Huang, C., & Pan, Y. (2015). Special Effect of Ionic Liquids on the Extraction of Flavonoid Glycosides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat by Microwave Assistance. *Molecules*, 20 (5), 7683.
- Zhu, S., Chen, R., Wu, Y., Chen, Q., Zhang, X., & Yu, Z. (2009). *A Mini-Review on Greenness of Ionic Liquids* (Vol. 23).
- Zuidam, N. J., & Shimoni, E. (2010). Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In N. J. Zuidam & V. Nedovic (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing* (pp. 3-29). New York, NY: Springer New York.