



DETERMINATION QUANTITATIVE DES ANTHOCYANES POUR LEUR UTILISATION DANS L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE ET PHARMACEUTIQUE ♦

Gabriela Stanciu¹, Mirela Mihaiesi², Simona Lupsor¹

¹Université "Ovidius" Constanța; Département du Chimie,
124 Bd. Mamaia, Constanța, Roumanie, E-mail: gstanciu66@yahoo.com

²Université "Ovidius" Constanța; Département du Biochimie,
124 Bd. Mamaia, Constanța, Roumanie

Abstract: The work presents the study over several types of wines as: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot noir, Burgund and Blauerzweigelt through out a period of three years. Also in this paper are presented the results of quantitative determination of anthocyanins from five kinds of black grapes containing important quantities of anthocyanins in fresh condition as well as grape spirits – sub product of the wine preparation process and as well the dynamics of anthocyanins accumulation during maturation in order to establish the optimum moment to reap the grapes for wine preparation process as well as to utilize the grape spirits as a source of anthocyanins for the food industry and pharmacy. The determinations were carried out using a UV-VIS CAMSPEC 330 Spectrometer.

Keywords: *anthocyanins, natural pigments, flavonoides, flavylum cation*

INTRODUCTION

Les anthocyanes sont des pigments naturels du groupe des flavones quasi présents dans toutes les parties de la plante, mais surtout dans les fruits et les fleurs qu'ils colorent en rouge, violet ou bleu. La variation des couleurs est imprimée par le pH du suc cellulaire et les micro-éléments de l'organisme végétal avec lesquels ils se combinent [1].

Ces colorants naturels sont glucosés. Après la hydrolyse il résulte des aglycone anthocyanidines et la partie glucidique. Les anthocyanidines ont un squelette sous forme de C₆-C₃-C₆ flavonoïdique, ce sont des dérivés hydroxylés et méthoxylés du 2-phenylbenzopyril ou des sels de flavylium [2].

Tableau 1. Anthocyanidine naturels (cation de flavylium)

| No. | Anthocyanidine Formule moléculaire Masse molaire | Structure |
|-----|--|-----------|
| 1 | Cyanidine C ₁₅ H ₁₁ ClO ₆ 322,701 | |
| 2 | Delphinidine C ₁₅ H ₁₁ ClO ₇ 338,701 | |
| 3 | Pelargonidine C ₁₅ H ₁₁ ClO ₅ 306,702 | |
| 4 | Malvidine C ₁₇ H ₁₅ ClO ₇ 366,754 | |
| 5 | Péonidine C ₁₆ H ₁₃ ClO ₆ 336,728 | |
| 6 | Pétunidine C ₁₆ H ₁₃ ClO ₇ 352,728 | |

Ces anthocyanines se différencient par le nombre des groupes hydroxyle, le degré de méthylation de ceux-ci, ainsi que par leur nature, le nombre et la position des sucres attachés à la molécule. Il existe 17 anthocyanidines naturelles, mais 6 d'entre eux sont assez répandues dans la nature contribuant à la pigmentation des plantes (Tableau 1) [3, 4]. Pour les colorants artificiels, dont la plupart sont toxiques pour l'organisme humaine, les anthocyanes sont un bon substitut qui a une série d'avantages: pas d'effets secondaires, couleur intense, étant hydrosoluble, ce qui simplifie leur incorporation dans les systèmes alimentaires liquides [5]. Les dernières recherches montrent que les pigments naturels ont aussi des effets thérapeutiques, étant utilisés pour combattre l'artériosclérose [6, 7].

Après les expérimentés de déterminer les anthocyanes quantitatives de 11 espèces des plants alimentaires et aussi en considérant l'aspect économique, on a choisi des catégories différentes de raisins comme matériel brut pour les obtenir.

Le but du projet consiste en:

- détermination quantitative des anthocyanes de cinq catégories de raisins noirs contenant des quantités importantes des anthocyanes frais tout comme des raisins spiritueux – sou produits du procès de vinification.
- la dynamique de l'accumulation des anthocyanes pendant la maturation en vue d'établir le moment optimum pour récolter les raisins pour la vinification et aussi utiliser les raisins spiritueux comme une source d'anthocyanes pour l'industrie alimentaire et pharmacie [8].

En solution aqueuse les anthocyanines subissent des modifications structurales qui dépendent du pH. En solutions fortement acides au pH en dessous de 2 il prédomine le cation flavylium rouge. En solution acide faible, neutre et alcaline il prédomine la forme carabinol et la base quinonique, tandis que la couleur devient bleue. L'identification des anthocyanes se base sur le virage des couleurs à la modification du pH. Le changement des couleurs est aussi accompagné de modifications structurales. La solution aqueuse acide à une couleur rouge, au pH = 7 elle passe au violet, tandis que en milieu alcalin au bleu ou vert.

MATERIAUX ET METHODES D'ANALYSE

Des études ont été effectuées en utilisant des raisins noirs de l'assortiment vignoble Murfatlar des variétés suivantes : Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Burgund et Blauerzweigelt sur un période de trois ans, 2003 - 2005. La récolte des échantillons a été effectuée chaque année de cinq en cinq jours en commençant par le moment de mûrissement et jusqu'à la maturité technologique (récolte). De la pulpe, on a déterminé le contenu total des sucres tandis que sur la peau le contenu total en anthocyanes :

1. Détermination du poids des graines (G) ;
2. Détermination qualitative des sucres par la méthode refractométrique (Refractomètre Digit 036) ;
3. Détermination qualitative des anthocyanes (méthode Poissant Leon). Les petites peaux de 50 graines de raisins se nettoie avec de l'eau distillée des restes des pulpes on sèche sur papier filtre après on écrase avec du sable. On passe le contenu dans un ballon, en utilisant 50 mL HCl, en lavant la capsule, le pistil et la spatule. On laisse

L'extraction à température ambiante pendant 24 h. Les petites peaux se lavent en répétant, de 2-3 fois avec une solution HCl 1% jusqu'à ce qu'il présente une couleur rose claire afin que le liquide extractif obtenu soit de 200 mL. L'extrait filtré se lit au spectrophotomètre dans une cuve de 1 cm, à 520 nm (spectrophotomètre UV-VIS, CAMSPEC 330) [9].

$$\text{mg/kg raisins} = \frac{DO_{520} \cdot 22.76 \cdot 0.4}{G} \cdot 1000$$

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'état de maturité des raisins s'apprécie selon plusieurs critères. La maturité complète se définit par analyse des principaux constituants des graines – la variation du poids des graines et la variation du contenu en glucides. La richesse, en sucres et en substances colorantes dépend spécialement de la composition et des propriétés du sol et des conditions climatiques (température, insolation, précipitations).

De l'analyse des données expérimentales il résulte que l'augmentation du poids, des graines au moment de mûrissement jusqu'à la maturité complète peut varier entre 25-80 %, en fonction de l'espèce et c'est une augmentation continue. Les graines atteignent un poids maximal qui se maintient constant de 3 à 5 jours après que les raisins se diminuent en poids grâce à la supra maturation. L'accumulation des glucides dans les graines au moment de mûrissement jusqu'à la maturité complète a lieu rapidement et en quantité relativement grande. L'augmentation est plus rapide durant les 2-4 premières semaines après du mûrissement et puis elle est lente, pour qu'on enregistre, après un certain période, une stagnation de 3-5 jours. Dans la graine du raisin les anthocyanes apparaissent au moment de mûrissement et l'accumulation continue sur toute la durée de la maturation.

Dans les tableaux 2 et 3 sont présentées les conditions météorologiques de la période de mûrir et le cycle végétatif des variétés suivies, 2003 – 2005.

Tableau 2. Les conditions météorologiques de la période de mûrir, 2003-2005

| Mois | Décade | Températures moyennes (°C) | | | Temps d'insolation (h) | | | Précipitations (L/m ²) | | |
|-----------|--------|----------------------------|------|------|------------------------|-------|-------|------------------------------------|-------|-------|
| | | 2003 | 2004 | 2005 | 2003 | 2004 | 2005 | 2003 | 2004 | 2005 |
| Juillet | I | | 24,1 | 22,6 | | 100,3 | 98,8 | | - | 65,2 |
| | II | | 22,8 | 22,7 | | 99,4 | 70,2 | | 10,4 | 142,0 |
| | III | | 27,1 | 30,0 | | 106,2 | 118,9 | | 27,3 | - |
| Août | I | 25,0 | 22,8 | 25,5 | 115,5 | 53,4 | 63,8 | - | 61,6 | 12,0 |
| | II | 23,7 | 23,5 | 24,5 | 88,1 | 81,7 | 67,5 | 0,6 | 12,5 | 0,3 |
| | III | 27,7 | 24,5 | 25,9 | 112,8 | 61,4 | 81,4 | 15,5 | 109,9 | 12,3 |
| Septembre | I | 17,0 | 19,0 | 21,8 | 56,4 | 69,0 | 65,4 | 44,2 | 0,6 | - |
| | II | 14,2 | 17,2 | 21,9 | 39,3 | 62,4 | 68,7 | 12,31 | - | 36,5 |
| | III | 17,7 | 19,2 | 17,8 | 74,2 | 58,1 | 13,7 | - | 12,9 | 106,3 |
| Octobre | I | 15,6 | | 16,2 | 38,7 | | 57,9 | 25,2 | | 12,0 |
| | II | 10,3 | | | 31,3 | | | 40,0 | | |
| | III | 9,8 | | | 14,9 | | | 6,5 | | |

Tableau 3. Cycle végétatif des variétés suivies, 2003 - 2005

| Variété | Le moment de mûrissement | | | Maturité complète | | | Maturité technologique (récoltée) | | |
|--------------------|--------------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|-----------------------------------|-------|------------|
| | 2003 | 2004 | 2005 | 2003 | 2004 | 2005 | 2003 | 2004 | 2005 |
| Cabernet Sauvignon | 30.08 | 19.08 | 3.09 | 30.09 | 25.09 | 25.09 | 10.10-15.10 | 30.09 | 30.09-5.10 |
| Merlot | 26.08 | 17.08 | 1.09 | 30.09 | 20.09 | 25.09 | 10.10-15.10 | 30.09 | 30.09-5.10 |
| Pinot noir | 20.08 | 16.08 | 22.08 | 20.09 | 15.09 | 15.09 | 25.09 | 25.09 | 25.09 |
| Burgund | 21.08 | 20.08 | 4.09 | 25.09 | 25.09 | 25.09 | 1.10-5.10 | 30.09 | 30.09 |
| Blauer-zweigelt | 24.08 | 22.08 | 8.09 | 25.09 | 20.09 | 25.09 | 30.09 | 25.09 | 30.09 |

Dans les tableaux 4 - 6 sont présentées la variation des concentrations en glucides et l'évolution de l'accumulation des anthocyanes pour les raisins des cinq variétés étudiées sur le parcours des trois années 2003 - 2005.

Dans les figures 1 - 5 sont présentés les dynamiques d'accumulation des anthocyanes pour les raisins des variétés étudiés sur le parcours de ces trois ans.

Pour les raisins de la variété Cabernet Sauvignon (Fig.1) on constate une augmentation des quantités en anthocyanes jusqu'à la récolte. La récolte en 2003 - 2005 a commencé après 10 jours d'atteinte de maturité complète, tandis qu'en 2004 après 5 jours parce qu'il y avait le risque de supra maturation.

Pour les raisins de la variété Merlot (Fig. 2) on constate une augmentation de la concentration des anthocyanes même après la maturité complète.

Pour la variété Pinot Noir (Fig. 3) en 2003 la quantité d'anthocyanes a commencé à baisser immédiatement après la maturité complète, cette variété étant très sensible aux précipitations.

Pour la variété Burgund (Fig. 4) le contenu en anthocyanes se diminue après la maturité, à l'exception de l'année 2004 quand il a continu d'augmenter grâce aux conditions météorologiques très bonnes. Pour la variété Blauerzweigelt (Fig. 5) on constate un comportement similaire à la variété Burgund.

L'année 2004 a été bénéfique pour le contenu en anthocyanes pour toutes les variétés analyses. L'année 2003 a offert des conditions non favorables dans la période de mûrissement tant que sur la maturation, un fait concrétisé par les quantités réduites d'anthocyanes enregistrées. L'année 2005 est caractérisée par des conditions moins favorables dans la période de mûrissement, l'abondance et la persistance des pluies ainsi que l'apparition et l'extension des sources de moisissures.

La période de maturation s'est caractérisée par un régime thermique favorable, avec une bonne insolation qui a réussi à contrecarrer dans une certaine mesure les conditions moins propices dans la phase de mûrissement. Après la maturité complète, le contenu en pigments anthocyaniques peut augmenter (variété Cabernet et Merlot) ou diminuer, ce qui illustre un comportement individuel de l'espèce lié aux qualités qui déterminent la formation des substances colorantes.

Les données des Tableaux 1-3 indiquent l'existence évidente d'une liaison entre le poids le plus petit des graines et le plus grand contenu en anthocyanes. L'explication consiste

au fait que les raisins du biotype avec plus petites graines utilisent mieux les disponibilités climatiques pour réaliser la synthèse des anthocyanes.

Tableau 4. Evolution du poids des graines, du contenu en anthocyanes en 2003

| Variété | Date | Sucres (g/L) | Poids de 100 graines (g) | Anthocyanes (mg/kg raisins) |
|--------------------|-------------|---------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Cabernet Sauvignon | 10.09 | 119 | 99 | 347 |
| | 15.09 | 134 | 104 | 542 |
| | 20.09 | 143 | 105 | 859 |
| | 25.09 | 158 | 109 | 1143 |
| | 30.09 | 166 | 112 | 1465 |
| | 5.10 | 173 | 115 | 1486 |
| | 10.10 | 182 | 113 | 1620 |
| Merlot | 10.09 | 123 | 100 | 318 |
| | 15.09 | 140 | 107 | 429 |
| | 20.09 | 149 | 112 | 691 |
| | 25.09 | 161 | 115 | 1029 |
| | 30.09 | 169 | 117 | 1285 |
| | 5.10 | 177 | 115 | 1432 |
| | 10.10 | 188 | 114 | 1541 |
| Pinot noir | 10.09 | 137 | 117 | 547 |
| | 15.09 | 154 | 120 | 819 |
| | 20.09 | 161 | 116 | 1095 |
| | 25.09 | 173 | 118 | 981 |
| | 30.09 | 179 | 115 | 836 |
| Burgund | 10.10 | 146 | 146 | 484 |
| | 15.09 | 153 | 153 | 625 |
| | 20.09 | 156 | 156 | 803 |
| | 25.09 | 160 | 160 | 1055 |
| | 30.09 | 163 | 163 | 975 |
| | 5.09 | 160 | 160 | 913 |
| Blauerzweigelt | 10.10 | 141 | 141 | 401 |
| | 15.09 | 147 | 147 | 559 |
| | 20.09 | 155 | 155 | 783 |
| | 25.09 | 158 | 158 | 960 |
| | 30.09 | 159 | 159 | 870 |

Tableau 5. Evolution du poids des graines, du contenu en anthocyanes en 2004

| Variété | Date | Sucres (g/L) | Poids de 100 graines (g) | Anthocyanes (mg/kg raisins) |
|--------------------|-----------|--------------|--------------------------|-----------------------------|
| Cabernet Sauvignon | 5.09 | 155 | 91 | 498 |
| | 10.09 | 163 | 95 | 1059 |
| | 15.09 | 174 | 98 | 1435 |
| | 20.09 | 185 | 102 | 1627 |
| | 25.09 | 194 | 104 | 2416 |
| | 1.10-5.10 | 210 | 102 | 3263 |
| Merlot | 5.09 | 156 | 103 | 416 |
| | 10.09 | 161 | 108 | 796 |
| | 15.09 | 170 | 109 | 1488 |
| | 20.09 | 182 | 111 | 1871 |
| | 25.09 | 196 | 106 | 2210 |
| | 1.10 | 219 | 104 | 3148 |
| Pinot noir | 5.09 | 169 | 105 | 224 |
| | 10.09 | 176 | 109 | 583 |
| | 15.09 | 189 | 107 | 875 |
| | 20.09 | 200 | 109 | 1271 |
| | 25.09 | 220 | 104 | 1044 |
| Burgund | 5.09 | 145 | 153 | 408 |
| | 10.09 | 151 | 158 | 750 |
| | 15.09 | 163 | 161 | 1084 |
| | 20.09 | 172 | 166 | 1515 |
| | 25.09 | 183 | 167 | 2144 |
| | 1.10 | 190 | 164 | 2435 |
| Blauerzweigelt | 5.09 | 127 | 128 | 307 |
| | 10.09 | 145 | 132 | 771 |
| | 15.09 | 159 | 140 | 1267 |
| | 20.09 | 171 | 146 | 1571 |
| | 25.09 | 181 | 149 | 1984 |

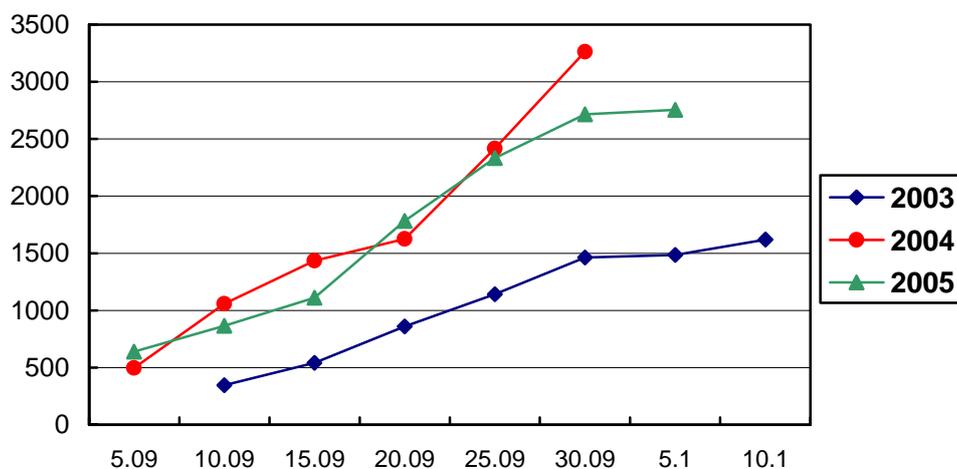


Figure 1. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Cabernet Sauvignon

Tableau 6. Evolution du poids des graines, du contenu en anthocyanes en 2005

| Variété | Date | Sucres (g/L) | Poids de 100 graines (g) | Anthocyanes (mg/kg raisins) |
|--------------------|-------|--------------|--------------------------|-----------------------------|
| Cabernet-Sauvignon | 5.09 | 135 | 106 | 641 |
| | 10.09 | 147 | 110 | 867 |
| | 15.09 | 160 | 113 | 1113 |
| | 20.09 | 173 | 115 | 1781 |
| | 25.09 | 182 | 114 | 2332 |
| | 30.09 | 190 | 112 | 2715 |
| | 5.10 | 210 | 110 | 2755 |
| Merlot | 5.09 | 140 | 114 | 543 |
| | 10.09 | 155 | 117 | 737 |
| | 15.09 | 167 | 119 | 903 |
| | 20.09 | 180 | 120 | 1604 |
| | 25.09 | 189 | 118 | 2086 |
| | 30.09 | 195 | 116 | 2448 |
| | 5.10 | 205 | 113 | 2129 |
| Pinot noir | 5.09 | 168 | 135 | 242 |
| | 10.09 | 180 | 138 | 379 |
| | 15.09 | 189 | 139 | 550 |
| | 20.09 | 198 | 137 | 741 |
| | 25.09 | 212 | 135 | 613 |
| | 30.09 | 224 | 131 | 468 |
| Burgund | 5.09 | 128 | 143 | 557 |
| | 10.09 | 150 | 147 | 638 |
| | 15.09 | 161 | 149 | 929 |
| | 20.09 | 171 | 150 | 1435 |
| | 25.09 | 180 | 148 | 1717 |
| | 30.09 | 190 | 145 | 1635 |
| Blaverzweigelt | 5.09 | 167 | 157 | 456 |
| | 10.09 | 175 | 164 | 559 |
| | 15.09 | 181 | 165 | 604 |
| | 20.09 | 188 | 166 | 729 |
| | 25.09 | 197 | 164 | 1023 |
| | 30.09 | 202 | 160 | 859 |

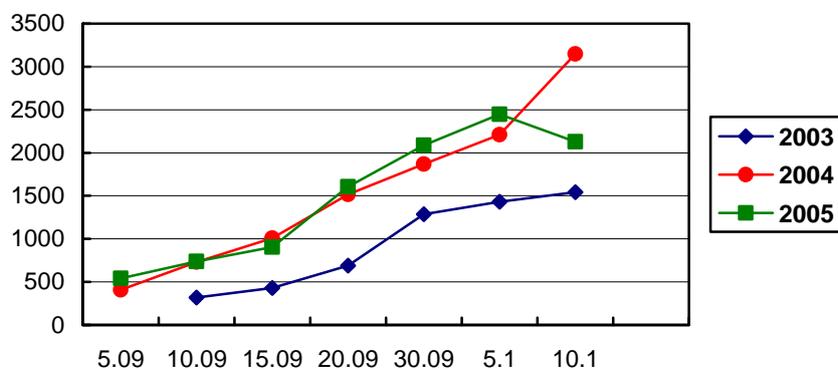


Figure 2. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Merlot

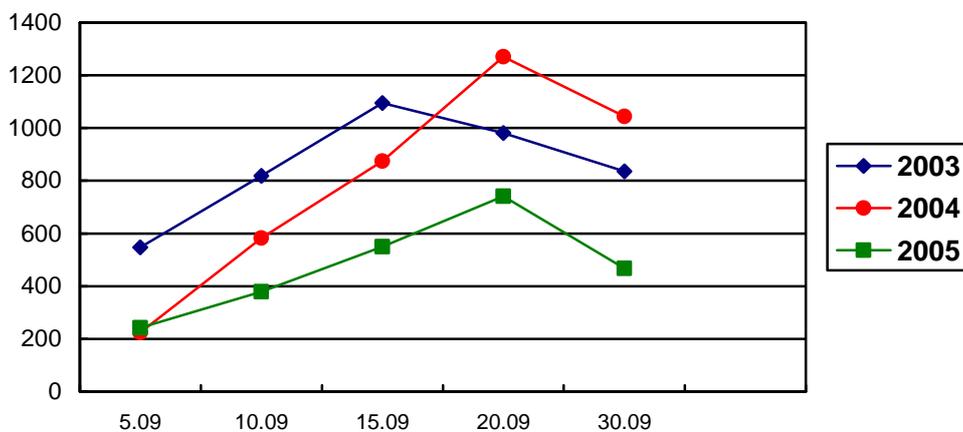


Figure 3. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Pinot noir

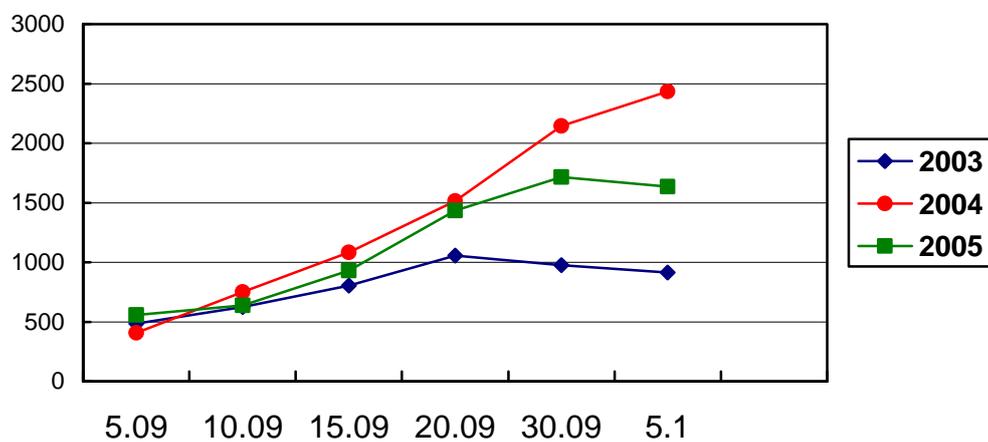


Figure 4. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Burgund

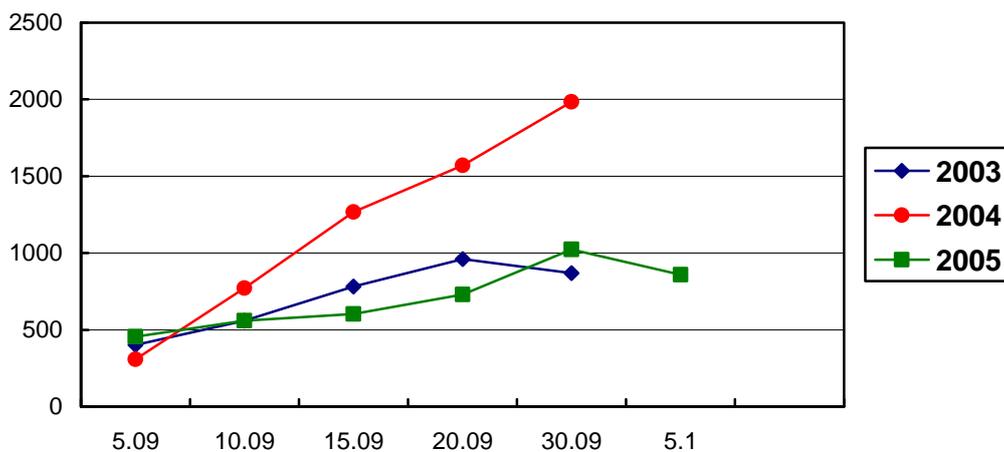


Figure 5. Dynamique d'accumulation des anthocyanes de la variété Blauerzweigelt

CONCLUSIONS

La réalisation de ces expériences en trois ans différents en ce qui concerne les conditions du milieu (température, insolation, précipitations) nous donne la possibilité d'établir le moment de récolte des raisins en vue de la vinification, mais aussi pour l'utilisation de l'eau de vie pour extraire les anthocyanes.

Les conclusions de l'expérimentés sont ;

1. Pendant la maturation des catégories différentes de raisins, les anthocyanes s'accumulent dans des peltes de graines en commençant avec le moment de mûrissement, l'augmentation étant maintenue jusqu'à la maturation totale, quelques fois en la prolongeant jusqu'à la maturation technologique.
2. Augmenter où réduire les anthocyanes, après la maturation totale montre un comportement individuel de la catégorie lié directement des caractéristiques qui détermine la formation des substances colorées.
3. La récolte s'impose quand la quantité des anthocyanes est maximum et différente d'une catégorie à l'autre.

Les anthocyanes extraits des raisins spiritueux, étant plus établis dans le medium acide, sont recommandées d'être plus utilisés pour améliorer la couleur des aliments et des boissons acides: fruits jus et sirop, fruit gelée, fruits sèches, bombons de fruit, etc.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bohm, H., Boeing, H., Hempel, J. : Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases, *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **1998**, 37(2), 147-163.
2. Su, C.T., Singleton, V.L. : Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, **2001**, 8, 153-158.
3. Strack, D., Wray, V. : *Antocyanins*, in : *Methods in Plants Biochemistry*, Vol I, Plant Phenolics (P.M. Dey and J.B. Harborne. Eds) Academic Press, San Diego, **1989**.
4. Huglin, P, Schneider, C. : *Biologie et écologie de la vigne*, Technique et Documentation, Paris, **1998**.
5. Francis, F.J. : Food colorants, Antocyanins, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1982**, 28, 273-341.
6. Singleton, V.L., Timberlake, C.F., Lea, A.G.H. : The phenolic cinnamates of white grapes and wine, *Journal of Sciences and Food Agriculture*, **1978**, 29, 403-410.
7. Lacaille-Dubois, M.-A., Wagner, H. : Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica*, **1996**, 143(6), 555-562.
8. Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H., Van de Putte, B. : Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41, 1242-1246.
9. Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. : *Characterisation and Measurement of Antocyanins by UV-Visible Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Inc., **2000**.