

OPTIMISATION DE LA METHODE D'EXTRACTION ET DE STABILISATION DE LA PHYCOCYANINE UTILISANT LA METHODOLOGIE DE SURFACE DE REPONSE "RSM"

Khaoula BEN SLIMANE^{(1,2)*}, Saloua SADOK⁽¹⁾, Hatem BEN OUADA⁽¹⁾ et Ilyes GOUJA⁽²⁾

(1) Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologie Marines Institut National des Sciences et Technologies de la Mer,

(2) Vitalight LAB SA – Sidi Thabet

* khaoula.benslimane@gmail.com, salwa.sadok@instm.rnrt.tn, hatem.benouada@instm.rnrt.tn, ilyes.gouja@gmail.com

ABSTRACT

A new method based on the response surface methodology (RSM) was developed for optimization and modeling of extraction and stabilization of phycocyanin which is a majority blue protein pigment of *Spirulina platensis*. The RSM method, based on the Composite Plan (CD) of the second degree allows to study three variables at three levels to obtain the optimal combination of extraction and stabilization of phycocyanin. According to the response of 3D surface, the optimum extraction of phycocyanin is reached in the special conditions: pH = 5, temperature = 5 °C and compression ratio = 60% stabilizer / 40% solvent with an experimental value 80.36 mg /g DM.

RESUME

Une nouvelle méthode basée sur la méthodologie de surface de réponse (RSM) a été développée pour l'optimisation et la modélisation de l'extraction et la stabilisation de la phycocyanine qui est un pigment protéique bleu majoritaire de la spiruline *Spirulina platensis*. La méthode RSM, basée sur le plan Composite (CD) de second degré permet d'étudier trois variables à trois niveaux pour obtenir la combinaison optimale de l'extraction et de la stabilisation de la phycocyanine. D'après le 3D de surface de réponse, l'optimum d'extraction en phycocyanine est atteint dans les conditions particulières de pH=5, température de 5°C et un rapport volumétrique 60% stabilisant/40% solvant avec une valeur expérimentale de 80.36 mg/g MS.

INTRODUCTION

La phycocyanine est un pigment de nature protéique hydrosoluble, de couleur bleue appartenant à la famille des phycobiliprotéines, se trouvant chez les cyanobactéries telle que la spiruline « *Spirulina platensis* ». C'est un pigment accessoire à la chlorophylle qui capte environ 50% de la lumière photosynthétique. Cet extrait présente des activités anti-oxydante et anti radicalaire. Il possède également des propriétés de détoxifiant et revitalisant (Romay et al. 2003). La phycocyanine est une molécule fluorescente qui émet vers les longueurs d'ondes 635 nm. Cette fluorescence est utilisée comme un marqueur naturel dans des applications médicales et autres telle que la méthode immuno-enzymatique ELISA, immuno-diagnostique (Moraes et al. 2010). Cependant, la phycocyanine est un pigment très instable car il est photo et thermo- sensible qui se dégrade rapidement. L'objectif de ce travail est d'optimiser l'extraction de la phycocyanine et la stabiliser par l'ajout d'un stabilisant naturel, non toxique et hydrosoluble.

MATERIEL ET METHODES

La spiruline *Spirulina platensis* a été étudiée pour

l'extraction de la phycocyanine. cette souche a été cultivée dans un photo bioréacteur sur un milieu Zarrouk modifié (Zarrouk, 1966).

PROCEDURES D'EXTRACTION

La biomasse micro-algale issue de la spiruline a été homogénéisée en ajoutant un mélange contenant un volume stabilisant naturel et un solvant (v/v). On fixe ensuite la valeur du pH du mélange et on laisse macérer à différentes températures. On réalise ensuite une étape de filtration soit par centrifugation à 5000 rpm pendant 15 min, soit en utilisant un filtre alimentaire. On récupère la partie hydrosoluble qui est un extrait riche en phycocyanine. On mesure le rendement de l'extraction de phycocyanine à l'aide d'un spectrophotomètre.

PROCEDURES ANALYTIQUES

La concentration en phycocyanine (CPC) en mg/ml a été calculée à partir des densités optiques à 652 et 620nm, selon l'équation 1 d'après (Bennett and Bogorad, 1973):

$$CPC = (DO_{620} - 0,474DO_{652}) / 5,34 \quad (1)$$

Le rendement d'extraction (Yield) en mg/g de matière sèche était calculé à l'aide de l'équation 2 d'après (Silveira et al. 2007): $Yield = (CPC)V / DB$ (2)

RESULTATS ET DISCUSSION

Les différentes méthodes utilisées pour extraire la C-phycoyanine à partir de la biomasse humide ont confirmé la présence de cette molécule dans le surnageant. L'utilisation d'une biomasse humide congelée-décongelée a été étudiée pour rendre l'extraction plus facile via la rupture de la membrane cellulaire d'où une extraction plus rapide et plus saine qu'avec autre méthode chimique (Acker and McGann, 2003).

Le procédé d'extraction et de stabilisation est caractérisé par une étape de macération faisant

intervenir un conservateur naturel dans un mélange stabilisant/eau.

Dans cette étude, la méthode RSM a été utilisée pour optimiser le procédé d'extraction et de stabilisation de la phycocyanine incorporant un conservateur naturel. Cette méthode permet de mieux estimer l'effet des trois principales variables indépendantes (volume stabilisant/volume solvant d'extraction, le pH et la température) sur le rendement d'extraction. Les données sont présentées en terme de mg de phycocyanine par g de poids sec de *Spirulina platensis*. D'après le graphique en 3D, l'optimum d'extraction en phycocyanine est atteint dans les conditions particulières de pH=5, température de 5°C et un rapport volumétrique 60% stabilisant/40% solvant avec une valeur expérimentale de 80.36 mg/g MS (figure1).

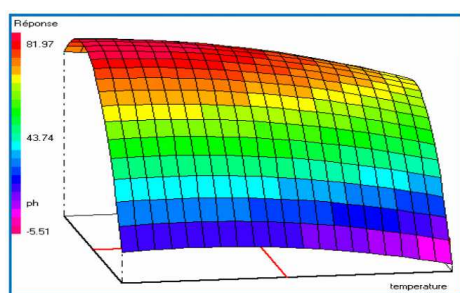


Figure 1: Etude graphique en 3D: Variation de la CPC dans le plan: température, pH et un volume de stabilisant dans le plan: température, pH et un volume de stabilisant



Photo 1: Extrait sans stabilisant



Photo 2: Extrait avec stabilisant

Avantageusement, l'extrait obtenu contient également des micronutriments. Le stabilisant utilisé a montré un effet stabilisateur sur la couleur (Photo 2). Cet extrait est actif et se conserve avec toutes ses propriétés biologiques et de fluorescence pendant une durée importante par rapport à un extrait sans stabilisant qui se dégrade au bout de quelques heures (Photo 1). La phycocyanine est protégée des bactéries et de l'oxydation par le stabilisant, même en présence d'eau dans le mélange d'extraction, le risque de contamination bactérienne ou de dégradation de la phycocyanine est très limité et les propriétés biologiques sont conservées.

Un pH acide dégrade rapidement la biomasse et la phycocyanine. En contre partie la phycocyanine ne supporte pas longtemps des Ph > 8.

Concernant la Température, on retrouve clairement cette thermo-sensibilité de la molécule. La température la plus faible est celle qui a permis de mieux la conserver. On n'exclut pas que le rendement à l'extraction à une température de 25 ou 45°C serait meilleur mais à condition que l'exposition à cette température soit le plus rapide possible. Cet aspect n'a pas été étudié dans le cadre de ce travail. Le temps de

traitement a été choisi de façon à correspondre à une activité économique journalière.

L'impact du stabilisant est de même nature que le pH, un faible taux du stabilisant ne favorise pas l'extraction et un taux plus élevé réduit la pression osmotique nécessaire à l'extraction.

CONCLUSION

Cette méthode d'optimisation a permis d'extraire et de stabiliser la phycocyanine avec une qualité alimentaire. La durée de conservation dépasse 6 mois.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été mené dans le cadre du projet transfrontalier BIOVecQ PS1.3_08 co-financé par l'UE.

BIBLIOGRAPHIE

ACKER, J. P. & MCGANN, L. E. (2003): Protective Effect of Intracellular Ice During Freezing. *Cryobiology*, 46, No. 2, 197.

- BENNETT, A. & BOGORAD, L. (1973): Complimentary Chromatic Adaptation in a Filamentous Blue- Green Alga. *The Journal of Cell Biology*, 58, No. 2, 419 p.
- MORAES, C.C., BURKERT, M.F.J et KALIL, J., (2010): C-phycoyanin extraction process for large-scale use . *J. Food Biochem.*, 34 133–148.
- ROMAY, C. H., GONZALÉZ, R., LEDÓN, N., REMIREZ, D. AND RIMBAU V. (2003): C-Phycocyanin: a Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *Current Protein & Peptide Science*, 4, No. 3, 207.
- SILVEIRA, S. T., BURKERT, J. F. M., COSTA, J. A. V., BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J. (2007): Optimization of Phycocyanin Extraction from *Spirulina platensis* Using Factorial Design. *Biores. Technology*, 98, No. 8, 1629.
- ZARROUK C. (1966): Contribution à L'étude d'une Cyanophycée: Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la Croissance et la Photosynthèse de *Spirulina maxima*, Ph.D Thesis, Université de Paris, France.