

EXTRACTION ET CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE D'ASTAXANTHINE ET DERIVES PAR ASE A PARTIR DE DECHETS DE CREVETTES

Imededdine HASSEN, Balkiss FERCHICHI, Raouf MEDIMAGH

INRAP, Pôle Technologique de Sidi Thabet, Ariana 2020, Tunisie

Email : imedhassen@yahoo.fr ; balkisferchichi0503@gmail.com; raouf.medimagh@inrap.rnr.tn

ABSTRACT

We carried out the extraction of carotenoid-based astaxanthin (AX) from shrimp shells (*Parapenaeus longirostris*) by an alternative technique: ASE (Accelerated Solvent Extraction). We studied several parameters such as shells grinding, temperature, the nature of the solvent on the total content of carotenoids (in $\mu\text{g/g}$ of shells). It appears that a fine particle size (<0.5 mm) is critical in order to maximize the extraction efficiency. The optimum temperature coupled with a mixture of both polar and non-polar solvents is a good compromise to maximize the content of total carotenoids in the obtained extract. The identification of the extract composition was performed by HPLC DAD coupled to a mass spectrometer to confirm the presence of free astaxanthin and its ester derivatives.

RESUME

Nous avons réalisé l'extraction de caroténoïdes à base d'astaxanthine (AX) à partir des carapaces de crevettes (*Parapenaeus longirostris*) par une technique alternative : l'ASE (Accelerated Solvent Extraction). Nous avons étudié plusieurs paramètres tels que le broyage des carapaces, la température, la nature du solvant sur la teneur en caroténoïdes totaux (en $\mu\text{g/g}$ de déchets). Il en ressort qu'une granulométrie fine ($<0,5$ mm) est essentielle pour maximiser le rendement d'extraction. La température optimale couplée à un mélange de solvant polaire et apolaire représente un bon compromis pour maximiser la teneur en caroténoïdes totaux dans l'extrait obtenu. L'identification de la carte chimique de l'extrait a été réalisée par HPLC DAD couplée à un spectromètre de masse pour confirmer la présence de l'astaxanthine libre ainsi que ses dérivés estérifiés.

INTRODUCTION

L'astaxanthine (3,3'-dihydroxy- β,β -carotène-4,4'-dione) **AX** est un xanthophylle à haute valeur ajoutée, qui a été utilisé avec succès ces dernières années dans les domaines agroalimentaire, nutraceutique, pharmaceutique et cosmétique (Lui et al., 2014). Ce pigment est présent dans la nature, en particulier dans le milieu marin, où il est commun à plusieurs espèces, comme les salmonidés, les crevettes, les homards et les écrevisses, contribuant à la couleur rose-rouge de leur chair (Razavi et al., 2006 ; Sivathanu et Palaniswamy, 2012).

L'objet de cette étude concerne l'utilisation d'une technique alternative d'extraction accélérée par solvants (ASE) pour l'extraction de cette molécule et ses dérivés. L'étude de plusieurs facteurs concernant le traitement de l'échantillon ainsi que la nature du solvant ont été étudiés. Une identification par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier la composition des extraits obtenus.

MATERIEL ET METHODE

Protocole d'extraction

Les déchets de crevettes utilisés dans le cadre de cette

étude ont été fournis par le Laboratoire de Biodiversité et de Biotechnologie Marines, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (INSTM). Il s'agit de têtes et de carapaces de crevettes appartenant à l'espèce *Parapenaeus longirostris*, communément appelée "Crevette rose du large", ou encore "Gembri sghir" dans le dialecte Tunisien.

En premier lieu, les déchets de crevette (*Parapenaeus longirostris*) sont décongelés, et broyés jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène qui est filtré à l'aide d'un tamis en inox de porosité 0.5mm, et le résidu solide est enfin récupéré.

Après déprotéination par cuisson, les déchets sont séchés à 40°C dans une étuve ventilée. Une deuxième opération de broyage et de tamisage est effectuée pour récupérer une poudre fine de l'ordre de 0.5 mm. L'extraction de l'astaxanthine est effectuée par ASE (Assisted Solvent Extraction) selon un programme optimisé (80°C pendant 5 minutes de temps statique, 100 bars d'Azote, cellule en acier inox). La nature du solvant a été variée.

Afin d'évaluer la quantité des caroténoïdes totaux extraits, les spectres UV-visible ont été enregistrés entre 380 et 700 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-VIS à double faisceau (Thermo scientific). La teneur en caroténoïdes totaux (en équivalents

astaxanthine) a été déterminée à l'aide de l'équation (1)

$$C_{AX} \left(\frac{\mu g}{g \text{ déchets}} \right) = \frac{A * 10000}{(E_{1\text{cm}}^{1\%})} \quad (1)$$

$A = \text{Absorbance à } 477 \text{ nm}$

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$: Coefficient d'extinction molaire du solvant (2198 pour l'acétone) (Nobre et al., 2006)
Analyse par HPLC-MS :

L'appareillage utilisé est constitué d'un chromatographe en Phase Liquide à Haute Performance (modèle "Waters e2695 Separation module"), équipé d'un détecteur UV-Visible à barrettes de diodes (modèle "PDA: Waters 2998 Photodiode Array Detector") et couplé à un spectromètre de masse (modèle "Waters 3100 Mass Detector"). La colonne utilisée est de type "Waters Xterra MS C18" et de dimensions "15*4.6 mm; 3.5µm".

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Optimisation de l'extraction d'astaxanthine et ses dérivés par la technique "ASE"

Les xanthophylles contenus dans les exosquelettes des crustacés sont généralement liés à des protéines sous forme de complexes appelés "crustacyanines". Dans le but de maximiser les rendements d'extraction des composés d'intérêt, il est donc nécessaire d'effectuer certaines étapes de prétraitement. L'indicateur de performance consiste à suivre la teneur en caroténoïdes totaux par UV-VIS.

Effet du broyage

La figure 1 montre clairement l'importance des étapes de prétraitement pour l'amélioration des rendements d'extraction des xanthophylles à partir de déchets de crevette. En effet, il est clair que l'étape de cuisson s'avère indispensable de moment qu'elle permet de tripler la quantité extraite en en AX. Par ailleurs, une granulométrie fine (<0,5 mm) permet de doubler quasiment la teneur en caroténoïdes totaux

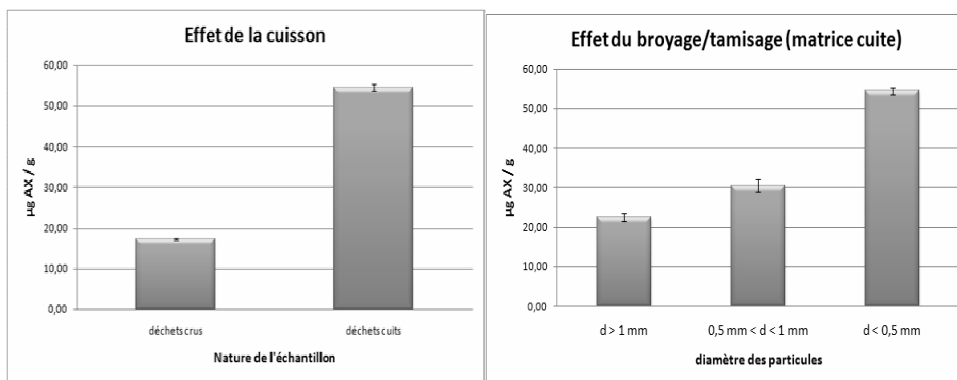


Figure 1. Effet de la granulométrie sur la teneur en caroténoïdes totaux

Effet du type de solvant

Le mélange d'isopropanol hexane s'est avéré le plus efficace pour extraire les xanthophylles. Ce résultat peut être expliqué par la structure même des molécules d'intérêt, qui présente une longue chaîne carbonée avec des groupements hydroxyles aux

extrémités. Néanmoins, pour des activités in vivo ou a vertu bio, il est préférable de recourir à l'éthanol comme étant un solvant biocompatible. Le choix s'est d'ailleurs fixé sur ce dernier pour les tests conduits sur les effets des extraits sur les courants endogènes de l'ovocyte de Xénope.

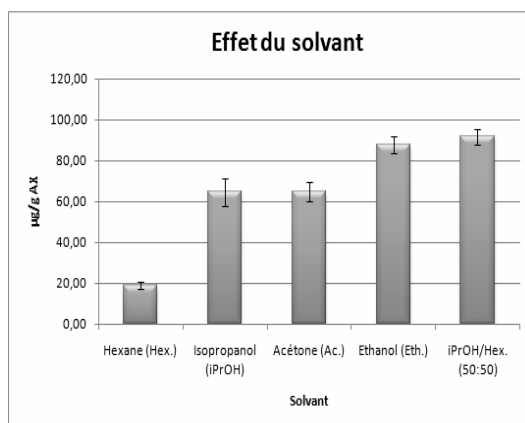
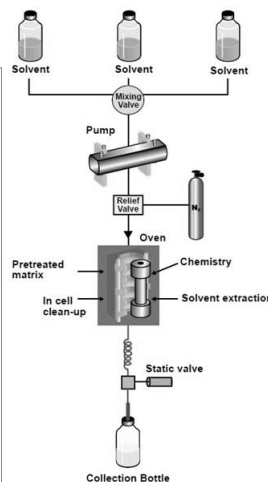


Figure 2. Variation du type du solvant



Comparaison de deux méthodes d'extractions :

D'après les données rapportées dans le tableau 1, nous pouvons constater que pour une même concentration obtenue de caroténoïdes en µg /g de déchets, la technique de macération nécessite une quantité de solvant 5 fois supérieure à celle utilisée en ASE. Le temps nécessaire pour accomplir une extraction ASE est très réduit par rapport à celui de la

macération. La technique d'extraction ASE, utilisant l'effet combiné de la température élevée et de la pression est plus efficace que celle par macération puisqu'elle se caractérise par des temps d'extraction courts et une utilisation réduite de solvants classiques présentant ainsi un intérêt économique de point de vue temps et coût de réactifs.

Tableau 1 : Les teneurs en caroténoïdes totaux (eq. Astaxanthine) (µg/g) obtenues par les techniques d'extraction ASE et Macération

	ASE	Macération
Teneur totale extraite en caroténoïdes totaux (eq. Astaxanthine) (µg/g)	55,2	54,8
Rendement massique de l'extrait (%)	3,2	1,4
Quantité de solvant utilisée (mL)	10	50
Durée d'extraction	30 min	2 jours
Activité antioxydante (EC 50 en µg / mL)	220,5 ±2,31	245,61 ±8,49

Analyse qualitative des caroténoïdes

La caractérisation physico-chimique des extraits a été confirmée par chromatographie liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse

(HPLC-MS). Ceci a permis d'identifier la carte chimique des extraits bruts et montre la présence d'AX libre accompagnée de dérivés estérifiés (Fig. 3).

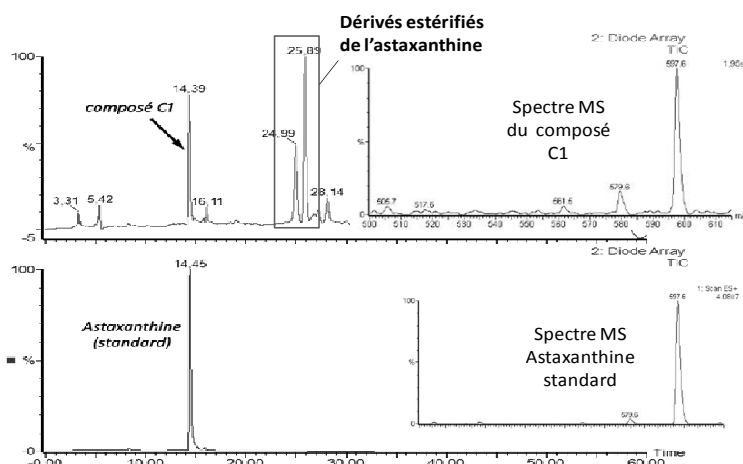


Figure 3. Identification de l'extrait par HPLC-MS

CONCLUSION

L'extraction des xanthophylles à partir des déchets de crevettes (*Parapaneus longirostris*) montre que les meilleurs résultats ont été obtenus par la combinaison de procédures de prétraitement (cuisson, séchage et broyage des résidus préalablement à l'extraction) et l'utilisation d'un mélange de solvants polaire et apolaire hexane : isopropanol. L'éthanol a été néanmoins préféré pour des applications in vitro. Par ailleurs, l'apport de la technique d'extraction

alternative (ASE) permet de réaliser une économie substantielle en temps et en quantités de solvants consommés. L'identification par LC-MS a été effectuée pour s'assurer de la nature des fractions. L'analyse des différents extraits par LC-MS a permis d'identifier la présence de l'astaxanthine libre en quantité relativement importante, en plus des dérivés estérifiés. L'utilisation de ces extraits a pu être testée pour des applications in vitro mais le champ reste plus large et très prometteur.

REMERCIEMENTS

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

BIBLIOGRAPHIE

LIU, J., SUN, Z., GERKEN, H., LIU, Z., JIANG Y. & CHEN F. (2014) *Chlorella zofingiensis* as an Alternative

NOBRE, B., MARCELO, F., PASSOS, R., BEIRÃO, L., PALAVRA, A., GOUVEIA, L. & MENDES, R. (2006) Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin and other carotenoids from the microalga *Haematococcus pluvialis*. *European Food Research and Technology*. 223, 787-790.

RAZAVI, S., BLANCHARD, F. & MARC, I. (2006) UV-HPLC/APCI-MS method for separation and identification of the carotenoids produced by *Sporobolomyces ruberrimus* H110. *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 25p.

SIVATHANU, B. & PALANISWAMY, S. (2012). Purification and characterization of carotenoids from green algae "*Chlorococcum humicola*" by HPLC-NMR and LC-MS-APCI. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2, 276-282.