



HAL
open science

Utilisation des caroténoïdes naturels de *Momordica cochinchinensis* (gac) comme composés santé : extraction et bioactivité en fonction de l'origine et du procédé

Hanh Phan-Thi

► To cite this version:

Hanh Phan-Thi. Utilisation des caroténoïdes naturels de *Momordica cochinchinensis* (gac) comme composés santé : extraction et bioactivité en fonction de l'origine et du procédé. Ingénierie des aliments. Université de Bourgogne, 2014. Français. NNT : 2014DIJOS087 . tel-01668508

HAL Id: tel-01668508

<https://theses.hal.science/tel-01668508>

Submitted on 20 Dec 2017

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

AGROSUP DIJON

INSTITUT NATIONAL SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE

L'ALIMENTATION ET DE L'ENVIRONNEMENT

UMR Procédés Alimentaires et Microbiologiques

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Sciences des Aliments

Option: Biochimie et Procédés Alimentaires

Par **Thi Hanh PHAN**

**UTILISATION DES CAROTENOIDES NATURELS DE *MOMORDICA*
COCHINCHINENSIS (GAC) COMME COMPOSES SANTE.
EXTRACTION ET BIOACTIVITE EN FONCTION DE L'ORIGINE
ET DU PROCEDE**

Soutenue le 30 octobre 2014 devant la Commission d'Examen :

Pr P. DEGREAVE	Université de Lyon 1	Rapporteur
Pr D.T. HA	Institut Polytechnique de Hanoi	Rapporteur
Pr P-A. MARECHAL	AgroSup Dijon/Université de Bourgogne	Examinateur
Dr M. PROST	Laboratoire Spiral/Kirial International	Examinateur
Pr émérite A. VOILLEY	Laboratoire PAPC/AgroSup Dijon	Examinateur
Pr Y. WACHE	AgroSup Dijon/Université de Bourgogne	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe des Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques (PMB), de l'unité mixte de recherche des Procédés Alimentaires et Microbiologiques (UMR PAM) dirigée par le professeur Patrick Gervais. Cette thèse a été financée par l'Ambassade de France au Vietnam, Oséo (BPI) et AgroSup Dijon.

Mes plus chaleureux et sincères remerciements vont en tout premier lieu au professeur Yves Waché, mon directeur de thèse, qui a encadré ce travail. Merci de m'avoir accompagnée pendant toutes ces années à Dijon. Ses connaissances scientifiques et son encouragement m'ont vraiment beaucoup soutenue tout au long de ce projet. Malgré un agenda bien rempli, Yves a été très présent et toujours disponible pour m'offrir son écoute, son ouverture d'esprit et ses précieux conseils. Yves est non seulement un maître dans ma vie professionnelle mais aussi un ami proche dans ma vie personnelle. Merci pour avoir mangé avec moi presque tous les midis et avoir partagé sa bonne humeur avec moi pour agrémente ma digestion. Je le remercie également de s'être autant impliqué pour m'aider à trouver le soutien financier dont j'avais besoin pour aller jusqu'au bout de cette thèse.

Je remercie Docteur Cao Hoang Lan. Grâce à ses idées, ses conseils scientifiques et ses contacts au début de ma thèse, elle m'a permis de démarrer sur de bonnes bases, avec un sujet bien défini.

Je remercie M. Patrick Gervais de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour son soutien.

Je tiens également à remercier M. Marechal de m'avoir soutenue sur les aspects administration et financement.

Je tiens vivement à remercier les professeurs Pascal Degraeve (BioDymia, Lyon) et Ha Duyen Tu (IPH, Hanoi) pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également les personnes ayant accepté de faire partie de mon jury de thèse, pour l'intérêt et les apports scientifiques qu'ils ont portés sur mon travail. Merci donc au professeur Marechal, au docteur Prost et au professeur émérite Voilley pour être présents en tant qu'examineurs.

Je tiens à exprimer ma gratitude envers les membres de mon comité de thèse, le docteur Michel Prost (du laboratoire Spiral) et le maître de conférence Nguyen Thi Minh Tu (IPH,

Hanoi) qui ont suivi annuellement mon travail et qui m'ont donné de précieux conseils scientifiques.

J'adresse également mes remerciements au docteur Philippe Durand pour m'avoir aidée à faire les tests KRL au laboratoire Spiral, à Annick Barrey pour m'avoir accompagnée sur l'utilisation de l'HPLC à l'IUVV et à Mme Le Hoang Lam pour m'avoir accueillie au sein du centre de hautes technologies de l'IPH à Hanoi pour mes préparatifs de matières premières.

Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe PMB. Je n'oublie évidemment pas la disponibilité et la gentillesse de Sylvie et Christine pour mes questions sur les produits chimiques et les matériels du laboratoire. Merci à Florence, Carine et Emmanuelle pour m'avoir aidé à gérer les problèmes administratifs concernant mes droits.

Je désire remercier tous ceux qui ont travaillé à mes côtés et qui ont contribué à créer une ambiance agréable au laboratoire. Mes remerciements sont adressés à mes voisins de bureau et de paillasse (Chi, Ngoc, Dat, « petite » Hélène, « grande » Hélène, Jean-Luc, Manhal) pour leurs bonnes blagues, leurs histoires drôles pendant les pauses café, les sorties et tous les bons moments partagés de leur vie de chercheur. Merci également aux autres thésards du laboratoire (Julia, Pauline, Bruno, Cyril, Alexandre, Sébastien, Guillaume) et à Christine, Florence, Rémi, Jean-François, Brigitte, qui ont partagé avec moi l'ambiance sympathique des repas du laboratoire. Je pense aussi aux amis que j'ai rencontrés au laboratoire et aux personnes avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Lucie, Cécile, Marcia, Giorgia, Ayaka, LaLune, Boonramluektamon, Pongrat, Thu, Thao, Clément, Sarodya.

Mme Voilley et Jérôme reçoivent aussi mes remerciements pour leur sympathie et la gentillesse dont ils ont fait preuve à mon égard.

J'ai une pensée particulière pour Hue, Damien, Cynthia et Fernando pour leur amitié sincère, leurs encouragements, leurs conseils et pour avoir partagé avec moi de beaux moments de vacances qui resteront gravés dans ma mémoire.

Je remercie évidemment tous mes amis vietnamiens, en France (anh Quang, anh Hung, chi Ha, Binh Yen, Thu, Binh An, chi Chi, Ngoc, Dat, chi Trang, chi Phuong, chi Tien, anh Vu, anh Bao, Ai Tam, Duy Tam, Ly) ou déjà rentrés au Vietnam (Hoang Anh, anh Thoai, anh Quan, chi Chau, Le, Huong, Anh, Linh), avec qui j'ai passé des moments joyeux, des fêtes inoubliables et aussi eu des discussions sérieuses sur l'amitié et la profession.

D'autres personnalités qui méritent d'être remerciées sont mon oncle Bang et sa femme Hong pour m'avoir hébergée et avoir pris soin de moi pendant mes séjours à Hanoi.

Un grand remerciement à tous les membres de la famille Waché, Anissa, Timothée, Sabina et Iona pour m'avoir invitée chez eux plusieurs fois autours de repas de spécialité, pour de belles promenades dans les vignes de Vougeot et à l'occasion des fêtes de la musique. Je n'oublie jamais les échanges culturels que nous avons eus pendant les fêtes vietnamiennes à Dijon et leurs voyages au Vietnam.

Je dédicace ce travail à mes parents, mon frère et ma belle-sœur qui m'ont soutenue et encouragée au cours de ces années de thèse.

Enfin, le plus fort de mes remerciements est pour Bruno pour son rôle d'être mon « enseignant du français » privé, merci pour ton écoute, tes conseils et ta tendresse. Merci pour avoir essayé de comprendre ce que j'ai écrit dans ma thèse et de corriger des fautes en français qui ne sont pas toujours marquée dans ma tête de « poisson rouge ». Merci pour être venu à côté de moi.

Résumé

L'arille de *Momordica cochinchinensis* (gac), un fruit de la famille des Cucurbitacées, est la source végétale la plus riche en lycopène et β -carotène. Ces deux composés ont, respectivement, un rôle de puissant antioxydant et de provitamine A, intéressant les compléments santé. Tout d'abord, un procédé d'extraction fractionnée douce a été développé pour extraire ces caroténoïdes naturels en gardant leur qualité originale. Puis, le lycopène et le β -carotène extraits ont été caractérisés et analysés. Au moins 95 % des extraits sont composés de l'isomère all-*trans*. Ils ne sont pas dégradés pendant le traitement thermique représentant les procédés de formulation. Leur stéréo-mutation thermique a été évaluée. Le lycopène est plus antioxydant et donc plus rapidement isomérisé que le β -carotène à haute température. L'isomérisation augmente leur activité antioxydante, qui a été évalué par test chimique TEAC et sur l'hémolyse des cellules sanguines (KRL) *in vitro*. Les deux caroténoïdes de l'arille de gac sont beaucoup plus antioxydants que le Trolox contre l'hémolyse. En comparant avec d'autres sources de β -carotène, les caroténoïdes extraits de gac dans ces conditions douces restent antioxydants même à des concentrations plus élevées contrairement à ceux extraits dans des conditions classiques qui deviennent prooxydants. Ces résultats permettent de discuter la bioactivité des caroténoïdes d'après leur qualité et de leur origine, c'est à dire leur source et leur procédé d'extraction. D'un point de vue applicatif, outre le procédé de fractionnement qui est industrialisable, le traitement thermique appliqué permet de contrôler la fonctionnalité des produits riches en caroténoïdes.

Mots-clés : *Momordica cochinchinensis* (gac), caroténoïdes naturels, extraction fractionnée, traitement thermique, antioxydant, bioactivité, isomérisation, cellule sanguine, compléments santé.

Abstract

The aril of *Momordica cochinchinensis* (gac), plant from the Cucurbitaceae family, is the richest source of lycopene and β -carotene, which are a strong antioxidant and a pro-vitamin A, respectively, interesting for health-complements. First, a process of soft extraction-fractionation was developed for extracting effectively the natural carotenoids from gac without loss of their original quality. Then, the lycopene and β -carotene extracted from gac were analyzed and characterized. At least 95% of the extracts were composed of the all-*trans* isomer. They were not degraded during the heat-treatment mimicking formulation processing. Their thermal stereo-mutation was evaluated. Lycopene is more antioxidant, it is thus isomerized more rapidly than β -carotene at high temperature. The isomerization of carotenoids increases their antioxidant activity that was evaluated by the chemical test TEAC and through the hemolysis of red blood cells (KRL) *in vitro*. The lycopene and β -carotene from gac are notably more antioxidant than Trolox. By comparing with other sources of β -carotene, carotenoids extracted from gac in these soft conditions keep their antioxidant properties, even at high concentration, contrasting with extracts obtained in classical conditions that become prooxidant. From these results, the bioactivity of carotenoids is discussed from their quality and their origin that is their source and extraction process. For application, in addition to the fractionation process which is easily transferable to the industry scale, the heat-treatment used in this study is interesting for controlling products rich in functional carotenoids.

Key words: *Momordica cochinchinensis* (gac), natural carotenoids, extraction-fractionation, heat-treatment, antioxidant, bioactivity, isomerization, red blood cell, health-complements.

PREAMBULE

Cette thèse est née avec le projet de laboratoire international associé "Tropical Bioresources & Biotechnology" qui regroupe l'UMR PAM (AgroSup Dijon/Université de Bourgogne) et l'Institut Polytechnique de Hanoi. Elle est une contribution pour l'étude des ressources végétales du Vietnam et a occasionné plusieurs déplacements dans ce pays pour des rencontres avec les fournisseurs de gac, des visites sur les zones de production, des contacts avec des producteurs d'huile et des essais au hall pilote de l'IPH. Les enseignants-chercheurs de l'IPH ont été présents tout au long du projet pour la demande de bourse à l'Ambassade de France, le comité de thèse et le jury et le contact continue maintenant pour les perspectives de création d'entreprise.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
INTRODUCTION GENERALE	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIE	3
1.1 CAROTENOÏDES	3
1.1.1 <i>Introduction aux caroténoïdes</i>	3
1.1.2 <i>Lycopène et β-carotène</i>	4
1.1.2.1 <i>Structure chimique</i>	4
1.1.2.2 <i>Solubilité</i>	4
1.1.2.3 <i>Absorption de la lumière et de la couleur</i>	5
1.1.2.4 <i>Isomérisation et dégradation</i>	6
1.1.2.5 <i>Biodisponibilité pour la santé</i>	10
1.1.2.6 <i>Action antioxydante et prooxydante</i>	10
1.1.3 <i>Sources naturelles de lycopène et β-carotène</i>	13
1.1.4 <i>Réglementation et marché pour le lycopène et le β-carotène en agro-alimentaire</i>	15
1.2 LE FRUIT GAC	17
1.2.1 <i>Généralités</i>	17
1.2.2 <i>Morphologie</i>	18
1.2.3 <i>Caroténoïdes de l'arille de gac</i>	18
1.2.4 <i>Huile de l'arille de gac</i>	19
1.2.5 <i>Procédé d'extraction des caroténoïdes de l'arille de gac</i>	20
1.2.6 <i>Stabilité des caroténoïdes de l'arille de gac</i>	22
1.3 TECHNIQUES D'EXTRACTION ET STABILITE DES CAROTENOÏDES EXTRAITS	25
1.3.1 <i>Méthode d'extraction aux solvants</i>	25
1.3.2 <i>Thermo-instabilité des caroténoïdes durant l'extraction conventionnelle</i>	27
1.3.3 <i>Introduction aux solvants</i>	28
1.3.3.1 <i>Classement des solvants</i>	28
1.3.3.2 <i>Les solvants dans l'industrie alimentaire</i>	28
1.4 CONCLUSION ET ORIENTATION DE L'ETUDE.....	32

METHODOLOGIE.....	33
2.1 MATIERES PREMIERES	33
2.2 CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES CAROTENOÏDES.....	33
2.2.1 <i>Chromatographie sur couche mince (CCM)</i>	33
2.2.2 <i>Spectrométrie UV-visible</i>	34
2.2.3 <i>La Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) avec détecteur à barrette de diodes (abréviation en anglais : DAD-HPLC)</i>	36
2.2.4 <i>Analyse physique pour caractériser les particules : granulométrie à diffraction laser</i>	37
2.3 ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE DES PRODUITS DE DEGRADATION DES CAROTENOÏDES..	38
2.4 ANALYSE DU POUVOIR ANTIOXYDANT ET DE LA BIOACTIVITE DES CAROTENOÏDES	39
2.4.1 <i>Capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (abréviation en anglais : TEAC)</i>	39
2.4.2 <i>Kit des Radicaux Libres (KRL) sur cellules sanguines</i>	41
RESULTATS ET DISCUSSION.....	44
3.1 INTRODUCTION A L'EXTRACTION ET A LA STABILITE DU LYCOPENE ET DU B-CAROTENE DE GAC.....	44
3.1.1 <i>Extraction au solvant des caroténoïdes de l'arille de gac</i>	44
3.1.2 <i>Evaluation de la stabilité des caroténoïdes extraits de l'arille de gac</i>	46
<i>Article 1 : Stability of carotenoid extracts of gac (Momordica cochinchinensis) towards cooxidation – Protective effect of lycopene on β-carotène</i>	48
3.2 EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DU LYCOPENE ET DU B-CAROTENE DE L'ARILLE DE GAC.....	56
3.2.1 <i>Procédés d'extraction au solvant de caroténoïdes naturels</i>	56
3.2.2 <i>Mise au point du procédé d'extraction de caroténoïdes de l'arille de gac</i>	57
3.2.2.1 Tissus de l'arille de gac	57
3.2.2.2 Procédé d'extraction assisté du lycopène et du β -carotène de gac	59
3.2.2.3 Caractérisation des extraits fractionnés de l'arille de gac	61
3.2.3 <i>Conclusion</i>	67
3.3 STABILITE ET BIO-ACTIVITE DU LYCOPENE FRACTIONNE DE L'ARILLE DE GAC	68
3.3.1 <i>Rappel bibliographique</i>	68
3.3.1.1 Stabilité thermique du lycopène	68
3.3.1.2 Incohérence de la capacité antioxydante du lycopène.....	71

3.3.2	<i>Effet du traitement thermique sur l'isomérisation et l'augmentation de la propriété antioxydante du lycopène de l'arille de gac</i>	73
	Article 2 : Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from <i>Momordica cochinchinensis</i> (gac) by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker	74
3.3.3	<i>Bio-activité du lycopène de l'arille de gac sur les cellules sanguines dans le plasma</i>	81
3.3.3.1	Test KRL	81
3.3.3.2	Résultats et discussion	81
3.3.4	<i>Conclusion</i>	84
3.4	STABILITE ET BIO-ACTIVITE DU B-CAROTENE FRACTIONNE DE L'ARILLE DE GAC	85
3.4.1	<i>Rappel bibliographique</i>	85
3.4.1.1	Absorption et bio-activité du β -carotène	85
3.4.1.2	Isomérisation thermique du β -carotène	87
3.4.2	<i>Effet du β-carotène sur la résistance des cellules sanguines à l'hémolyse</i>	89
	Article 3 : Effect of heat-processing on the antioxidant and prooxidant activity of β -carotene from natural and synthetic origins on red blood cells	90
3.4.3	<i>Huile de palme (CPO) : source naturelle d'isomères de β-carotène</i>	112
3.4.3.1	Caractérisation et stabilité du β -carotène de CPO	112
3.4.3.2	Activité antioxydante du β -carotène de CPO	114
3.4.4	<i>Conclusion</i>	116
	DISCUSSION GENERALE	117
	CONCLUSION GENERALE	127
	PERSPECTIVES	130
6.1	PERSPECTIVES DE RECHERCHE	130
6.2	VALORISATION DES RESULTATS	133
	BIBLIOGRAPHIE	135
	ANNEXES	155
	ANNEXE 1. FICHES SUR LES CAROTENOIDES DE SYNTHESE	155
	ANNEXE 2. TEST KRL DE LA SOCIETE KIRIAL INTERNATIONAL	157
	ANNEXE 3. LE PROJET NATENCAPS	160
	ANNEXE 4. LISTE DES TRAVAUX	163

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure chimique du lycopène (formule brute : $C_{40}H_{56}$; masse molaire : 536,87 g/mol ; température de fusion : 175°C), de l'unité d'isoprène et du β -carotène (formule brute : $C_{40}H_{56}$; masse molaire : 536,87 g/mol ; température de fusion : 183°C).....	4
Figure 2 : Spectre d'absorption d'isomères géométriques du lycopène (A) et du β -carotène (B) dans l'hexane	6
Figure 3 : Hypothèse du mécanisme d'isomérisation et de dégradation du lycopène par oxydation et traitement thermique.....	8
Figure 4 : Hypothèse du mécanisme d'isomérisation et de dégradation du β -carotène par oxydation.....	9
Figure 5 : Mécanisme potentiel de réaction entre les caroténoïdes et les radicaux libres en fonction de la polarité des solvants et de la concentration d'oxygène.....	12
Figure 6 : Morphologie du fruit de gac	18
Figure 7 : Schéma des procédés potentiels et utilisation des produits de gac	22
Figure 8 : Fruits de gac gluants utilisés dans le cadre de cette thèse (fruits provenant du Vietnam).....	33
Figure 9 : Les composants de la chromatographie à couche mince	34
Figure 10 : Spectre et ratios de pic cis et de structure fine des caroténoïdes	36
Figure 11 : Diffusion et diffraction du faisceau lumineux traversant une particule (a), principe de l'analyse granulométrique à diffraction laser (b)	38
Figure 12 : Les composants de la chromatographie en phase gazeuse.....	39
Figure 13 : Mécanisme de décoloration du cation radical $ABTS^{*+}$ comme marqueur de l'activité d'une substance antioxydante dans le test de TEAC	40
Figure 14 : Courbe linéaire d'étalonnage standard du Trolox.....	41
Figure 15 : Les sources cellulaires de radicaux libres et les protections cellulaires contre les radicaux libres (en gras).....	42
Figure 16 : Principe du test antioxydant sur les cellules sanguines du test KRL.....	42
Figure 17 : Spectre d'absorption de l'extrait des caroténoïdes de l'arille de gac dans l'hexane	45
Figure 18 : Spectre d'absorption de l'extrait de caroténoïdes de l'arille de gac dans l'hexane après stockage à -20°C pendant 12 mois.....	46

Figure 19 : Localisation du lycopène et du β -carotène dans les tissus de l'arille de gac avant l'extraction. Observation dans l'eau avec un objectif $\times 100$.	58
Figure 20 : Observation microscopique de la libération des gouttelettes lipidiques contenant les caroténoïdes pendant l'extraction au solvant, dans l'hexane avec un objectif $\times 100$.	58
Figure 21 : Agitation de la purée d'arille de gac dans l'hexane par mélange avec du sable pendant l'extraction de caroténoïdes de l'arille de gac	59
Figure 22 : Schéma de l'extraction par l'hexane et de la purification du lycopène et du β -carotène de l'arille de gac.	60
Figure 23 : Absorbance spectrale du lycopène fractionné de l'arille de gac dans l'hexane (en rouge) en comparaison avec le lycopène <i>all-trans</i> naturel de Sigma-Aldrich (en gris).	62
Figure 24 : Absorbance spectrale du β -carotène fractionné de l'arille de gac dans l'hexane (en orange) en comparaison avec le β -carotène <i>all-trans</i> de synthèse de Sigma-Aldrich (en gris)	62
Figure 25 : Chromatogramme HPLC du lycopène (A) et du β -carotène (B) fractionnés à 20°C, 30 min	64
Figure 26 : Absorbance spectrale de l'huile de gac après le procédé d'extraction fractionnée dans l'hexane (en rouge) en comparaison avec des huiles commerciales, Vinaga (en noir) et Vinadica (en gris), provenant du Vietnam	66
Figure 27 : Illustration schématique des énergies relatives (kcal.mol^{-1}) de certain <i>cis</i> -isomères du lycopène par rapport à la forme <i>all-trans</i>	70
Figure 28 : Evaluation de l'activité antioxydante du lycopène de l'arille de gac chauffé à 50°C (◆) et à 80°C (■) à 2 μM sur la défense contre la demi-hémolyse de cellules sanguines dans le plasma en fonction du temps de traitement	84
Figure 29 : Absorbance spectrale du β -carotène de CPO dans l'hexane (en gris) en comparaison avec le lycopène <i>all-trans</i> naturel de Sigma-Aldrich (en noir)	112
Figure 30 : Evolution de la composition en <i>cis</i> -isomères des caroténoïdes de CPO durant le traitement thermique à 80°C (0-240 min), dans l'hexane	114
Figure 31 : Evolution de l'activité antioxydante du β -carotène de CPO durant le traitement thermique à 80°C (0-240 min) dans l'hexane, par le test TEAC	115
Figure 32 : Illustration de la cinétique d'hémolyse par la mesure d'absorbance du sang avec CPO (en noir) en comparaison avec le sang témoin (en gris)	116

Figure 33 : Description du chemin de l'isomérisation des caroténoïdes symétriques en relation avec la conformation et la stabilité thermodynamique de leurs stéréo-isomères	118
Figure 34 : Localisation des caroténoïdes dans la bicouche de phospholipides et système antioxydant et oxydant au niveau de la membrane polaire et apolaire	121
Figure 35 : Localisation des caroténoïdes dans la bicouche de phospholipides et système antioxydant et oxydant au niveau de la membrane polaire et apolaire	123
Figure 36 : Comparaison de la capacité antioxydante (losanges) et la bioactivité antioxydante (histogrammes) du lycopène et des β -carotènes de différentes sources, sans traitement thermique.....	124
Figure 37 : Induction des corps lipidiques dans les levures. Les cellules schématisées au dessus sans (A), avec (B) corps lipidiques (50 % lipides en masse) et après l'encapsulation (C) par la levure <i>Y. lipolytica</i> sont présentés en dessous colorée au Rouge Nil par les micrographies.....	131
Figure 38 : Utilisation du lycopène et du β -carotène extraits de l'arille de gac comme composé santé	131
Figure 39 : Valorisation du procédé d'extraction fractionné du lycopène et du β -carotène de l'arille de gac (brevet Extragac) pour le projet start-up Natencaps.....	134

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés chimiques et biochimiques du lycopène et du β -carotène	11
Tableau 2 : Sources naturelles de lycopène et β -carotène (mg/kg PF)	14
Tableau 3 : Caroténoïdes (μ g/g PF) de l'arille de gac (lycopène, β -carotène)	19
Tableau 4 : Composition en acides gras de l'huile de l'arille de gac en comparaison avec les autres huiles comestibles (% des acides gras totaux)	20
Tableau 5 : Récapitulation des conditions de déstabilisation et stabilisation des caroténoïdes de l'arille de gac	24
Tableau 6 : Présentation des principales techniques, conventionnelles et technologiques, d'extraction de molécules actives avec leur principe, avantages et inconvénients.....	26
Tableau 7 : Récapitulation des propriétés, avantages et inconvénients des agro-solvants et solvants utilisés en agro-alimentaire	30
Tableau 8 : Paramètres de spectrométrie du lycopène et du β -carotène	35
Tableau 9 : Conditions des gradients pour la séparation des isomères du β -carotène et des isomères du lycopène (temps dans les parenthèses) par HPLC	37
Tableau 10 : Identification des spots de la chromatographie à couche mince de l'extrait de l'arille de gac.....	45
Tableau 11 : Ratio de structure supramoléculaire du lycopène et du β -carotène fractionnés de l'arille de gac	63
Tableau 12 : Rendement de l'extraction des caroténoïdes de l'arille de gac (mg/100 g poids frais) en comparaison avec quelques études précédentes.....	65
Tableau 13 : Synthèse des principaux résultats bibliographiques concernant l'isomérisation et la dégradation du lycopène en fonction des conditions de traitement thermique	69
Tableau 14 : Réactions liées à l'effet antioxydant du lycopène	71
Tableau 15 : Concentration estimée du lycopène dissout dans le milieu réactionnel du test KRL.....	82
Tableau 16 : Activité antioxydante du lycopène de l'arille de gac chauffé à 50°C et à 80°C sur la défense contre la demi-hémolyse des cellules sanguines dans le plasma, en équivalent Trolox en fonction de la concentration du lycopène	83
Tableau 17 : Taux de β -carotène et de caroténoïdes totaux dans le sérum humain (en μ M) et des tissus différents (en nmole/g).....	85
Tableau 18 : Etude de l'absorption du β -carotène (BC) apporté par des compléments alimentaires	86

Tableau 19 : Données d'identification des isomères des caroténoïdes de CPO, analysés par HPLC-DAD ^a	113
Tableau 20 : Substances aromatiques principales identifiées pendant la dégradation enzymatique et thermique du β -carotène et du lycopène	132

LISTE DES ABREVIATIONS

- AAPH : Dihydrochlorure de 2,2-azobis[2-amidinopropane]
ABTS : 2,2'-Azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)
ABTS^{•+} : Radical cationique de 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-acide sulfonique)
ACN : Acétonitrile
APL : Acide poly-lactique
BCC : β -Carotène naturel obtenu de manière conventionnelle
BCG : β -Carotène extrait de l'arille de gac
BCS : β -Carotène issu de synthèse chimique
CAR : Caroténoïde
CAR[•] : Radical de caroténoïde
CCM : Chromatographie à couche mince
-CH₃ : Groupe méthyle (Me)
CO₂ : Dioxyde de carbone
CPO : Huile de palme (Crude Palm Oil)
DAD-HPLC : Diode Array Detector-High Performance Liquid Chromatography (chromatographie en phase liquide à haute performance avec détecteur à barrette de diodes)
DMSO : Diméthyle sulfoxyde
DPPH : Di(phényl)-(2,4,6-trinitrophényl)iminoazanium
EFSA : European Food Safety Authority (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)
XO : Enzyme xanthine oxydase
-H : Hydrogène
H₂O : Monoxyde de dihydrogène (eau)
KRL : Kit Radicaux Libres
K₂S₂O₈ : Peroxodisulfate de potassium
MeOH : Méthanol
MTBE : Méthyl *tert*-butyl éther
O₂ : Oxygène
PBS : Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)
PF : Poids frais
pO₂ : Pression partielle d'oxygène
PS : Poids sec
R : Groupe acyle

R_f : Rétention frontale

ROO[•] : Radicaux peroxy

ROS : Radical oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène)

SC : Solvant oxygéné ou chimique

SHC : Solvant hydrocarboné ou organique

TE : Trolox équivalent

TEAC : Trolox Equivalent Antioxydant Capacity (Capacité Antioxydante exprimée en Equivalent Trolox)

THF : Tétrahydrofurane

Trolox : Acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique

USDA : United States Department of Agriculture (Département de l'Agriculture des Etats-Unis)

UV : Ultraviolet

λ_{\max} : Longueur d'onde maximale

% A_B/A_{II} : Pourcentage du ratio *cis*

% HT₅₀ : Pourcentage du potentiel global de défense anti-radicalaire du produit antioxydant du sang témoin

% III/II : Pourcentage du ratio de structure fine

INTRODUCTION GENERALE

Le lycopène et le β -carotène sont deux caroténoïdes connus pour être de puissants antioxydants capables de protéger les cellules vivantes contre les attaques radicalaires et les dommages oxydatifs. La recherche de ressources naturelles de ces composés bioactifs permet de répondre à la tendance de consommation de produits naturels pour la santé. On en trouve dans plusieurs fruits et plantes généralement de couleur rouge et orange. Parmi eux, l'arille de *Momordica cochinchinensis* (gac), un fruit de la famille des Cucurbitacées, est trouvé avec l'une des teneurs en lycopène et β -carotène les plus élevées. Pourtant, les procédés actuels pour extraire ces composés de l'arille de gac sont encore limités à cause de la sensibilité de ces pigments aux oxydants provoqués par la chaleur, l'oxygène et la lumière pendant l'extraction.

Le super fruit gac est non seulement connu sur les marchés locaux au Vietnam mais aussi dans le monde entier, surtout aux Etats-Unis, en Australie et en Thaïlande. En Europe, ce fruit reste encore étranger et son marché n'existe presque que pour les populations issues du Sud-Est Asiatique. Malgré de nombreuses recherches sur l'exploitation de la valeur nutritive du gac dans les pays ci-dessus, aucun procédé efficace d'extraction et de purification de caroténoïdes (lycopène et β -carotène) de ce fruit n'a été publié.

Le lycopène et le β -carotène ont été étudiés depuis longtemps, en partie en raison de leur impact antioxydant sur les maladies cancéreuses. Pourtant, les résultats de ces études qui ont parfois montré des résultats opposés n'ont jamais permis de confirmer leur bioactivité. Ces caroténoïdes sont des substances très hydrophobes et facilement isomérisées ou dégradées par plusieurs facteurs oxydatifs. Parmi eux, le traitement thermique, qui est une étape courante des procédés alimentaires, influence également les propriétés antioxydantes du lycopène et du β -carotène car il y a une relation entre leur stabilité et leur bioactivité.

Parmi les méthodes d'évaluation de la capacité antioxydante de composés naturels, le test sur la Capacité Antioxydante exprimée en Equivalent Trolox (TEAC, abréviation en anglais) peut être utilisé pour des substances, quelle que soit leur hydrophobie, comme les caroténoïdes (Böhm et al., 2001). De plus, il est reproductible, simple et moins coûteux que certaines autres méthodes. C'est pourquoi ce test est souvent utilisé comme un marqueur chimique pour apprécier les capacités antioxydantes du lycopène et du β -carotène. Bien que de nombreuses études supposent que ces caroténoïdes peuvent aussi

devenir prooxydants dans certains cas, la frontière entre propriétés antioxydantes et prooxydantes reste toujours délicate à trouver. La plupart des explications sur le fonctionnement antioxydant et prooxydant du lycopène et du β -carotène sont basées sur des hypothèses. Des études complémentaires *in vitro* sur ces points sont actuellement nécessaires pour compléter les connaissances existantes et essayer de clarifier ces hypothèses.

L'objectif de ce travail est d'apprécier les potentialités d'utilisation des caroténoïdes du gac dans des aliments. Est-il possible de les extraire, les séparer les uns des autres, quelles sont leurs propriétés biochimiques, leur bioactivité ? Ces travaux visent également à apporter une contribution à la compréhension des mécanismes qui jouent sur la bioactivité des caroténoïdes et sur l'évaluation de l'impact des procédés sur cette activité biologique. Le plan du travail est le suivant. Tout d'abord une étude bibliographique fait le point des connaissances générales sur le lycopène et le β -carotène concernant leurs propriétés chimiques, leur stabilité et leur biodisponibilité. L'accent est particulièrement mis sur les procédés d'extraction de ces composés des végétaux, surtout du gac. L'arille de gac, matériel de cette étude, est alors brièvement présenté avec les procédés existants. La méthodologie de l'ensemble de l'étude est ensuite abordée. Puis les différentes étapes de l'étude sont présentées d'une manière indépendante, comprenant pour chaque partie une courte introduction bibliographique, le détail du matériel et des méthodes, les résultats et leur discussion. Ces parties concernent d'abord les premiers résultats de l'étude sur l'extrait des caroténoïdes de l'arille de gac, réalisée dans notre laboratoire. Les travaux actuels portent sur un procédé d'extraction et de fractionnement doux et efficace appliqué pour les tissus gluants de l'arille de gac. La caractérisation des produits fractionnés fait également l'objet d'études. Les produits obtenus par ce procédé ont ensuite été séparément étudiés sur leur qualité, leur stabilité thermique et leur bioactivité. En particulier, ils ont été testés sur des cellules sanguines en comparaison avec différentes sources, notre objectif dans cette étude est également de mieux comprendre les facteurs agissant sur les propriétés antioxydantes ou prooxydantes du lycopène et du β -carotène.

Enfin, les résultats de l'étude ont été utilisés pour proposer des recherches complémentaires et des voies pour les valoriser industriellement par un projet passant par la création d'une start-up. Et tout ceci est replacé dans le contexte plus général des molécules actives en calquant les problématiques spécifiques aux caroténoïdes de gac à celles de ce domaine telles qu'elles sont posées dans la conférence de consensus sur les molécules actives qui sera organisée à Dijon en 2015.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIE

1.1 CAROTENOÏDES

1.1.1 Introduction aux caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des pigments colorés dont la couleur varie du jaune au rouge. Environ 700 caroténoïdes ont été isolés à partir de produits naturels (Britton et al., 2008) mais seulement une vingtaine sont détectables dans les tissus ou le sérum humain. Ils sont naturellement synthétisés par des plantes, certains champignons, des algues et quelques bactéries (Liu et al., 2000; Astray et al., 2009; Achir et al., 2010). Chez les plantes et les algues qui contiennent des caroténoïdes, ceux-ci se trouvent dans les chloroplastes et les chromoplastes. Ils ont deux rôles principaux : l'absorption de l'énergie lumineuse pour la photosynthèse et la protection de la chlorophylle contre les dommages causés par la lumière (Bartley et al., 1995). Chez les animaux, les caroténoïdes ne peuvent pas être synthétisés, ils sont simplement absorbés par l'alimentation même quand ils confèrent la couleur à l'animal comme c'est le cas de certains crustacés, insectes, poissons et oiseaux.

Ces pigments sont d'abord connus pour la convertibilité de certains d'entre eux en vitamine A, une vitamine essentielle, indispensable à la préservation des tissus épithéliaux des yeux et au système immunitaire (Bendich et al., 1986). Les caroténoïdes sont également de puissants antioxydants capables de protéger les cellules vivantes contre des attaques de radicaux libres et des dommages oxydatifs par une action anti-mutagène, anti-clastogène et anti-carcinogène (Burton et al., 1984; Bendich et al., 1986; Fakourelis et al., 1987; Park 1994; Mueller et al., 2011). Ils ralentissent également le développement des tumeurs cancéreuses (Palozza et al., 1997; Wang et al., 1999). Dans l'alimentation, ils sont non seulement utilisés comme colorants alimentaires mais aussi ajoutés dans certains régimes fonctionnels afin d'abaisser la mortalité causée par certaines maladies (Pierce et al., 2006).

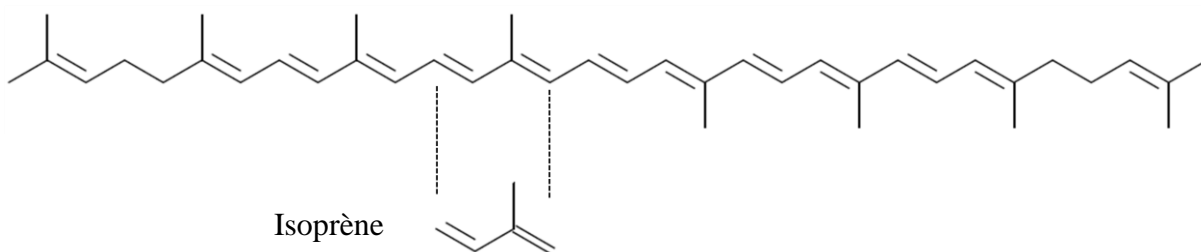
Parmi les caroténoïdes, le lycopène et le β -carotène, pigments de couleur rouge et orange, sont très abondants dans les plantes et les fruits. Ils sont également absorbés par le corps humain depuis l'alimentation et possèdent pour celui-ci des propriétés avantageuses.

1.1.2 Lycopène et β -carotène

1.1.2.1 Structure chimique

Le lycopène est un tétraterpène constitué de huit molécules isoprènes qui possède une structure hydrocarbonée avec 11 doubles liaisons covalentes conjuguées et 2 non-conjuguées. Sa structure acyclique classe le lycopène dans le groupe des caroténoïdes non-provitamines A. La cyclisation du lycopène aux deux extrémités forme le β -carotène (Britton 1989). Ce dernier se compose généralement de huit unités d'isoprène à structure cyclique caractéristique du groupe des provitamines A. Les structures chimiques du lycopène et du β -carotène sont présentées dans la figure 1.

Lycopène



β -carotène

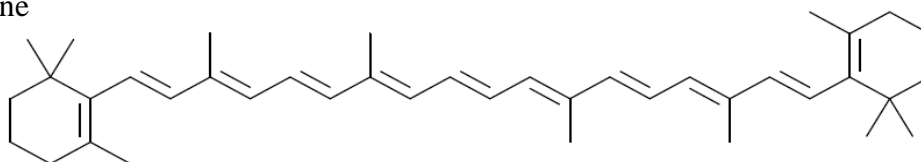


Figure 1 : Structure chimique du lycopène (formule brute : $C_{40}H_{56}$; masse molaire : 536,87 g/mol ; température de fusion : 175°C), de l'unité d'isoprène et du β -carotène (formule brute : $C_{40}H_{56}$; masse molaire : 536,87 g/mol ; température de fusion : 183°C)

1.1.2.2 Solubilité

Le lycopène et le β -carotène sont des substances lipophiles, insolubles dans l'eau. Dans les milieux aqueux ou les solvants polaires hydratés, ils ont tendance à former des agrégats et précipiter en cristaux (Zumbrunn et al., 1985) sous l'effet des interactions faibles et réversibles entre les liaisons hydrogène, des forces dipolaires, des interactions électriques de type van der Waals et de l'effet de l'hydrophobie (Köhn et al., 2008). Ils sont solubles dans les solvants apolaires comme le chloroforme, le benzène, le bisulfite de carbone, modérément solubles dans l'éther, l'éther de pétrole, l'hexane et l'huile. Dans l'éthanol et le méthanol, le β -carotène est parcimonieusement soluble et le lycopène

presque insoluble (Budavari et al., 1996). La solubilité des caroténoïdes dépend aussi de leur structure en *trans*- ou *cis*-isomères. Dans l'huile et la plupart des solvants organiques, les *cis*-isomères sont plus solubles que la forme all-*trans* (Failla et al., 2008).

L'hydrophobie des caroténoïdes cause des problèmes dans certains procédés alimentaires et pour des études scientifiques. Certaines expérimentations sont rendues difficiles par l'apparition d'agrégats de carotènes dans des solutions ou par la perte de ces substances au cours des procédés.

1.1.2.3 Absorption de la lumière et de la couleur

La couleur des caroténoïdes est due à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm (Britton 1995). Chaque double liaison réduit l'énergie nécessaire à un électron pour passer à un niveau d'énergie supérieur, ce qui permet à la molécule d'absorber progressivement des longueurs d'onde (λ_{\max}) de plus en plus grandes de la lumière visible (déplacement bathochrome). Le lycopène, avec 11 doubles liaisons, absorbe la plupart du spectre lumineux dans la zone violette, seul le rouge reste visible. Le lycopène et ses isomères ont donc une couleur rouge foncée. Le spectre d'absorption du lycopène dans l'hexane est maximal à trois longueurs d'ondes : 444, 470 et 502 nm. Les cycles de la structure du β -carotène provoquent un spectre à λ_{\max} plus court (effet hypsochrome) que celui du lycopène, avec une absorbance plus basse (effet hypochrome), notamment à 425, 450 et 477 nm (Rodriguez-Amaya 2001). La *cis*-isomérisation cause un léger effet hypsochrome du λ_{\max} avec l'apparition d'un autre pic de *cis* à environ 110 nm de moins que le pic majeur dont le λ_{\max} est le plus élevé du spectre du *trans*-isomère (Vetter et al., 1971; Mercadante et al., 1998). Les spectres d'absorption de certains isomères du lycopène et du β -carotène sont présentés dans la figure 2.

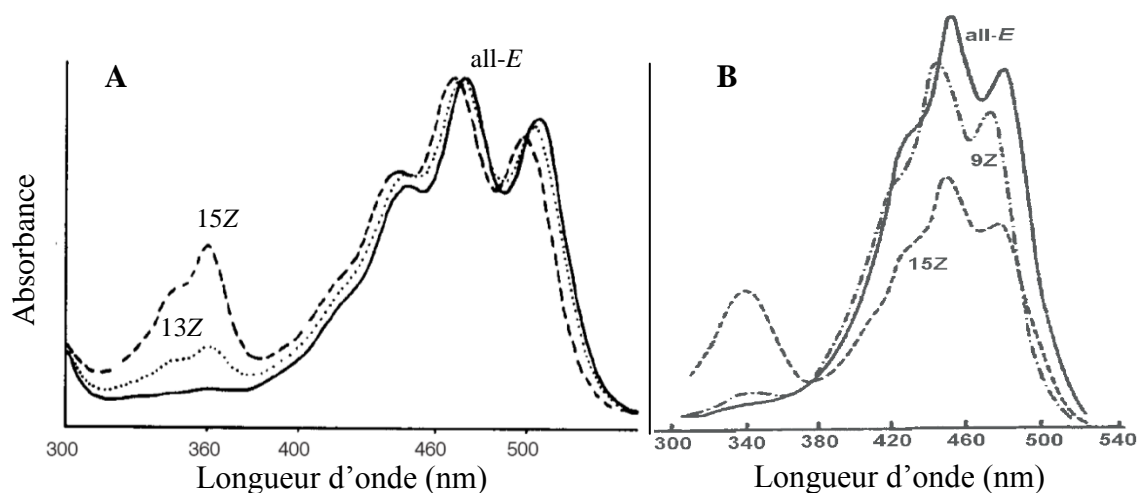


Figure 2 : Spectre d'absorption d'isomères géométriques du lycopène (A) et du β -carotène (B) dans l'hexane (Rodriguez-Amaya 2001)

1.1.2.4 Isomérisation et dégradation

Les caroténoïdes, de structure chimique insaturée, sont sujets à modifications dues à l'oxydation provoquée par différents facteurs tels que la température, la présence de certaines enzymes, l'humidité et la lumière (Shi et al., 1999; Shi 2000; Giovanelli et al., 2002; Amengual et al., 2011). Dans des conditions de température supérieure à 50°C en présence d'oxydants ou de lumière, le lycopène, molécule acyclique, est plus facilement oxydé que le β -carotène qui contient pourtant autant de doubles liaisons conjuguées. L'isomérisation est la première étape de la dégradation de ces caroténoïdes (Mordi 1993; Waché et al., 2003). Comme le lycopène et le β -carotène possèdent une longue chaîne de doubles liaisons conjuguées, ils peuvent avoir plusieurs isomères géométriques par exemple des isomères *all-trans*, *mono-cis* et *poly-cis* (Stahl et al., 1992; Schierle et al., 1997; Shi et al., 2003; Qiu et al., 2009). Un traitement thermique modéré suffit à l'isomérisation de ces caroténoïdes (Chen et al., 1998; Lee et al., 2002; Moraru et al., 2005; Unlua et al., 2007; Knockaert et al., 2012). Le traitement à une température supérieure à 100°C dans un milieu aqueux peut dégrader le lycopène en plusieurs produits (Kanasawud et al., 1990; Shi et al., 2003; Knockaert et al., 2012) et le traitement thermique sans solvant cause plus facilement la dégradation des cristaux de β -carotène qu'en présence de solvant (Chen et al., 1998).

Par rapport à l'effet de la température, la lumière et la présence d'oxydants enzymatique et non-enzymatique sont plus destructifs. Le lycopène et le β -carotène sont déjà dégradés durant l'illumination par une source fluorescente à -5°C (Chen et al., 1998)

et sous la lumière visible à 25°C en présence d'oxydants (Shi et al., 2003). Cette dégradation donne naissance à des produits à courte chaîne (Bossier et al., 1994; Shi et al., 2003; Sommerburg et al., 2003; Cao-Hoang et al., 2011). Le lycopène, oxydé par du permanganate de potassium ou par l'air, peut produire certains apo-lycopénals et diapocarotène-dials (figure 3) (Caris-Veyrat et al., 2003; Carail et al., 2006) et, avec un traitement thermique, il peut générer des composés volatils (Kanasawud et al., 1990). Le β -carotène, constitué d'une longue chaîne avec deux cycles ionones dans sa structure peut être dégradé en substances de type β -ionone ou rétinol (figure 4) (Sommerburg et al., 2003; Waché et al., 2003; Ho et al., 2007). Les produits intermédiaires de l'oxydation du β -carotène peuvent être des β -apo-caroténals et des époxydes ou di-époxydes de β -carotène (Carail et al., 2006). Parmi les produits de l'oxydation des caroténoïdes, le rétinol (une forme de vitamine A) et les volatiles comme la β -ionone, la pseudo-ionone, le néral, l'acide abscisique, le dihydroactinidiolide possèdent encore certains intérêts biologiques ou autres qu'antioxydants (Siems et al., 2002; Waché et al., 2003; Carail et al., 2006). Le contrôle de l'isomérisation et de la dégradation des caroténoïdes est nécessaire pour avoir des produits aux propriétés intéressantes pour la santé. Le mécanisme potentiel d'isomérisation et de dégradation du lycopène et du β -carotène est résumé par les figures 3 et 4.

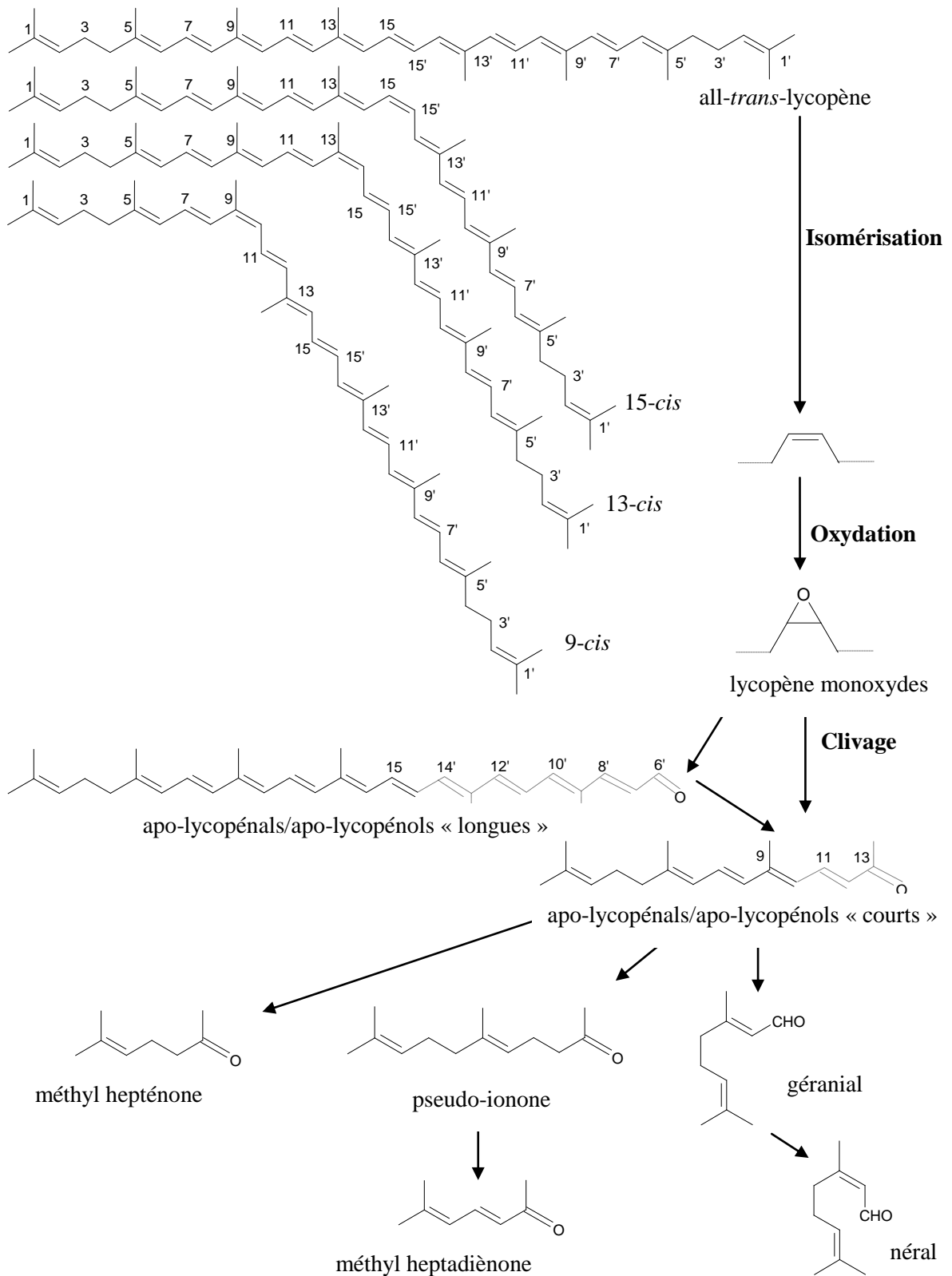


Figure 3 : Hypothèse du mécanisme d'isomérisation et de dégradation du lycopène par oxydation et traitement thermique (Chasse et al., 2001; Caris-Veyrat et al., 2003; Xianquan et al., 2005)

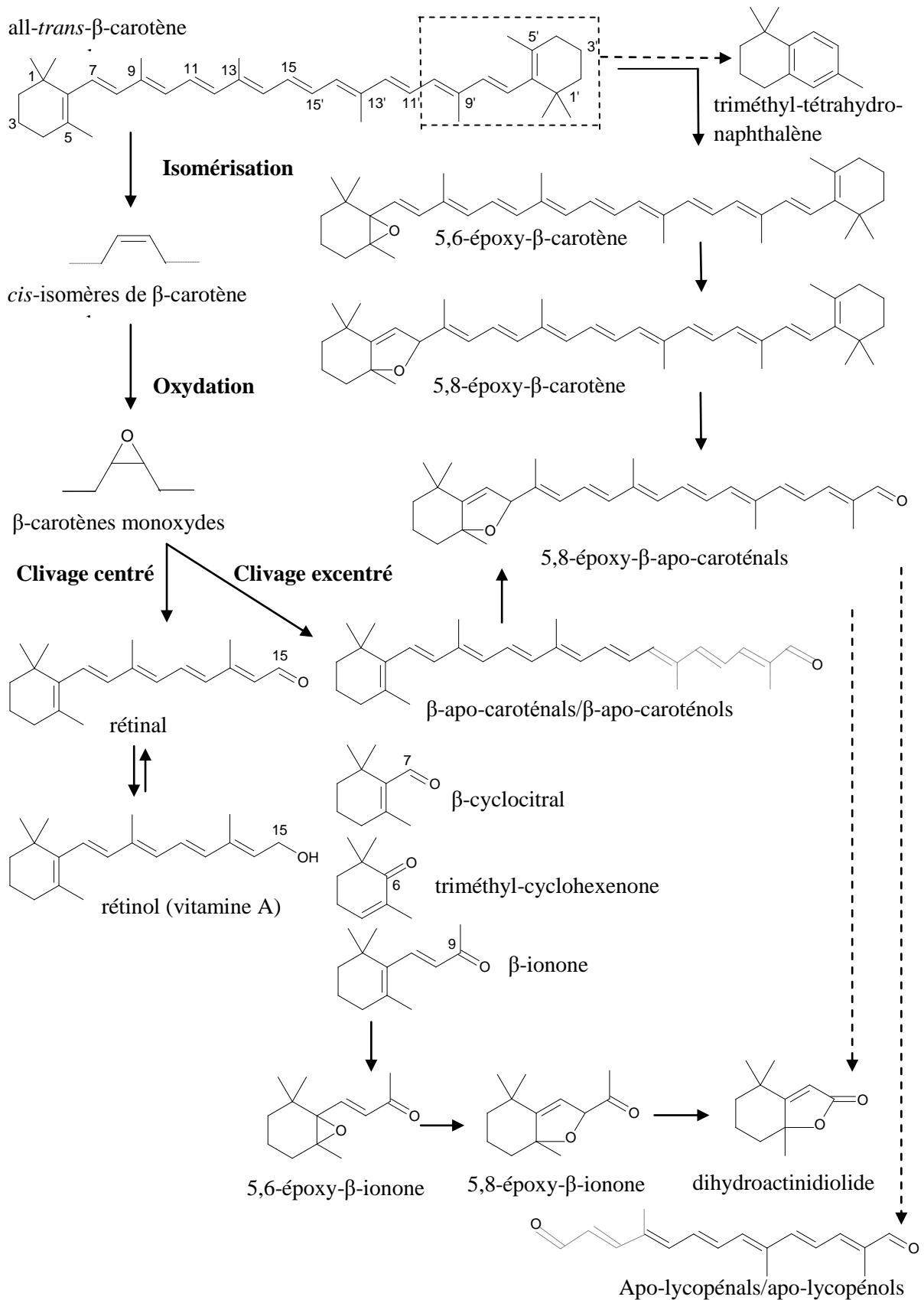


Figure 4 : Hypothèse du mécanisme d'isomérisation et de dégradation du β -carotène par oxydation (Sommerburg et al., 2003; Carail et al., 2006)

1.1.2.5 Biodisponibilité pour la santé

Dans le corps humain, le lycopène représente de 21 à 43% des caroténoïdes du plasma sanguin et peut être caroténoïde dominant (Stahl et al., 1996). Le taux de lycopène et de β -carotène dans le sérum et le plasma sanguin est en moyenne de 0,3 et 0,5 nmol/ml respectivement (Stahl et al., 1996). Pourtant, l'absorption des caroténoïdes est variable et dépendante de plusieurs facteurs comme le sexe, l'âge ou les besoins ponctuels du corps (Aoki et al., 1987; Ito et al., 1987; Forman et al., 1995; Järvinen 1995). D'autre part, la solubilité des caroténoïdes influence leur bio-activité dans le corps humain. Ils ne sont bien absorbés que dans l'intestin avec un peu de matière grasse (van-het-Hof et al., 2000).

Chez l'humain, l'absorption journalière de 5 à 10 mg de lycopène peut protéger les lipides et les protéines contre l'oxydation (Rao et al., 2002). Ce carotène est potentiellement un agent préventif contre certains carcinogènes des poumons (Kim et al., 2000), des seins (Simon et al., 2000), notamment de la prostate (Clinton et al., 1996; Rao et al., 1999; Norrish et al., 2000; Kucuk et al., 2002) et contre des maladies cardiovasculaires (Hadley et al., 2003).

D'autre part, le β -carotène converti en rétinol est la plus abondante source de vitamine A des aliments. La vitamine A joue un rôle important dans quelques fonctionnements du corps humain comme le système visuel, immunitaire et reproductifs (Clagett-Dame et al., 2002). Pourtant, seulement un tiers du β -carotène de l'alimentation est absorbé par l'intestin et la moitié de celui-ci est converti en rétinol (Minguez-Mosquera et al., 2002). D'autre part, β -carotène est aussi connu comme un composé anti-carcinogène potentiel (van Poppel et al., 1995).

1.1.2.6 Action antioxydante et prooxydante

D'après le dictionnaire de Larousse : « un antioxydant est une substance naturelle ou chimique capable de neutraliser, ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme ». La plupart des caroténoïdes ont une activité antioxydante grâce à leur structure chimique comportant une longue chaîne de polyène riche en électrons et des doubles liaisons conjuguées susceptibles d'être très réactive. Cet aspect chimique permet aux caroténoïdes de neutraliser l'oxygène singulier et des radicaux libres.

La comparaison des propriétés antioxydantes et biologiques entre lycopène et β -carotène est présentée dans le tableau 1. Le lycopène, avec une chaîne longue de onze doubles liaisons covalentes carbone-carbone conjuguées, est plus antioxydant que le β -

carotène qui a un β -cycle dans la molécule (Böhm et al., 2001). Quelques *cis*-isomères sont plus antioxydants que les *all-trans* (Levin et al., 1994; Böhm et al., 2001). Pourtant, la capacité antioxydante des caroténoïdes dépend de leur source synthétique ou naturelle et du milieu de réaction (Lavy et al., 1993; Park 1994; Miller et al., 1996; Yeh et al., 2000; Zhang et al., 2001; Palozza et al., 2003).

Tableau 1 : Propriétés chimiques et biochimiques du lycopène et du β -carotène (Stahl et al., 1996)

	Lycopène	β -Carotène
<i>Nombre de doubles liaisons conjuguées</i>	11	11
<i>Activité antioxydante</i>		
- Extinction de l'oxygène singlet K_q ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	17×10^9	13×10^9
- Capture (scavenging) des radicaux libres (Trolox équivalent)	2,9	1,9
- Réaction des radicaux d'anions de caroténoïde avec l' O_2 , k ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	2×10^8	25×10^8
<i>Activité biologique</i>		
- Induction de communication intracellulaire sur les cellules de fibroblaste (mesuré par micro-injection de la sonde fluorescente Lucifer Yellow)	++	++++
- Inhibition de la transformation carcinogène des cellules de l'embryon de fibroblaste du rat sous le traitement chimique	+	++++
- Suppression de la prolifération des cellules humaines cancéreuses de l'endomètre, de la glande mammaire et des poumons	++++	++
- Activité provitamine A	-	+++

Les caroténoïdes sont majoritairement antioxydants et c'est pourquoi, ils sont facilement isomérisés et dégradés. Après ces transformations, ils peuvent encore rester antioxydants, comme leurs produits à longue chaîne de clivage (Mueller et al., 2011), mais peuvent perdre cette propriété et devenir des prooxydants (Siems et al., 2002; Alija et al., 2004). Les propriétés antioxydantes ou prooxydantes des caroténoïdes sont dépendantes de leur concentration et de la condition d'oxydation. A partir de 5 μ M, le lycopène et le β -

carotène deviennent prooxydants et provoquent de graves dommages sur l'ADN dans les cellules d'adénocarcinome HT29 soumises à des ROS générés par l'enzyme xanthine/xanthine-oxydase (Lowe et al., 1999). Comme le lycopène et le β -carotène sont extrêmement lipophiles, ils peuvent réagir plus extensivement avec les radicaux libres liposolubles d'AMVN (2,2-azobis[2,4-diméthylvaléronitrile]) que ceux d'AAPH (dihydrochlorure de 2,2-azobis[2-amidinopropane]) et Fe/NTA (nitriolotriacétate ferrique), hydrosolubles (Yeh et al., 2000).

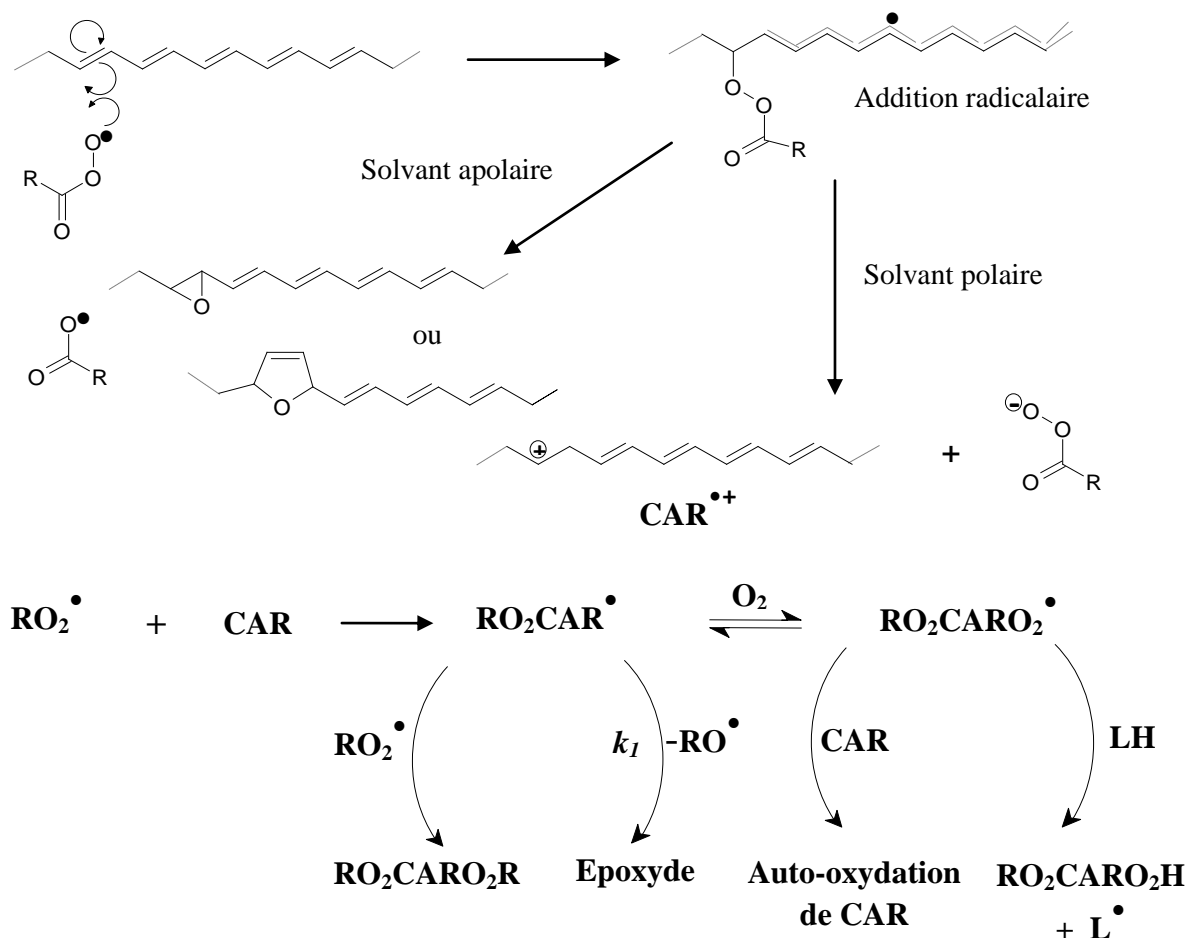


Figure 5 : Mécanisme potentiel de réaction entre les caroténoïdes et les radicaux libres en fonction de la polarité des solvants et de la concentration d'oxygène (Young et al., 2001; El-Agamey et al., 2004) ; R : groupe acyle, k_1 : constante de vitesse de la réaction, CAR^\bullet : radical de caroténoïde, CAR : caroténoïde, LH : lipide insaturé.

La première attaque des radicaux peroxydes envers les caroténoïdes est l'addition pour former un radical de peroxyde-caroténoïde (figure 5). Le produit de cette réaction dépend de la polarité du milieu : dans les milieux apolaires, il s'agira d'époxydes de caroténoïdes (produits d'oxydation), et dans un solvant polaire, on obtiendra un cation

radical de caroténoïde et un anion peroxyde (El-Agamey et al., 2004). La propriété antioxydante ou prooxydante des caroténoïdes est aussi dépendante de la concentration d'oxygène. A haute concentration d'oxygène, des caroténoïdes peuvent réagir avec l'oxygène pour produire certains radicaux peroxydes de caroténoïdes (autooxydation) prooxydants. D'autre part, les caroténoïdes peuvent faciliter la peroxydation des lipides insaturés. Dans un milieu à faible teneur en oxygène, les caroténoïdes réagissent comme des antioxydants « chain-breaking » qui capturent les radicaux peroxydes.

La duplicité de l'antioxydant et le prooxydant des caroténoïdes cause parfois des résultats inattendus lors de certaines études *in vivo*. L'alimentation complétementée de β -carotène n'a donné aucun effet de protection contre les maladies néoplasmes et cardiovasculaires (Hennekens et al., 1996). Certain données obtenues par deux études sur l'intervention du β -carotène supplémenté ont montré une augmentation du taux de cancer pulmonaire chez les fumeurs (Omenn et al., 1996; Arora et al., 2001). Après ces deux dernières études, il y avait une interruption des recherches sur cette propriété antioxydant du β -carotène. Plusieurs hypothèses ont été supposées pour expliquer ces résultats contradictoires. Parmi eux, la structure d'un antioxydant qui est modifié par la réaction de « scavenging » des radicaux libres peut exhiber les propriétés différentes. Par exemple, les produits de ce changement sont les composés amphiphiles (époxydes, volatiles) peuvent être les oxydants et exhiber la déstabilisation de la membrane cellulaire (Bouchard et al., 1996).

1.1.3 Sources naturelles de lycopène et β -carotène

Dans l'alimentation, de 70 à 90 % des lycopènes et β -carotènes proviennent des fruits et des végétaux (Yahia et al., 2009). On en trouve dans plusieurs fruits et plantes généralement de couleur rouge et orange. Ils peuvent être localisés dans divers types de tissus végétaux comme ceux des fruits (abricot, goyave, mangue,...), des légumes (tomate, potimarron,...), des racines (carotte), des feuilles (épinard), des fleurs (*Cucurbita pepo*) ou dans des cellules de micro-champignons (*Blakeslea trispora*). 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 de caroténoïdes (Cao-Hoang et al., 2009).

Les caroténoïdes existent dans certains fruits et végétaux sous la forme de molécules libres ou conjuguées en esters d'acide gras (Nhung et al., 2010). La plupart des caroténoïdes dans les aliments existent sous forme d'isomère all-*trans* (Yahia et al., 2009).

La proportion entre les isomères *all-trans* et *cis* dans la nature dépend de la variété et des conditions des procédés de transformation des fruits et des végétaux. Les molécules de lycopène *all-trans* représentent entre 79 et 91 % des lycopes dans les produits à base de tomate (Clinton et al., 1996) mais cette même proportion va de 92 à 95 % dans la pastèque rouge (Perkins-Veazie et al., 2001). Dans les carottes, connues comme source de provitamine A, il y a presque 100 % de β -carotène *all-trans* (Marx et al., 2003).

Il n'y a que quelques fruits et végétaux vraiment riche en lycopène et/ou β -carotène dans l'alimentation (tableau 2). Parmi eux, l'arille de *Momordica cochinchinensis* (gac) est le plus intéressant comme il présente l'une des teneurs en lycopène et β -carotène les plus élevées. La description détaillée de ce fruit sera présentée dans les parties suivantes.

Tableau 2 : Sources naturelles de lycopène et β -carotène (mg/kg PF)

Appellation	Nom scientifique	Lycopène	β -Carotène	Références
Gac (arille)	<i>Momordica cochinchinensis</i>	380-2227	110-718	Aoki et al. (2002), Ishida et al. (2004)
Carotte	<i>Daucus carota</i>		1-239	Mech-Nowak et al. (2012)
Potimarron	<i>Cucurbita moschata</i>		142-244	De Carvalho et al. (2012)
Huile de palme	<i>Raphia sese</i>		802,5	Hunter et al. (1946)
Melon amer (arille) (mg/kg PS)	<i>Momordica charantia</i>	411		Tran et al. (1999)
Tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>	94,9	5,1	Pinela et al. (2012)
Goyave	<i>Psidium guajava</i>	70	3,7	
Mangue	<i>Mangifera indica</i>	0,8	15,57	Oliveira et al. (2010)
Papaye	<i>Carica papaya</i>	31,4	5,5	
Pastèque	<i>Citrullus lanatus</i>	30-120		Perkins-Veazie et al. (2007)
"Bo ngot"	<i>Sauropus androgynus</i>		96,4	Fatimah et al. (2012)
Epinards	<i>Spinacia oleracea</i>		83,1	Kidmose et al. (2001)
Micro-champignon (mg/g PS)	<i>Blakeslea trispora</i>		85	Nanou et al. (2012)

1.1.4 Réglementation et marché pour le lycopène et le β -carotène en agro-alimentaire

Le marché des caroténoïdes est en pleine croissance. Ces composés sont utilisés dans certains compléments fonctionnels alimentaires, aussi bien pour les êtres humains que pour les animaux, dans des produits cosmétiques et également dans de nombreux colorants naturels destinés à l'agroalimentaire. Le lycopène et le β -carotène sont respectivement codés E 160d et E 160a par la Directive de l'Union Européenne pour les additifs alimentaires (89/398/CEE) qui a été complétée par un règlement ((CE) N° 1333/2008).

Sous le nom de pro-vitamine A, le β -carotène est plus utilisé que le lycopène en agro-alimentaire. Le β -carotène est autorisé dans l'Union Européenne depuis plus de 10 ans en tant qu'additif alimentaire (Aguilar et al., 2012). D'après BCC Research, on estime que l'utilisation du β -carotène comme colorant ou complément de santé alimentaire pourrait faire croître ce marché jusqu'à 261 million d'euros en 2018 (März 2011).

Le lycopène de tomate a été autorisé comme colorant agro-alimentaire aux Etats-Unis depuis 2005. A partir de l'année 2008, l'innocuité alimentaire du lycopène synthétique a été confirmée et le lycopène est autorisé en Europe comme complément alimentaire et en tant qu'additif ou colorant alimentaire (Aguilar et al., 2008). Cette autorisation ouvre de nombreuses portes à ce caroténoïde sur le marché international. Les Etats-Unis restent encore le marché le plus dynamique sur les produits à base de lycopène, avec 143 produits nouveaux depuis l'année 2003 sur 418 produits à base de lycopène sur le marché international (Heller 2009). Les produits à base de lycopène sont aussi développés dans certains pays tels que le Canada, le Japon, le Brésil, la France, l'Argentine, Taïwan, le Vietnam, le Royaume-Uni et les Pays-Bas (Heller 2009).

Malgré la confirmation des propriétés bioactives du lycopène et du β -carotène (Agostoni et al., 2011; USDA 2012), il y a encore certaines opinions contradictoires sur l'effet de ces carotènes d'origine naturelle sur la santé humaine. La réglementation sur le lycopène et le β -carotène est encore réévaluée pour encadrer leur utilisation en agro-alimentaire. Ces caroténoïdes sont classés parmi les micro-constituants non indispensables pour les êtres-humains. Toutefois, ils représentent des « candidats nutriments » importants en matière de nutrition préventive vis-à-vis de plusieurs pathologies, notamment les maladies cardio-vasculaires, les cancers, les pathologies associées au vieillissement. Sur l'étiquetage des produits, les apports nutritionnels journaliers recommandés (AJR) sont les valeurs uniques pour chaque nutriment, qui ne prennent pas en compte les différences liées à l'âge ou au sexe, contrairement aux apports nutritionnels conseillés (ANC). Jusqu'à

maintenant, il n'est pas possible de proposer ni des AJR ni des ANC pour ces micro-constituants pour des raisons multiples : (i) absence de démonstration de besoins et (ii) méconnaissance de leur biodisponibilité, de l'efficacité physiologique des apports et de marqueurs biologiques du statut en ces molécules (Ambroise 2001). Les doses proposées, 4,8 mg/jour pour le β -carotène (Le Grusse et al., 1993) et 15 mg pour du lycopène synthétique (Vassiliou 2009), sont empiriques et ne reposent pas sur des études d'effet-dose. Comme le β -carotène est une provitamine A, il y a des doses conseillées pour ce caroténoïde en liant avec les apports en vitamine A dans les compléments. Même si le β -carotène et le lycopène ont été cités comme « novel food » en Europe à partir de l'année 2004 pour leur provenance de sources végétales ou microbiennes, ceux provenant de *Momordica cochinchinensis* n'ont pas encore fait l'objet de demande. Actuellement, il manque beaucoup d'études scientifiques sur ce fruit pour l'intégrer dans le marché européen. Les allégations anti-cancer n'ont pas été accordées pour les compléments de lycopène et de β -carotène ni en Europe, ni aux Etats-Unis (Schneeman 2005; EurekaSanté 2014). Cela est encore dû à la méconnaissance de l'effet et du mode d'action de ces molécules et aux doutes concernant l'apport d'autres composés végétaux dans les effets positifs pour la santé observés dans les études. A ce propos, d'après l'afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments, désormais Anses) : « il est très probable que le lycopène participe à la prévention de maladies dégénératives, en complémentarité ou en synergie avec d'autres nutriments apportés par les fruits et les légumes ». C'est cette complémentarité/synergie qui n'est pas encore comprise.

1.2 LE FRUIT GAC

Parmi les végétaux riches en caroténoïdes, le fruit asiatique qui s'appelle « gac » au Vietnam est, dans son pays d'origine comme dans d'autres pays comme les Etats-Unis, un « super fruit » du paradis.

1.2.1 Généralités

D'un point de vue botanique, le gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng. ou *Muricia cochinchinensis* Spreng.) appartient à la famille des Cucurbitacées. Il est endémique du Sud-est de l'Asie, on le trouve dans l'Est de l'Inde, au Bangladesh, en Birmanie, en Thaïlande, au Laos, au Vietnam, en Malaisie, aux Philippines et au Sud de la Chine. Au Vietnam, ce fruit est majoritairement cultivé dans les villages du Nord et peut être distingué en trois variétés principales : le gac gluant, le gac ordinaire et le gac métissé.

Cette plante grimpante et dioïque (mâle et femelle) se multiplie grâce à ses graines ou par l'intermédiaire de boutures des racines. Ses fleurs et ses fruits se forment sous l'ombre de feuilles d'une quinzaine de centimètres. La plante peut vivre pendant 15 à 20 ans et sa culture ne demande pas beaucoup d'investissements. Pour la croissance des plantes rampantes, il faut palisser sur un support résistant en bois ou en fer pour que les branches s'étendent et que les fleurs et les fruits aient assez de place pour s'exposer à une lumière du soleil douce. Sous le climat du nord, la saison de floraison et de fructification tombe de juin à septembre et la récolte des fruits de septembre à décembre. La forme du gac est ovoïde, plus ou moins allongée et parfois presque ronde. Ses dimensions varient entre dix et vingt centimètres. Sa couleur change du vert à l'orange, puis au rouge dès maturation : c'est alors qu'il est le plus riche en caroténoïdes. Un fruit mûr peut peser entre 700 et 1600 g et peut faire jusqu'à 10 kg chez les fruits métissés.

Aujourd'hui, l'intérêt du gac n'est plus seulement connu des marchés locaux de pays comme le Vietnam, mais aussi dans le monde entier. Pour répondre aux demandes de tous les marchés, la culture de ce « super fruit » est actuellement élargie au Vietnam. La culture de gac est en croissance d'environ 100 % depuis quelques années pour servir à la fois les consommateurs vietnamiens (10 %) et l'exportation (90 %) (M. Do, 2013, communication personnelle).

1.2.2 Morphologie

Un fruit mûr possède une peau rouge-orange avec des piques, une chair jaune épaisse à l'intérieur qui protège des arilles rouges sanguins dans lesquels se développent des graines aplaties, dures et de couleur grise (figure 6). Selon nos études, ce fruit se compose en moyenne de 16 % de peau, de 52 % de chair, de 22 % d'arille et de 10 % de graine. Parmi ces différentes parties, l'arille qui n'a qu'un à trois millimètres d'épaisseur est la partie la plus intéressante par sa richesse en caroténoïdes, α -tocophérol (vitamine E), acides gras essentiels (Ishida et al., 2004; Vuong et al., 2006) et polyphénols (Kubola et al., 2011).

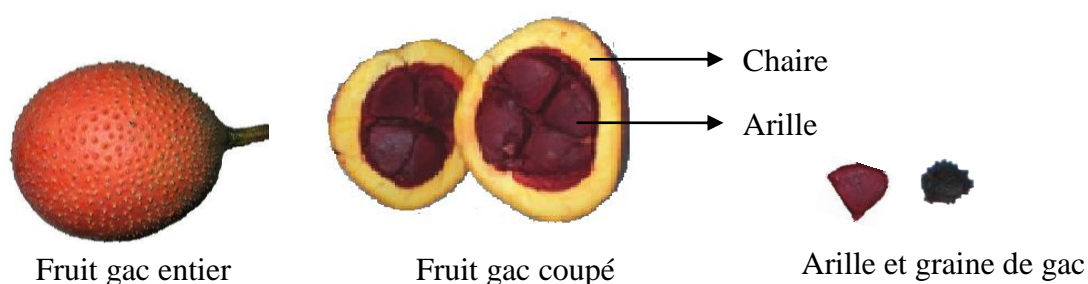


Figure 6 : Morphologie du fruit de gac

1.2.3 Caroténoïdes de l'arille de gac

Depuis la moitié du vingtième siècle, on sait qu'il existe une grande quantité de β -carotène et d'huiles essentielles dans l'enveloppe des graines du gac (arille de gac) (Guichard et al., 1941). D'après un journal vietnamien, en 1951, le professeur Nguyen Van Dan, en collaboration avec un laboratoire allemand, a découvert que ce fruit phytopharmaceutique est également riche en lycopène. Cinquante ans après, des chercheurs vietnamiens ont réussi à extraire de l'arille de gac une huile riche en caroténoïdes pour fabriquer des capsules de compléments fonctionnels qui aident à lutter contre des maladies des yeux, ainsi que de l'huile nutritive pour les enfants sous-alimentés. En outre, ils ont montré que l'huile de gac est aussi antioxydant comme complément à des traitements de radiations chez les rats (Ngan et al., 1993).

Aujourd'hui, la teneur en caroténoïdes dans ce fruit est confirmée par des études dans le monde entier mais leurs résultats sont très variables. Globalement, on a montré que l'arille de gac contient une quantité de β -carotène 10 fois supérieure à celle de la carotte, et une quantité de lycopène de 10 à 70 fois supérieure à celle des autres végétaux (Aoki et al., 2002; Ishida et al., 2004). De plus, on a aussi trouvé de la zéaxanthine (2 $\mu\text{g/g}$ PF) et de la β -cryptoxanthine (4 $\mu\text{g/g}$ PF) dans la chair jaune de gac (Aoki et al., 2002). Plus tard, des

études conduites aux Etats-Unis ont montré que l'arille de gac contenait 2227 $\mu\text{g/g}$ PF de lycopène et 718 $\mu\text{g/g}$ PF de β -carotène (Ishida et al., 2004) (tableau 3). Ces chiffres présentent des variations par rapport aux résultats de (Vuong et al., 2006) qui peuvent provenir de différences de variétés ou de maturation, d'une perte de qualité des matières premières pendant le stockage, ou de techniques d'analyse différentes. Récemment, Nhung et al. (2010) ont reporté que l'arille de Gac contenait environ 3000 $\mu\text{g/g}$ PF de lycopène et 300 $\mu\text{g/g}$ PF de β -carotène en moyenne et que le pressage de l'huile pouvait permettre d'extraire de 2436 à 2592 $\mu\text{g/g}$ PF de carotènes au total.

Tableau 3 : Caroténoïdes ($\mu\text{g/g}$ PF) de l'arille de gac (lycopène, β -carotène)

Références	Lycopène	β -carotène	Total
Aoki et al. (2002)	101	380	481
Ishida et al. (2004)	2227	718	3052
Vuong et al. (2006)	408	83	497
Nhung et al. (2010)	2378–3728	257–379	

1.2.4 Huile de l'arille de gac

L'arille de gac est intéressant par sa grande teneur en caroténoïdes mais aussi en acides gras, particulièrement mono- et poly-insaturés. Au total, les acides gras représentent, selon les études, environ 10 % (Vuong et al., 2002) à 22 % (Ishida et al., 2004) de la masse de l'arille de gac. La présence des acides gras dans l'arille de gac joue un rôle important dans l'absorption des caroténoïdes et des autres nutriments liposolubles (Vuong et al., 2002; Brown et al., 2004; Kuhnlein 2004; Kha et al., 2013).

D'après Vuong (2000), 70 % des acides gras de l'arille de gac sont insaturés et 50 % de ces acides gras insaturés sont polyinsaturés. Plus précisément, l'arille de gac possède une teneur de 34,1 % en acide oléique (C18 : 1), de 31,4 % en acide linoléique (C18 : 2), de 7,1 % en acide stéarique (C18 : 0) et de 2,1 % en α -linoléique (C18 : 3) (Vuong et al., 2002; Ishida et al., 2004). Il s'agit d'acides gras que l'on trouve dans d'autres huiles comestibles (tableau 4). Parmi eux, l' α -linoléique ou oméga-3 est un des acides gras essentiels à la prévention des crises cardiaques (Lavie et al., 2009; DeFilippis et al., 2010; Sharma et al., 2013). L'acide stéarique est un acide gras saturé qui peut remplacer des acides gras *trans* dans l'alimentation (Kris-Etherton et al., 2005). L'effet des acides gras insaturés α -linoléique (ω -6) et oléique (ω -9) sur la santé doit être encore évalué. Pourtant,

en comparaison avec l'huile de palme et l'huile d'olive, l'huile de gac contient une quantité importante d'acides gras saturés palmitique (22,2 %) qui peuvent avoir un effet négatif sur le taux de cholestérol total et de cholestérol LDL (mauvais cholestérol). Sa consommation peut donc augmenter le risque de maladies cardiovasculaires (Fattore et al., 2013).

Tableau 4 : Composition en acides gras de l'huile de l'arille de gac en comparaison avec les autres huiles comestibles (% des acides gras totaux) (Vuong et al., 2002; Mailer 2006; Dauqan et al., 2011)

Acides gras	Abréviation	Huile de gac	Huile de palme	Huile d'olive extra-vierge
palmitique	C16:0	22,2	42,5	13,8
stéarique	C18:0	7,7	0,4	2,8
oléique	C18:1 ω 9	32,3	44,6	69
linoléique	C18:2 ω 6	28,1	10,4	12,3
linoléénique	C18:3 ω 3	2,14	<1	< 1
poly insaturés total		35	11	13
mono insaturés total		35	45	70
saturés total		30	44	17

1.2.5 Procédé d'extraction des caroténoïdes de l'arille de gac

A côté de ses propriétés nutritives, l'huile de gac est aussi une bonne matière pour extraire des caroténoïdes de l'arille de gac sans utiliser de solvants. L'extraction de l'huile contenant des caroténoïdes est réalisée avec des méthodes conventionnelles depuis longtemps. A ce jour, l'optimisation du rendement d'extraction de ces méthodes est encore à l'étude.

L'extraction de l'huile de gac riche en caroténoïdes a été brevetée en 2004 comme procédé n'utilisant pas de solvants toxiques (Vuong 2004). Dans ce procédé, les arilles de gac sont séchés avant d'être pressés pour extraire l'huile. Toutes les étapes sont réalisées dans l'obscurité et à une température inférieure à 60°C. Pour enlever l'enveloppe des graines, les arilles peuvent être partiellement séchés par un traitement thermique ou traités par des enzymes (Tran et al., 2008). Pour améliorer le rendement de l'extraction, quelques méthodes d'extraction assistée ont été récemment étudiées. L'assistance aux micro-ondes

avec une puissance de 650 W pendant le séchage des arilles et le traitement à la vapeur ont diminué le temps de séchage et augmenté le rendement d'extraction (Kha et al., 2013). Pourtant, la température appliquée à l'arille de gac et le changement de qualité des caroténoïdes durant l'extraction n'ont pas été étudiés lors de ces études.

Les caroténoïdes de l'arille de gac peuvent être utilisés directement sous forme d'huile extraite ou de poudre d'arille brut. Dans le cadre de travaux de laboratoires, ces caroténoïdes ont aussi été extraits à l'aide de solvants pour analyses. L'hexane, l'éther de pétrole ou un mixte de chloroforme et méthanol (2 : 1) ont été utilisés comme solvants pour extraire les lycopène et β -carotène de l'arille de gac en combinaison avec les méthodes de séchage (Kubola et al., 2013). L'extraction des caroténoïdes des végétaux à l'aide de solvant peut être efficace et plus rapide que l'extraction sans solvant. Néanmoins, les solvants doivent être éliminés jusqu'à 60 mg/kg de l'extrait final ou 25 mg/kg du produit transformé pour que ces caroténoïdes soient utilisés en agroalimentaire (Chipman 1991).

Actuellement, les procédés de transformation pour le fruit de gac sont encore limités et surtout pour l'arille de gac même si plusieurs procédé sont à l'étude dans les entreprises du domaine (Mr Bourdier et Do, communication personnelle). D'après la figure 7, les transformations potentielles pour l'arille de gac s'arrêtent au séchage pour faire de la poudre de gac brut ou à l'extraction de l'huile de gac pour faire des capsules d'huile brute avec les techniques conventionnelles qui causent certains problèmes sur la qualité et la stabilité des caroténoïdes du produit.

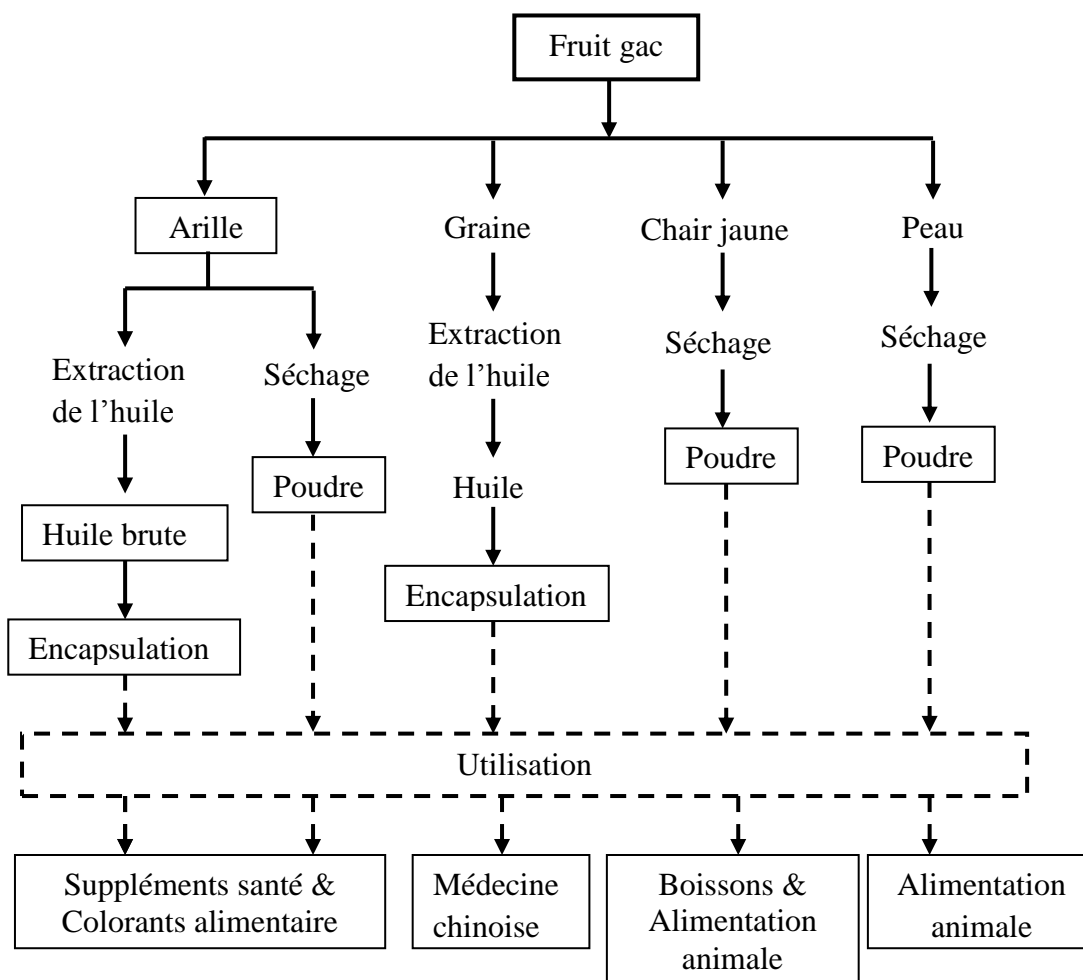


Figure 7 : Schéma des procédés potentiels et utilisation des produits de gac (adapté de Kha et al. (2013))

1.2.6 Stabilité des caroténoïdes de l'arille de gac

La plupart des caroténoïdes de l'arille de gac sont des lycopènes et des β -carotènes qui sont sensibles à la température, à la lumière, à l'humidité et à l'oxygène. Ils ne sont pas stables ni pendant le stockage du fruit frais, ni dans la plupart des produits à base de ce fruit. Nhung et al. (2010) ont étudié la stabilité de ces caroténoïdes dans le fruit frais selon le stade de mûrissement et dans l'huile de gac. Le lycopène et le β -carotène peuvent être dégradés par l'activité des enzymes du fruit de gac qui sont libérées au cours du mûrissement. La dégradation de ces caroténoïdes dans les fruits mûrs est neuf fois plus rapide que dans l'huile à température ambiante. Sous l'activité des enzymes végétales, le lycopène est dégradé de deux à trois fois plus rapidement que le β -carotène. C'est pourquoi il vaut mieux que le fruit soit choisi pour l'extraction quand il vient d'arriver à la maturité (la chair n'est pas encore molle) pour un meilleur rendement des caroténoïdes de l'arille de gac.

D'autre part, le lycopène et le β -carotène peuvent être perdus pendant des procédés d'extraction conventionnels. Avant le pressage de l'huile, le séchage de l'arille de gac avec de l'air chaud ou sec ou le séchage par irradiation peuvent dégrader ces caroténoïdes (Shi et al., 1999; Kha et al., 2013; Kubola et al., 2013). Pour augmenter le rendement de l'extraction et protéger les caroténoïdes contre les oxydants, un prétraitement tel que le blanchiment, l'ajout d'antioxydants (vitamine C, bisulfite) (Kha 2010) ou la protection des fruits en les recouvrant de lumière et de courant d'air (Vuong 2004) peuvent être nécessaires. Les caroténoïdes sont mieux protégés sous vide, sous atmosphère d'azote ou à température basse pendant l'extraction (Kha 2010; Nhung et al., 2010). Après l'extraction, les caroténoïdes dans les produits de gac peuvent aussi être perdus pendant le stockage à cause de la température, la lumière et de la présence d'oxydants. Les lycopènes et β -carotènes de l'huile de gac sont rapidement dégradés pendant le traitement à 45°C et 60°C (Nhung et al., 2010). Jusqu'à présent, les produits à base d'huile de gac riche en caroténoïdes peuvent être stabilisés par l'encapsulation (cyclodextrine) (Kha et al., 2013) ou par l'ajout d'un autre antioxydant (vitamine E) dans l'huile de gac nutritive pour les enfants. Le tableau 5 récapitule certains facteurs négatifs et positifs pour la stabilité des caroténoïdes de l'arille de gac.

Tableau 5 : Récapitulation des conditions de déstabilisation et stabilisation des caroténoïdes de l'arille de gac

Facteurs	Conditions de déstabilisation	Solution
d'oxydation		
<i>Température</i>	- Séchage et extraction T > 60°C - Stockage T > 4°C	- Séchage et extraction T < 60°C, lyophilisation, assistance - Stockage T < 4°C
<i>Oxygène</i>	- Séchage de l'arille sans couvert, par l'air sec - Stockage en conditions ambiantes	- Séchage avec couverture, sous vide, atmosphère d'azote, ajout d'antioxydant - Stockage sous vide, ajout d'antioxydant
<i>Lumière</i>	- Séchage sans couvrir, irradiation - Stockage sans couvrir, contact avec la lumière	- Séchage dans l'obscurité - Stockage dans l'obscurité
<i>Enzyme</i>	- Mûrissement du fruit	- Blanchiment, contrôle de maturation des fruits

1.3 TECHNIQUES D'EXTRACTION ET STABILITE DES CAROTENOÏDES EXTRAITS

Les substances naturelles peuvent être extraites par plusieurs techniques différentes que nous avons classées dans deux catégories : l'extraction mécanique sans solvant (pressage, hydro-distillation) et l'extraction à l'aide de solvants, avec ou sans assistance. Les substances peuvent être extraites à partir d'un milieu solide ou liquide. La plupart des méthodes d'extraction efficaces pour les substances naturelles des tissus végétaux sont des méthodes d'extraction aux solvants.

1.3.1 Méthode d'extraction aux solvants

L'extraction par solvant consiste à séparer les constituants d'un mélange à l'aide d'un solvant qui s'évapore facilement. La séparation des substances du mélange est basée sur la différence de leur affinité pour le solvant utilisé et du gradient de concentration. Le mélange peut être solide ou liquide et le solvant liquide ou fluide supercritique. Dans notre travail, nous nous intéressons aux procédés d'extraction à partir d'un système solide, l'arille d'un fruit.

Il existe plusieurs techniques d'extraction qui sont dites conventionnelles comme l'entraînement à la vapeur (hydro-distillation), l'extraction par Soxhlet ou la macération. Des extractions que l'on appellera technologiques viennent compléter les possibilités en proposant de faciliter la sorption du solide par le solvant en réalisant de l'extraction assistée (par micro-ondes, sonication, champs électrique pulsés, enzymes). L'extraction accélérée à l'aide de solvant est de réaliser l'extraction avec des solvants aux propriétés particulières comme les fluides supercritiques ou les liquides ioniques (Azmir et al., 2013). Par rapport à la plupart des extractions technologiques, les méthodes classiques sont généralement plus simples, utilisent un équipement moins coûteux mais sont moins écologiques, moins puissantes et plus destructives pour les substances sensibles. La comparaison de leurs avantages et inconvénients est récapitulée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Présentation des principales techniques, conventionnelles et technologiques, d'extraction de molécules actives avec leur principe, avantages et inconvénients

Méthode d'extraction	Matériels et principe	Avantages	Inconvénients
<i>Soxhlet</i> (Baharin et al., 2001; Azmir et al., 2013)	-Extracteur Soxhlet -Contact entre le solide et le solvant distillé et condensé (être utilisable pour plusieurs cycles)	-Simple -Pas besoin de filtration ou centrifugation	-Température haute -Petite quantité -Durée longue -Sélectivité du solvant limitée
<i>Assistée par ultrasons</i> (Chemat et al., 2008; Konwarh et al., 2012)	-Bain à ultrasons ou sonde ultrasonore combinée à un agitateur -Pénétration du solvant dans les cellules par effet mécanique des ultrasons sur le solide	-Simple, efficace -Peu coûteux -Rendement élevé -Temps réduit -Température basse	-Mise au point plus complexe
<i>Assistée par microondes</i> (Kaufmann et al., 2002; Pasquet et al., 2011)	-Four micro-ondes -Le solide est déstructuré par l'énergie de micro-ondes (la conduction ionique et la rotation dipolaire)	-Simple -Utilisant moins de solvant -Peu coûteux -Rendement élevé -Temps réduit	-Température haute -Rendement faible pour les solutés ou les solvants apolaires
<i>Prétraitement par des champs électriques pulsés</i> (CEP) (Savova et al., 2008)	-Champ électrique -Compression et amincissement de la membrane par accumulation de charges de signe opposé	-Temps et énergie réduits -Température basse	-Système complexe -Plus coûteux
<i>Prétraitement par enzyme</i> (Sharma et al., 2002; Puri et al., 2012)	-Incubateur pour l'activité de l'enzyme -Déstructuration des tissus végétaux par l'activité spécifique de l'enzyme	-Rendement élevé -Ecologique	-Conditions complexes pour l'activité enzymatique -Produit mélangé
<i>Avec des liquides ioniques</i> (Jiao et al., 2013)	-Solvants ioniques -Interaction du solide avec les cations et anions très flexibles du solvant	-Solvant « vert »*, polyvalent -Rendement élevé -Temps réduit	-Prix du solvant moins compétitif -Produit complexe -Solvant non distillable, difficile à recycler
<i>Avec des fluides supercritiques</i> (Rozzi et al., 2002; Wei et al., 2005)	-Pompe puissante, matériels résistants à la haute pression -Solubilisation des composés extraits par les fluides supercritiques qui retournent à l'état gazeux et s'évaporent lorsque la pression est relâchée	-Solvant vert, non toxique, inertie chimique (pour CO ₂ et H ₂ O) -Produit propre -Rendement élevé -Temps réduit -Sélectivité élevée	-Système complexe -Plus coûteux -Mise au point difficile

* Le solvant est généralement considéré comme « vert » car il n'est pas volatil et non-inflammable. Les liquides ioniques sont pourtant toxiques si ingérés ou libérés dans l'environnement.

L'utilisation des techniques d'extraction aux solvants dépend aussi de la nature de la matrice végétale et des composés extraits. L'entraînement à la vapeur (hydrodistillation) est une technique largement utilisée pour l'extraction des huiles essentielles (Carnat et al., 1998). Le Soxhlet est une méthode classique pour l'extraction solide-liquide mais elle est limitée par le risque de thermodestruction pour les composés thermolabiles de la matière végétale. Les caroténoïdes sont hydrophobes et facilement détruits durant les procédés d'extraction classiques. L'extraction des caroténoïdes doit être effectuée rapidement par une méthode avec un solvant convenable, en évitant l'exposition à la lumière, à l'oxygène, à la haute température (supérieure à 40°C) et aux métaux prooxydants tels que le fer ou le cuivre afin de minimiser l'auto-oxydation et l'isomérisation *cis-trans* (Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2006).

1.3.2 Thermo-instabilité des caroténoïdes durant l'extraction conventionnelle

Les méthodes dites conventionnelles d'extraction des caroténoïdes des végétaux nécessitent souvent un traitement thermique avant ou pendant l'extraction. Cette étape sert à déstructurer les tissus végétaux, détruire les enzymes afin d'augmenter le rendement d'extraction et protéger les caroténoïdes contre l'auto-oxydation enzymatique. En revanche, le traitement thermique cause parfois la perte de caroténoïdes pendant l'extraction ou le stockage. Fauzi et al. (2011) ont étudié la stabilité du β -carotène de l'huile de palme extrait avec assistance par stérilisation. Un temps de chauffage plus long augmente le rendement d'extraction, mais pendant le stockage, la perte de β -carotène rapportée est de 10 % de plus qu'avec une extraction sans chauffage. La dégradation de l'huile produisant des oxydants pendant la stérilisation peut être une cause de cette perte de β -carotène. Les procédures d'extraction et clarification de l'huile de palme par traitement thermique peuvent causer l'isomérisation ou la dégradation des caroténoïdes de cette huile. Par exemple, le rendement d'extraction du β -carotène de l'huile de palme par solvant à l'aide de l'extracteur Soxhlet, à environ 65°C sur une longue durée (plus de 4 heures), a diminué environ 40 % à cause de la dégradation du β -carotène (Baharin et al., 1998; Baharin et al., 2001).

Durant l'extraction du lycopène des tomates, le traitement thermique est aussi nécessaire pour augmenter le rendement d'extraction. En revanche, la dégradation des tissus de tomate par traitement thermique cause une perte de 9 à 28 % du lycopène total par rapport à la matière première brute (Nguyen et al., 1998; Takeoka et al., 2001). Le séchage des moitiés de tomates à 80°C ne dégrade pas le lycopène de tomates mais la dégradation

peut atteindre 12 % avec un traitement à 110°C (Zanoni et al., 1998). L'atomisation de la pulpe de tomate avec un courant d'air à haute température dégrade également de 8 à 21 % du lycopène (Goula et al., 2005).

Pour résoudre les problèmes liés aux méthodes d'extraction classiques sur la qualité des composés bioactifs à haute sensibilité, la température doit être contrôlée pour rester en dessous de la température destructive de ces composés. Pour optimiser le rendement d'extraction aux solvants, le choix d'un solvant à bonne affinité pour le soluté à extraire est évidemment important (Handa 2008).

1.3.3 Introduction aux solvants

Dans l'agro-alimentaire et la pharmacie, les solvants sont souvent utilisés, en particulier pour l'extraction industrielle des composés actifs apolaires. Pourtant, la présence de résidus de solvants dans les produits peut parfois influencer sur la santé des consommateurs. Ainsi, l'utilisation des solvants dans l'industrie alimentaire ne doit pas être abusive pour garder les produits sains et de bonne qualité.

1.3.3.1 Classement des solvants

Un solvant est une substance, liquide à sa température d'utilisation, qui a la propriété de dissoudre d'autres substances. Aujourd'hui, les solvants sont utilisés dans de nombreuses industries telles que l'industrie pharmaceutique, l'industrie alimentaire, la fabrication d'adhésif, d'encre, de peinture et d'enrobage. En général, les solvants sont divisés en deux grandes familles (Turfboer et al., 1997) : solvant hydrocarboné ou organique (SHC) et solvant oxygéné ou chimique (SC). La majorité des SHC est produite par distillation, qui permet de fractionner des huiles brutes déjà très bien raffinées, et ils sont apolaires. Par exemple : l'hexane, le chloroforme, le benzène. Les solvants SC, qui ne contiennent qu'un ou deux atomes d'oxygène additionnés aux atomes d'hydrogène et de carbone, sont plutôt polaires. On y compte les alcools, les cétones, les esters et l'éther glycol. Récemment, d'autres liquides tels que les liquides ioniques (sels) ou le CO₂ supercritique ont aussi été utilisés comme solvant dans des techniques d'extraction nouvelles.

1.3.3.2 Les solvants dans l'industrie alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les solvants utilisés doivent respecter des spécifications comme par exemple celles du JECFA (Joint Experts Committee on Food Additives) ou de

la FDA (Food and Drug Administration). Ils sont considérés comme des auxiliaires technologiques et dépendent donc en Europe des réglementations nationales (pour la France : Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires, Titre II Article 5). De plus, ces solvants doivent répondre aux exigences techniques et économiques des procédés de l'industrie.

Les critères techniques des solvants incluent leurs propriétés physiques et leur degré d'impureté, surtout leur température d'ébullition et la présence de résidus non-volatile. Un bon solvant doit avoir une quantité de composants non-volatiles inférieure à 0,01 mg/ml et une quantité d'arsenic, de plomb et de métaux lourds inférieure à 0,5 mg/kg. Pour l'extraction des composés hydrophobes, les solvants organiques sont souvent utilisés dans l'industrie malgré certains inconvénients. L'hexane est le solvant organique le plus souvent utilisé dans l'extraction des composés hydrophobes dans l'industrie alimentaire (Turfoer et al., 1997; Vian et al., 2011). Le problème majeur de l'utilisation des solvants organiques reste leur élimination étant donnée leur toxicité vis-à-vis de l'environnement et du consommateur. Pour les remplacer dans l'industrie alimentaire, on peut faire appel aux agro-solvants qui sont renouvelables, obtenus par fermentation ou synthèse, selon les principes de la chimie verte (Vian et al., 2011). Néanmoins, en comparaison avec les solvants classiques, la production des agro-solvants, avec leurs atouts pour l'environnement, est limitée par la disponibilité des matières premières naturelles. Parmi les agro-solvants du tableau 7, les terpènes, solvants de substitution potentielle à l'hexane, sont produits par de nombreuses plantes comme les conifères, les oranges, les micro-organismes. Cependant, comme la majorité des produits naturels, ce sont des composés très complexes qui sont produits en très petites quantités. La synthèse chimique des terpènes existe mais est très coûteuse et reste peu efficace car elle ne peut pas produire des terpènes purs.

Actuellement, le fluide CO₂ supercritique est connu comme un solvant innovant pour extraire les composés lipophiles qui peut apporter des solutions aux problèmes que posent les méthodes conventionnelles. Mais les inconvénients majeurs de cette technique concernent surtout l'aspect économique, car ces procédés sont considérés comme plus coûteux en investissement et en installation que les procédés d'extraction classiques (Wang et al., 2006). De plus, cette méthode exige une maîtrise complexe des paramètres techniques de pression et de température pendant les différentes étapes de l'extraction (extraction, séparation et recyclage du solvant).

Tableau 7 : Récapitulation des propriétés, avantages et inconvénients des agro-solvants et solvants utilisés en agro-alimentaire (Vian et al., 2011)

	Techniques d'extraction (application)	Polarité du solvant			Sécurité & santé	Coût	Impact (*)
		P	PP	AP			
Sans solvant	Hydro-diffusion par micro-ondes et gravité (<i>extraction d'huiles essentielles</i>)				+++	+	+++
	Entraînement à la vapeur d'eau (<i>extraction d'huiles essentielles</i>)	++	+		+	++	+
Eau	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>)	-	+	+++	-	-	++
Agro-solvants	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 organiques	Hexane (<i>extraction de matières grasses et huiles</i>)	-	+	+++	---	++	---

(*Impact environnemental, P: Polaire, PP: Peu polaire, AP: Apolaire)

En conclusion, les solvants écologiques ne sont pas encore beaucoup utilisés dans l'industrie alimentaire à grande échelle, mais on cherche à optimiser la technique extractive pour réduire l'utilisation des solvants organiques, les éliminer des produits et les récupérer par évaporation. Malgré tous ces travaux et la sensibilisation du public pour les questions de santé et environnement, l'hexane reste le solvant utilisé pour les huiles et les composés apolaires.

1.4 CONCLUSION ET ORIENTATION DE L'ETUDE

Au terme de cette étude bibliographique concernant les caroténoïdes d'origine naturelle, on constate que les lycopènes et les β -carotènes sont des antioxydants intéressants mais naturellement sensibles à l'oxydation et aussi à la température, aux enzymes, à l'humidité et à la lumière. C'est pourquoi, ils sont facilement détruits par les méthodes d'extraction classiques. Les produits de la déstabilisation de ces caroténoïdes peuvent expliquer certains résultats contradictoires sur leur activité antioxydante (ou prooxydante) de tests *in vitro* et *in vivo*.

Ces caroténoïdes sont présents dans le gac (*Momordica cochinchinensis*) qui est une source attractive de lycopènes et de β -carotènes. Dans ce fruit, les caroténoïdes sont localisés dans une partie rouge pâteuse et riche en huile. Comme ils sont lipophiles, ils sont souvent extraits soit avec de l'huile par pressage hydro-thermique, soit par une méthode classique aux solvants. Ces techniques causent souvent la perte de caroténoïdes pendant l'extraction et leur instabilité pendant le stockage. Il n'existe pas d'étude publiée sur l'extraction au solvant et la séparation des lycopènes et des β -carotènes de l'huile de gac.

Certaines techniques et solvants innovants ont récemment été utilisés pour effectuer l'extraction solide-liquide de substances actives végétales. Pourtant, chaque technique ou solvant a ses inconvénients dans l'optique d'une extraction de lycopène et β -carotène des végétaux à l'échelle industrielle permettant de conserver leurs qualités.

Dans ce travail, nous avons choisi l'arille de gac comme meilleure matière première riche en huile et en caroténoïdes pour étudier un procédé d'extraction de lycopènes et de β -carotène doux et efficace, en réduisant l'utilisation de solvant organique. Une fois extraits, ces caroténoïdes sont analysés pour déterminer leur qualité, leur stabilité et leurs propriétés antioxydantes.

METHODOLOGIE

Afin d'éviter toute redondance avec les matériels et méthodes des articles figurant dans la partie résultats, seuls les rappels des principes de la méthodologie de la thèse seront présentés ici, renvoyant aux articles pour plus de détails sur les matériels utilisés, les paramètres d'analyses, etc.

2.1 MATIERES PREMIERES

Les fruits de gac utilisés dans le cadre de cette thèse sont de la variété gluante, caractérisée notamment par une grande taille, un plus grand nombre de graines que ceux des autres variétés (figure 8). Quand ils mûrissent, ils prennent une belle couleur rouge. La chair est de couleur jaune orangée, l'enveloppe des graines est épaisse de couleur rouge foncée. Cette variété de gac donne des fruits plus riches en caroténoïdes que les autres variétés. Ils ont été achetés au marché à Hanoï à la saison (en décembre) et transportés en France en avion dans des cartons. Au laboratoire, les arilles ont été enlevés et stockés au congélateur (-20°C) pour servir à nos expériences.



Figure 8 : Fruits de gac gluants utilisés dans le cadre de cette thèse (fruits provenant du Vietnam)

2.2 CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DES CAROTENOÏDES

2.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie est une méthode physique de séparation de mélanges en leurs constituants. Elle est basée sur les différences d'affinité des substances à l'égard de deux phases, l'une stationnaire ou fixe, l'autre mobile. La chromatographie sur couche mince (CCM) est effectuée entre une phase stationnaire solide fixée sur la plaque et une phase

mobile liquide (éluant) qui est un solvant ou un mélange de solvant (figure 9). Dans notre étude, pour séparer les caroténoïdes proches, les molécules hydrophobes, de l'extrait, l'utilisation de plusieurs solvants à polarité faible ont été mise au point. Le solvant utilisé dépend aussi de la phase stationnaire. Par exemple, l'éther de pétrole a été utilisé pour séparer les isomères du lycopène et du β -carotène sur la plaque verre de gel de silice; un mélange de l'éther de pétrole avec benzène et acétone à proportion différente accélère la séparation de leurs isomères sur les plaques Silica Gel 60, Merck, Allemagne.

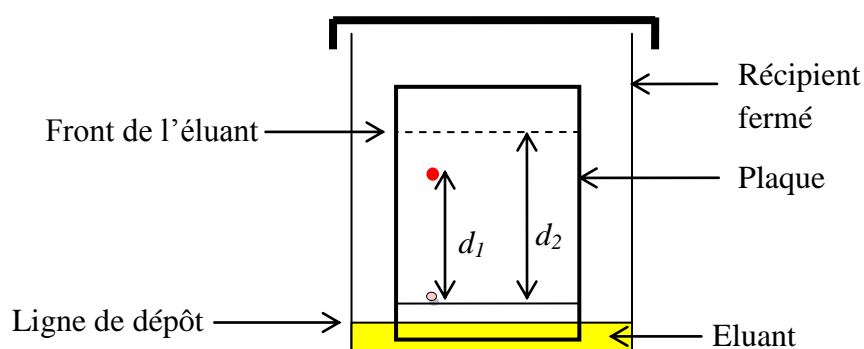


Figure 9 : Les composants de la chromatographie à couche mince

Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f) : $R_f = d_1 / d_2$

Chaque tache correspond à un constituant et que l'on identifie par comparaison avec le R_f d'un témoin.

2.2.2 Spectrométrie UV-visible

Afin de qualifier les caroténoïdes, la spectrométrie ultraviolet-visible est une méthode conventionnelle utilisée dans les études (Tan et al., 1989). Elle est l'étude expérimentale du spectre mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200 nm – 400 nm) et du visible (400 nm – 750 nm). Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transitions électroniques. La spectrométrie UV-visible est une méthode souvent utilisée pour l'étude quantitative des solutions de composés organiques présentant les doubles liaisons conjuguées en utilisant la Loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

A : l'absorbance ou densité optique à une longueur d'onde λ donnée

ϵ : le coefficient d'extinction, en l/mol.cm ou en % masse ($E^{1\%}_{cm}$) d'absorbance d'une solution d'1 g/100 ml)

l : la longueur du trajet optique dans la solution traversée, correspondant à l'épaisseur de la cuvette utilisée (1 cm)

C : La concentration molaire de la solution (en mol/l)

La concentration des caroténoïdes 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 :

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

$$\text{Ou } C \text{ (mg/l)} = 10000 \times A / E^{1\%}_{cm}$$

Avec $l = 1 \text{ cm}$, les coefficients d'extinction ($E^{1\%}_{cm}$) pour le lycopène et le β -carotène, correspondant à l'absorbance maximale (pic) à une longueur d'onde (λ_{max}) sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Paramètres de spectrométrie du lycopène et du β -carotène. Valeurs obtenues dans l'hexane (cf. Annexe fiche Sigma) et l'éther de pétrole (références dans le tableau).

Caroténoïdes	Lycopène	β -Carotène
λ_{max} du pic	472	450
$E^{1\%}_{cm}$	3450	2590
Référence	Budavari et al. (1996), Rodriguez-Amaya et al. (2004)	Rodriguez-Amaya et al. (2004)

L'isomérisation des caroténoïdes peut aussi être étudiée à partir de leur spectre, à travers le ratio % A_B/A_{II} qui correspond au rapport de la hauteur du pic *cis*, désigné par A_B , sur celle du pic principal au milieu, désigné par A_{II} , exprimé en pourcentage. La structure fine qui se rapporte à l'organisation supramoléculaire des caroténoïdes peut, quant à elle, être déterminée par le ratio % III/II qui correspond au rapport de la hauteur du pic de longueur d'onde la plus élevée (A_{III}), désigné par III, sur celle du pic au milieu (A_{II}), désigné par II, par rapport à la vallée (A_v) entre ces deux pics, comme illustrés sur la figure 10.

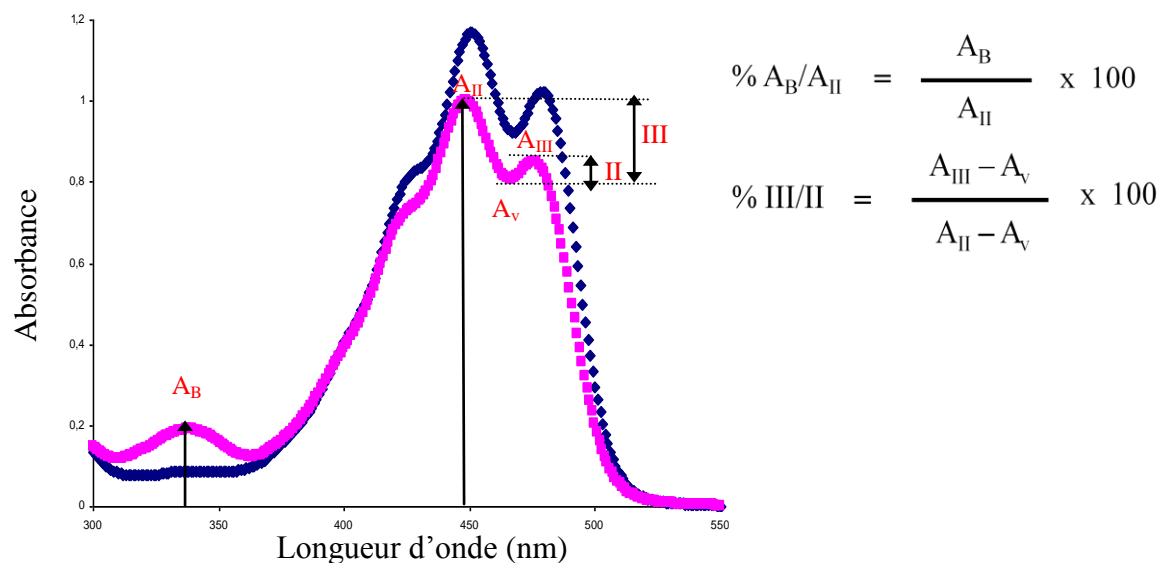


Figure 10 : Spectre et ratios de pic cis et de structure fine des caroténoïdes

2.2.3 La 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 efficace beaucoup utilisée pour qualifier et quantifier les isomères des caroténoïdes extraits des végétaux (Ishida et al., 2001; Müller et al., 2008). Cette méthode est initialement chromatographie liquide haute pression, est basée sur les mêmes principes que la chromatographie sur colonne 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.

Dans notre étude, la colonne apolaire contenant une phase stationnaire inverse, constituée de gel de silice poreux greffé, est utilisée. Avec cette phase inverse, on a choisi un éluant polaire. Dans ces conditions, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Pour séparer sélectivement les caroténoïdes (hydrophobes) et leurs isomères, on a réalisé des gradients d'élution en diminuant au cours de la séparation la polarité de l'éluant. Le temps de rétention (temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté) caractérise qualitativement une substance. L'amplitude de ces pics, ou encore l'aire délimitée par ces pics et la prolongation de la ligne de base, permet de mesurer la concentration de chaque soluté dans le mélange injecté. Le détecteur à barrette de diode, un capteur composé de photodiodes placées en ligne, permet d'obtenir le spectre UV des composés analysés sur une gamme de longueurs d'ondes données.

Le protocole utilisé pour séparer les isomères du lycopène et du β -carotène dans le cadre de cette thèse vient du fournisseur de la colonne qui a déjà testé toutes les conditions de séparation et les gradients d'éluant pour le β -carotène. Trois solvants pour la phase mobile, EMTB (A), ACN (B) et MeOH (C) ont été utilisés en gradients de concentration (tableau 9). Le volume d'injection est 5 μ l à 10°C.

Tableau 9 : Conditions des gradients pour la séparation des isomères du β -carotène et des isomères du lycopène (temps dans les parenthèses) par HPLC

Temps (min)	Phase mobile A EMTB (% vol.)	Phase mobile B ACN (% vol.)	Phase mobile C MeOH (% vol.)
0.0	0	25	75
20.0 (20.0)	50	15	35
25.0 (40.0)	50	15	35
25.5 (40.5)	0	25	75
30.0 (45.0)	0	25	75

2.2.4 Analyse physique pour caractériser les particules : granulométrie à diffraction laser

Pour stabiliser et disperser les caroténoïdes dans la phase aqueuse, ces molécules peuvent être formulés avec un surfactant comme Tween 80 et encapsulés dans les matériaux comme l'acide poly-lactique. Les caractéristiques physiques des particules de caroténoïdes obtenues sont observées par la granulométrie à diffraction laser. Cette analyse est l'opération consistant à étudier la répartition des différents grains d'un échantillon, en fonction de leurs caractéristiques (poids, taille, etc) pour la mesure de la taille (rayon) des particules. La granulométrie à diffraction laser est déduite de l'interaction entre un ensemble de particules et le faisceau laser incident (633 et 466 nm) par analyse de la tache de diffraction du faisceau.

La diffraction laser mesure les distributions granulométriques des particules en mesurant la variation angulaire de l'intensité de lumière diffusée lorsqu'un faisceau laser traverse un échantillon de particules dispersées (figure 11). Les grosses particules diffusent la lumière à de petits angles par rapport au faisceau laser et les petites particules diffusent la lumière à des angles supérieurs. Les données relatives à l'intensité diffusée en fonction

de l'angle sont analysées pour calculer la taille des particules qui ont créé l'image de diffraction et ceci grâce à la théorie de Mie. La taille des particules est représentée par le diamètre de la sphère équivalente, ayant le même volume que la particule. Les particules ne sont pas analysées individuellement, mais dans leur ensemble.

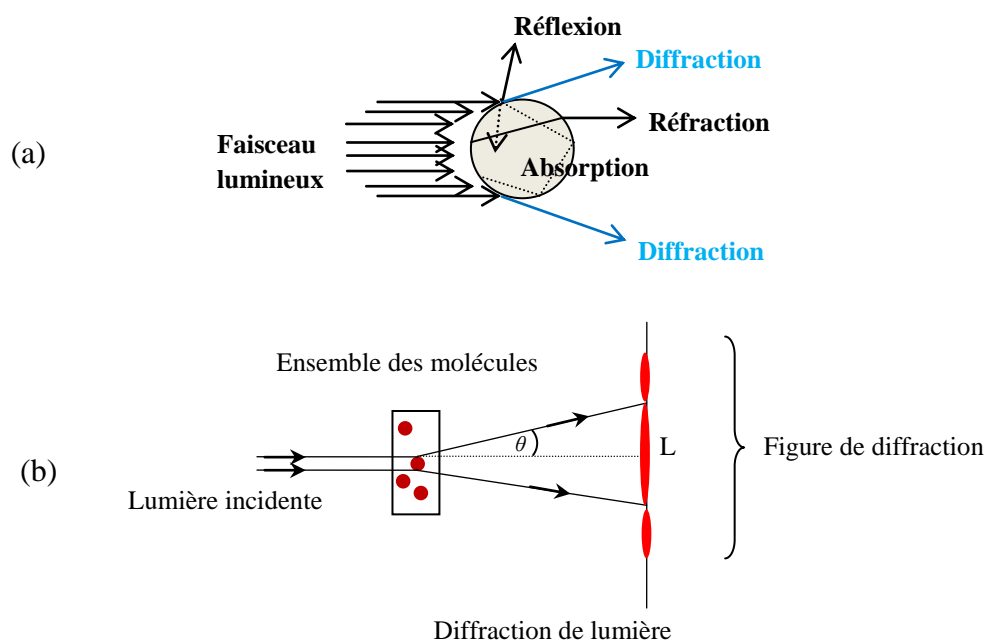


Figure 11 : Diffusion et diffraction du faisceau lumineux traversant une particule (a), principe de l'analyse granulométrique à diffraction laser (b)

2.3 ANALYSE PHYSICOCHIMIQUE DES PRODUITS DE DEGRADATION DES CAROTENOÏDES

Dans les conditions d'oxydation, les caroténoïdes peuvent être dégradés en molécules plus courtes. Pour vérifier cette hypothèse, la chromatographie en phase gazeuse (CPG) est utilisée pour analyser la présence de ces composés de dégradation qui sont plutôt volatils de masse molaire d'alentour de 200 g/mol. Ils sont aussi stables à la température d'analyse. L'échantillon (un liquide volatile) est placé dans un injecteur. Les différentes substances de l'échantillon vont être volatilisées puis emportées par un gaz porteur (phase mobile) jusqu'à la phase stationnaire. La phase stationnaire va provoquer un phénomène de rétention chromatographique des différents composés (appelés solutés) en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire avec ces molécules. Plus un élément a d'affinité pour la phase stationnaire, plus il prendra de temps pour sortir de la colonne. Pour favoriser le transport de tous les composés à travers la colonne, il faut déterminer la bonne température

du four. En général, la température doit être légèrement supérieure à la température d'ébullition des composés. Les éléments peuvent ainsi être identifiés mais aussi quantifiés.

Les appareils utilisés dans cette étude sont composés d'une source de gaz (inerte), d'un injecteur pour une colonne capillaire, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'un enregistreur (figure 12).

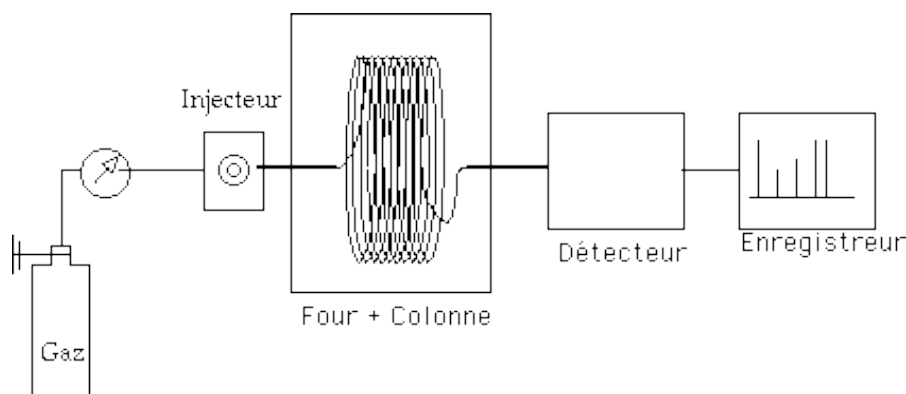


Figure 12 : Les composants de la chromatographie en phase gazeuse

2.4 ANALYSE DU POUVOIR ANTIOXYDANT ET DE LA BIOACTIVITE DES CAROTENOÏDES

2.4.1 Capacité antioxydante exprimée en équivalent Trolox (abréviation en anglais : TEAC)

Le test TEAC est basé sur la capacité d'un antioxydant à décolorer le radical cationique $ABTS^{*+}$ de couleur bleue en le transformant en ABTS incolore, par piégeage d'un proton par l'antioxydant (figure 13). Dans ce test, l'ABTS est converti en cations radicaux par oxydation par le persulfate de sodium. Ces cations radicaux présentent la couleur bleue et sont absorbés à la longueur d'onde de 734 nm. Cette décoloration des cations bleus est observée par spectrométrie. L'expérience a été réalisée selon la méthode de Breksa et al. (2006) avec quelques modifications.

Le standard de Trolox a été aussi préparé dans du MeOH à plusieurs concentrations : 150, 125, 100, 75, 50, 25 et 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Les échantillons et les standards (40 μL) ajoutés dans la solution d' $ABTS^{*+}$ (800 μL) dans une cuvette d'1 mL ont été placés, après couverture du récipient, dans une étuve à 30°C pour une brève incubation pendant 6 min. L'absorbance des échantillons a été mesurée par spectrophotométrie (Helios Epsilon, ThermoScientific, Japon) à la longueur d'onde de 734 nm. La décroissance de l'absorbance causée par l'antioxydant reflète sa capacité de capture du radical libre. La capacité

antioxydante, exprimée en équivalent Trolox (analogue structurel hydrosoluble de la vitamine E), correspond donc à la concentration de Trolox ayant la même activité que la substance à tester à une concentration donnée. Le résultat est donné en μmol d'équivalent Trolox par μmol de caroténoïdes.

La quantification du pouvoir antioxydant des caroténoïdes est basée sur une courbe d'étalonnage réalisée à partir de Trolox (0-150 $\mu\text{g/mL}$) (figure 14). La concentration des caroténoïdes testés a été limitée à la concentration de $25 \pm 0,5$ mg/L pour garantir que l'activité des caroténoïdes soit inférieure ou égale à celle de Trolox à concentration maximale (150 $\mu\text{g/mL}$).

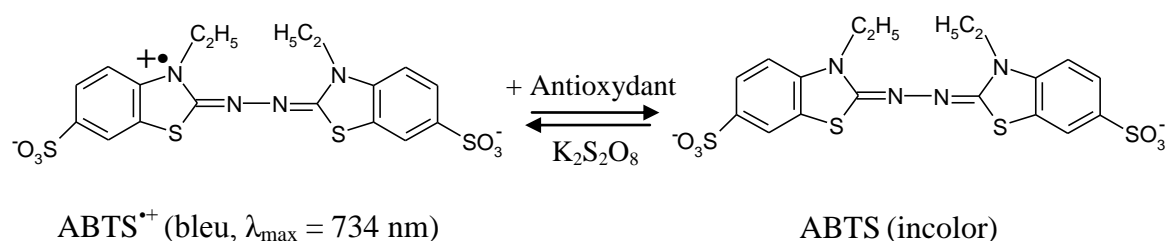


Figure 13 : Mécanisme de décoloration du cation radical $\text{ABTS}^{+\bullet}$ comme marqueur de l'activité d'une substance antioxydante dans le test de TEAC

La valeur en équivalent Trolox (TE) des échantillons est calculée en suivant l'équation linéaire déduite de l'équation de la courbe d'étalonnage de Trolox :

$$y = ax + b \quad \Rightarrow \quad x = (y - b) / a \quad (1)$$

y : absorbance de l'échantillon ; x : TE ($\mu\text{g/mL}$)

a et b sont le coefficient directeur et l'ordonnée à l'origine de l'équation de la courbe d'étalonnage du Trolox (en $\mu\text{g/mL}$)

De (1) on peut calculer le TE en $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$ de caroténoïde :

$$\text{TE} (\mu\text{mol}/\mu\text{mol}) = (\text{TE}(1) \times M_{\text{car}}) / (M_{\text{Tr}} \times C) \quad (2)$$

M_{car} : masse molaire du caroténoïde ($M = 536,87$ pour le lycopène et le β -carotène)

M_{Tr} : masse molaire du Trolox ($M = 250,29$)

C : concentration de la solution de caroténoïde ($\mu\text{g/mL}$)

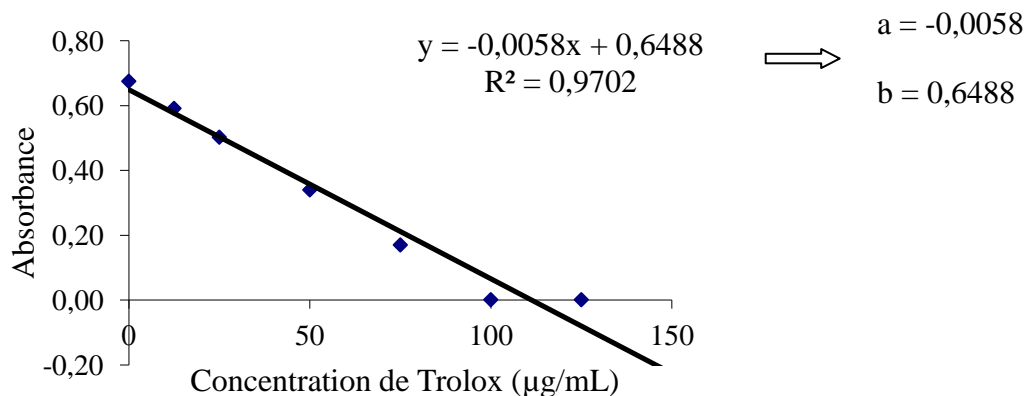


Figure 14 : Courbe linéaire d'étalonnage standard du Trolox

2.4.2 Kit des Radicaux Libres (KRL) sur cellules sanguines

La résistance globale chez l'homme vis-à-vis de l'agression des radicaux libres peut être appréciée d'un point de vue dynamique, à travers l'état oxydatif (ou anti-oxydatif), par le test global KRL (Prost 1989).

Le test permet l'évaluation de la résistance globale du sang soumis à une attaque radicalaire. Les défenses antioxydantes intra- et extra-cellulaires contribuent au maintien de l'intégrité membranaire et des fonctions cellulaires jusqu'à la lyse des cellules sanguines. La figure 15 résume certaines sources de radicaux libres intra-cellulaires et la localisation des protections cellulaires contre ces radicaux libres par des antioxydants. Ce test biologique permet donc une mesure dynamique du potentiel global de défense anti-radicalaire d'un individu. A l'aide de ce test, nous pouvons également déterminer *in vitro*, dans des conditions biologiques données, la capacité "antioxydante" ou l'action "prooxydante" des différents composés. Ainsi, en ajoutant au milieu un composé à action anti-radicalaire, nous augmentons le potentiel global de défense contre l'agression radicalaire d'un sang témoin. Au contraire, en ajoutant un composé à action pro-radicalaire nous diminuons la capacité anti-radicalaire globale du sang témoin.

La mesure de la diminution de l'absorbance permet de suivre la disparition progressive des cellules. La résistance globale du sang à l'attaque radicalaire en présence ou non du produit est exprimée par le temps au bout duquel 50% des cellules sanguines sont lysées ($T_{1/2}$ en minutes). L'efficacité anti-radicalaire des produits est alors exprimée en pourcentage du potentiel global de défense anti-radicalaire du sang témoin (% HT₅₀ du sang témoin) (figure 16). Les résultats sont standardisés en Trolox équivalent et/ou en acide gallique (acide phénolique) équivalent.

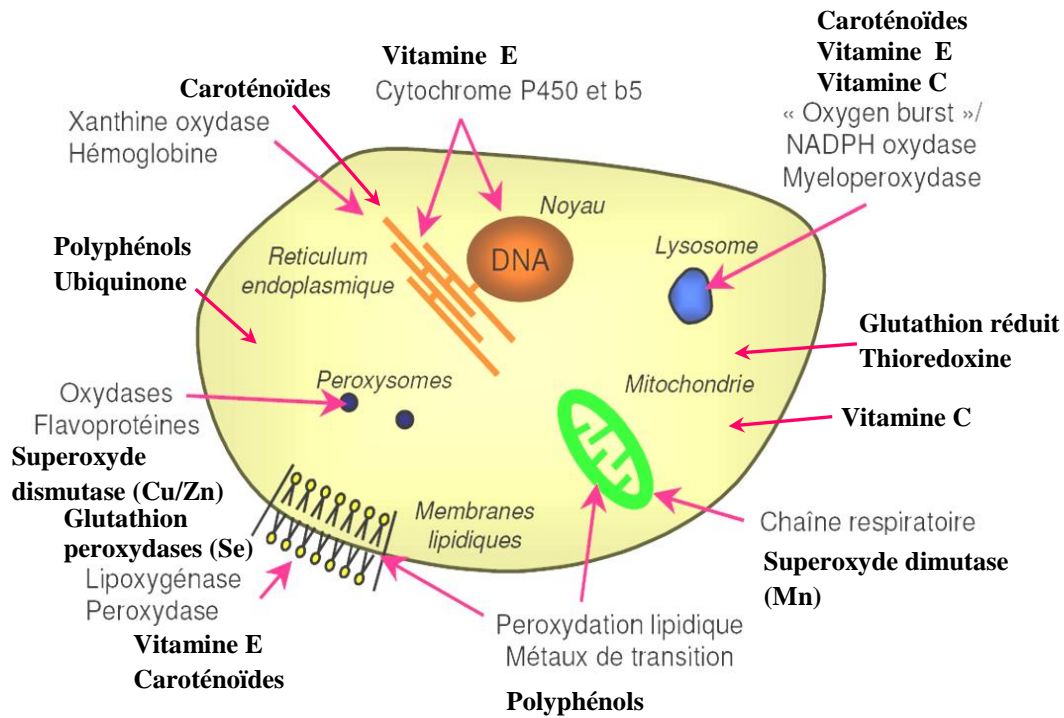


Figure 15 : Les sources cellulaires de radicaux libres et les protections cellulaires contre les radicaux libres (en gras) (adapté de Machlin et al. (1987))

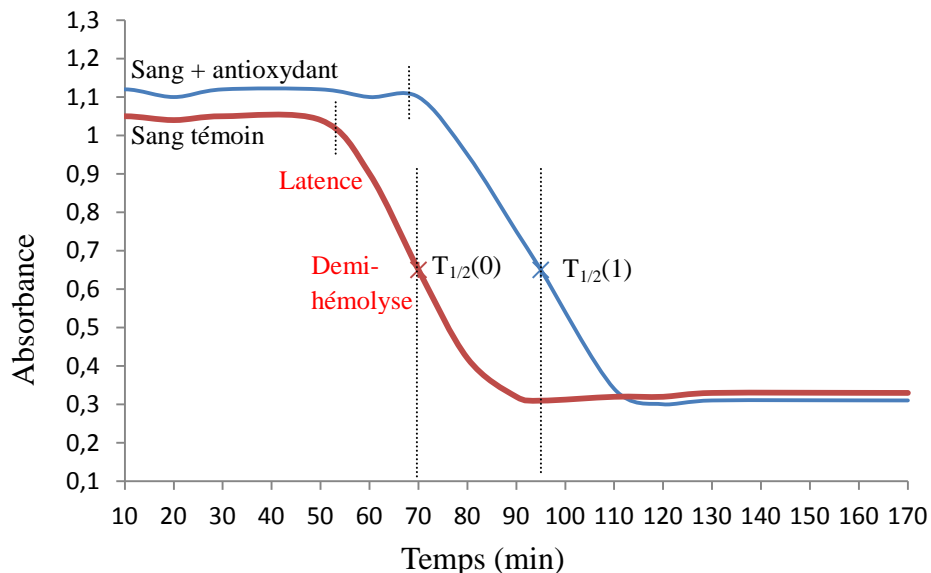


Figure 16 : Principe du test antioxydant sur les cellules sanguines du test KRL

L'efficacité anti-radicalaire du produit sur la résistance des cellules sanguines à la demi-hémolyse est exprimée par la formule :

$$\% \text{ HT}_{50} = [(T_{1/2}(1) - T_{1/2}(0)) \times 100] / T_{1/2}(0) \quad (*)$$

$T_{1/2}(1)$: temps de demi-hémolyse du sang contenant le produit antioxydant

$T_{1/2}(0)$: temps de demi-hémolyse du sang témoin

La relation entre le pourcentage du potentiel global de défense anti-radicalaire du produit antioxydant du sang témoin et sa concentration est exprimée par l'équation linéaire:

$$y = ax \Rightarrow x = y / a \quad (**)$$

y : % HT₅₀ du sang témoin

x : concentration du produit antioxydant (μM)

a est le coefficient directeur de l'équation de la courbe d'étalonnage du Trolox

Donc, on en déduit le nombre de μmole de Trolox équivalent par μmol de caroténoïde :

$$\text{TE} (\mu\text{mol}/\mu\text{mol}) = (\% \text{ HT}_{50} \times M_{\text{car}}) / (a \times C \times 10^6)$$

% HT₅₀ : pourcentage du potentiel global de défense anti-radicalaire du produit antioxydant du sang témoin

a est le coefficient directeur de l'équation de la courbe d'étalonnage du Trolox

C : concentration de produit antioxydant (g/L)

M_{car} : masse molaire de caroténoïde (M = 536,87 pour lycopène et β-carotène)

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, nous avons réalisé des extraits de caroténoïdes de l'arille de gac (*Momordica cochinchinensis*). A partir de ces premiers résultats, la stabilité du mélange de lycopène et β -carotène a été étudiée, tout d'abord vis-à-vis de la co-oxidation par les dérivés réactifs de l'oxygène produits par l'enzyme xanthine oxydase (XO). Les conditions d'utilisation de ce générateur d'anions superoxydes sont données dans la partie matériel et méthodes de l'article 1 (partie 3.1.2). Certains problèmes dans l'analyse des résultats dus aux propriétés physico-chimiques différentes du lycopène et du β -carotène sont également abordés. Un procédé d'extraction assistée et de fractionnement de lycopène et β -carotène qui fait actuellement l'objet d'un dépôt de brevet sera ensuite présenté. Les parties suivantes présentent l'évaluation durant le traitement thermique de la qualité, la stabilité et la bio-activité de ces deux caroténoïdes extraits et fractionnés de l'arille de gac. Les résultats de ce travail seront valorisés pour un projet industriel sur la production de caroténoïdes naturels.

3.1 INTRODUCTION A L'EXTRACTION ET A LA STABILITE DU LYCOPENE ET DU B-CAROTENE DE GAC

3.1.1 Extraction au solvant des caroténoïdes de l'arille de gac

D'après la bibliographie, l'extraction des caroténoïdes de gac n'a pas encore été développée. Seuls les procédés d'extraction de l'huile de gac riche en caroténoïdes sont étudiés et industrialisés. L'extraction des caroténoïdes de l'arille de gac au solvant a été réalisée au laboratoire PMB/UMR PAM depuis 6 ans. Pourtant, la méthode d'extraction utilisée (décrite dans l'article 1) n'était pas encore optimisée. L'extrait obtenu était un mélange de lycopène, β -carotène et d'huile de l'arille de gac. La figure 17 présente son spectre dont les pics majeurs sont à 444, 470 et 500 nm dans l'hexane. Ces pics sont proches de ceux de l'all-*trans*-lycopène (444, 470 et 502 nm). Pourtant, le ratio de structure supramoléculaire de cet extrait (% III/II) n'est que de 42 %, plus bas que celui du lycopène all-*trans* pur (65 %) rapporté dans la bibliographie (Rodriguez-Amaya 2001). Cela veut dire que l'extrait de l'arille de gac est riche en lycopène, mais mélangé avec d'autres substances qui font abaisser le pic à 502 nm ou augmenter le pic à 470 nm.

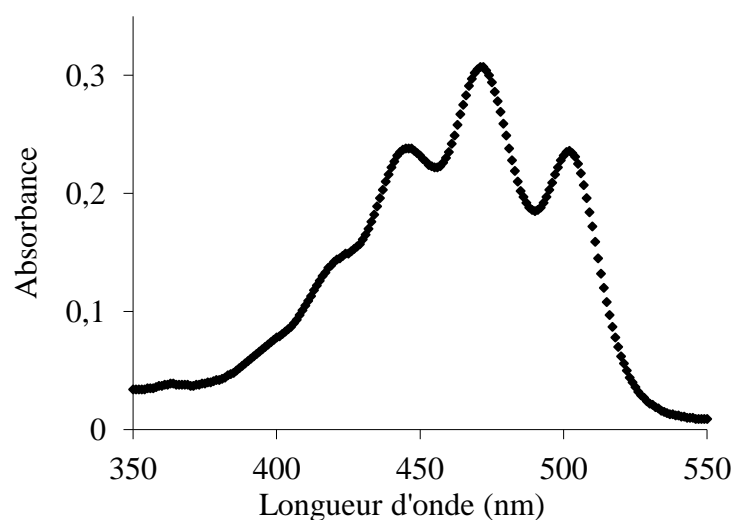


Figure 17 : Spectre d'absorption de l'extrait des caroténoïdes de l'arille de gac dans l'hexane

La composition de l'extrait de l'arille de gac a été également analysée par chromatographie à couche mince (CCM). Une phase mobile constituée d'un mélange de 5 % d'acétone, 10 % de benzène et 85 % d'éther de pétrole a été utilisée. Après développement durant 30 min, la plaque a été rapidement séchée pour gratter les spots colorés et récupérer les composés. Les résultats montrent 2 spots ($R_f = 0,88$ et $0,80$), une tâche traînante ($R_f \sim 0,43$) et le reste qui est resté sur la ligne de dépôt ($R_f = 0$) (tableau 10) en comparaison avec le β -carotène de synthèse (Sigma) comme standard. Les spots récupérés ont été dilués dans l'hexane pour mesurer leurs spectres aux longueurs d'onde de 300 à 550 nm.

Tableau 10 : Identification des spots de la chromatographie à couche mince de l'extrait de l'arille de gac

Spot	R_f	λ_{\max} (nm) ^a	% III/II	Identification
Standard	0,89	450 ; 477	25	β -Carotène all- <i>trans</i> de Sigma
1	0,88	450 ; 477	25	β -Carotène all- <i>trans</i> de gac
2	0,80	444 ; 470 ; 502	54	Lycopène <i>cis</i>
3	$\sim 0,43$	ND	ND	Phase huileuse
4	0	444 ; 472 ; 503	81	Lycopène all- <i>trans</i>

^a Spectre dans l'hexane

ND : Non déterminé

Par rapport au spectre global de la figure 17, la séparation par CCM apporte des informations plus détaillées sur les impuretés des extraits de caroténoïdes. La présence d'huile a empêché la séparation des autres composés de l'extrait, par conséquent il y a un léger décalage entre le R_f du β -carotène extrait et celui de β -carotène standard. Seulement le lycopène et le β -carotène ont été identifiés dans l'extrait d'arille de gac.

3.1.2 Evaluation de la stabilité des caroténoïdes extraits de l'arille de gac

Dans un premier temps, il s'agissait d'évaluer la stabilité du mélange du lycopène et du β -carotène extraits qui sont très antioxydants mais sensibles à l'environnement (présence d'oxydants). Etant plus antioxydant, le lycopène est plus rapidement dégradé par l'oxydation que le β -carotène. C'est pourquoi, des procédés d'extraction conventionnels du β -carotène faisant appel à des traitements thermiques, des agents chimiques comme des acides ou de l'hydroxyde de calcium qui ont souvent été appliqués pour la carotte et le potimarron ne sont pas utilisables pour extraire le lycopène de l'arille de gac. Après avoir été extrait par un procédé doux, le lycopène a été rapidement décoloré même au stockage à -20°C . Le spectre de l'extrait d'arille de gac après 12 mois dans l'hexane au congélateur présente une perte du pic maximum de lycopène à 502 nm (figure 18). Cette perte a dévoilé le pic maximal à 450 nm du β -carotène. C'est-à-dire que la solution, après stockage, présente une majorité de β -carotène. Donc, les caroténoïdes extraits dans l'hexane peuvent être dégradés pendant un long temps de stockage au congélateur et plus rapidement pour le lycopène que pour le β -carotène.

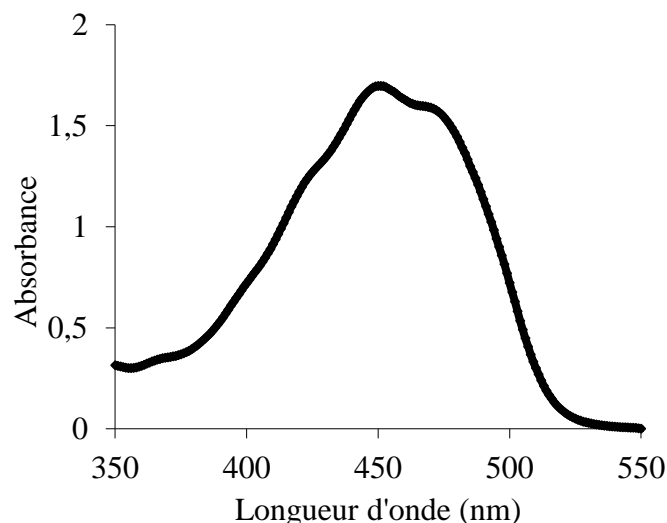


Figure 18 : Spectre d'absorption de l'extrait de caroténoïdes de l'arille de gac dans l'hexane après stockage à -20°C pendant 12 mois

La différence de stabilité entre le lycopène et le β -carotène a été observée dans l'article intitulé « **Stability of carotenoid extracts of gac (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation – Protective effect of lycopene on β -carotène** »

L'effet de l'environnement oxydant, causé par les dérivés réactifs de l'oxygène générés par la XO, sur la stabilité de l'extrait de gac a été testé. Dans cette étude, comme le lycopène et le β -carotène sont insolubles et forment des agrégats dans la phase aqueuse, ils ont été « encapsulés » dans des micelles de Tween 80 ou dans des particules d'acide polylactique (APL) pour les disperser dans le milieu d'oxydation (Cao-Hoang et al., 2011). La sensibilité à l'oxydation des caroténoïdes encapsulés a été également étudiée. Les spectres d'absorption UV de l'extrait total dans l'hexane ont été analysés pour apprécier la dégradation du lycopène et du β -carotène. Il semble que le lycopène ait été plus sensible à l'oxydation que le β -carotène. L'encapsulation a modifié le spectre des caroténoïdes de l'extrait en abaissant la hauteur des pics maximaux aux longueurs d'ondes les plus longues, celles proches du spectre du lycopène (figure 3 de l'article). Le changement de la structure supramoléculaire (ratio % III/II) de ces caroténoïdes a pu influencer leur sensibilité à la réaction de blanchiment par les oxydants. La cinétique de dégradation du lycopène dans l'APL a été plus rapide que sans APL (figure 5).

Un autre point se dégage de l'étude du spectre d'absorption UV de l'extrait de gac durant l'oxydation (figure 4) : la diminution des pics aux longueurs d'ondes plus longues, aux alentours de 500 nm pour le lycopène et 450 pour le β -carotène spécifiquement, s'est faite en parallèle avec l'augmentation de l'absorbance aux longueurs d'ondes spécifiques pour les produits d'oxydation des caroténoïdes (moins de 400 nm). Il semble donc que la dégradation des caroténoïdes de gac durant l'oxydation ait provoqué l'apparition de certains produits de clivage du cycle β -ionone.

Ces résultats suggèrent aussi que les caroténoïdes naturels extraits de gac ont été moins dégradés que le β -carotène de synthèse dans la même condition d'oxydation grâce à la structure supramoléculaire ou à la composition spécifique de l'extrait de gac qui peut comprendre certains acides gras insaturés et composés polaires actifs.

Article 1 : Stability of carotenoid extracts of gac (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation – Protective effect of lycopene on β -carotène

Lan Cao-Hoang, **Hanh Phan-Thi**, Francisco J. Osorio-Puentes, Yves Waché

Food Research International, 44:2252-2257, 2011

Titre : Stabilité des caroténoïdes extraits de l'arille de gac envers la co-oxydation – Effet protectif du lycopène sur le β -carotène.

Résumé : *Momordica cochinchinensis*, appelé gac au Vietnam, est considéré comme un fruit à haut potentiel nutritionnel. Sa propriété antioxydante, grâce à une forte concentration de caroténoïdes (β -carotène et lycopène), est particulièrement appréciée. Dans ce travail, nous avons étudié la dégradation des caroténoïdes extraits de l'arille de gac. Ces extraits ont été dispersés dans la phase aqueuse de micelles de Tween 80 ou encapsulés dans des particules d'acide poly-lactique (APL). Dans les deux cas, les caroténoïdes ont été beaucoup moins dégradés que le β -carotène synthétique. Cependant, la dégradation du lycopène a été plus rapide (environ 1 mM de lycopène dégradé par heure) par rapport au β -carotène de gac dont la concentration n'a presque pas diminué. De plus, en présence de l'autre caroténoïde dans l'extrait de gac, le clivage de la molécule de β -carotène s'est situé plus près de l'extrémité du cycle que pour le β -carotène pur. Il a causé essentiellement l'apparition de β -cyclocitral. Pour le β -carotène encapsulé, la présence d'APL a modifié le site de clivage pour la liaison C9-10 qui est le site de clivage favorisé du β -carotène pur.

Nous concluons que la présence de lycopène dans l'arille de gac présente a rôle protecteur sur la molécule de β -carotène et modifie son site de clivage. Cependant, la structure supramoléculaire est aussi importante pour l'orientation du clivage et l'encapsulation par les particules d'APL augmente la dégradation et modifie le site de clivage.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Stability of carotenoid extracts of gấc (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation – Protective effect of lycopene on β -carotene

Lan Cao-Hoang^{a,b,*}, Hanh Phan-Thi^{a,b}, Francisco J. Osorio-Puentes^b, Yves Waché^{b,*}

^a Department of Food Technology, School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Road, Hanoi, Viet Nam

^b Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2010

Received in revised form 13 March 2011

Accepted 14 March 2011

Keywords:

Gấc

Carotene

Lycopene

Poly(lactic acid)

Encapsulation

Carotene cleavage products

Ionone

Oxidation

Xanthine oxidase

Antioxidant

ABSTRACT

Momordica cochinchinensis, so-called gấc in Vietnam, is considered as a fruit with high nutritional potential. Its antioxidant property, due to a high concentration of carotenes (β -carotene and lycopene), is particularly estimated. In this study, we have investigated the degradation of carotene extracts obtained from gấc aril. These extracts were dispersed in the aqueous phase in Tween 80 micelles or were encapsulated into poly(lactic acid) (PLA) particles. In both cases, carotenes were far less degraded than synthetic β -carotene. However, the degradation of lycopene was still rapid (around 1 mM lycopene degraded per hour), whereas β -carotene was almost not bleached. Moreover, in gấc, the cleavage of the β -carotene's molecule was situated nearer the extremity of the cycle than for pure β -carotene. It gave rise essentially to β -cyclocitral. For encapsulated β -carotene, the presence of PLA modified this site to the C9–10 bond which is the favoured cleavage site of pure β -carotene.

We conclude that the presence of lycopene in gấc has a protective role on the molecule of β -carotene and modifies the cleavage site. However, the supramolecular structure is still very important in the orientation of cleavage as the encapsulation in PLA particles increases degradation and modifies the cleavage site.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carotenoids are a large group of compounds with an isoprenoid structure which brings them many physical, chemical and biological properties. They are for instance very hydrophobic and difficult to disperse in aqueous systems and, as a result, are often found aggregated in different supramolecular structures (Cao-Hoang & Waché, 2009; Köhn et al., 2008). Moreover, their conjugated double-bond system confers them free radical scavenging properties. Their biological roles in animal cells depend on the carotenoid structure. They can play a role as a provitamin A, macular pigments and as antimutagenic- anticarcinogenic- and antioxidant- agents (Astorg, 1997; Matos, Di Mascio, & Medeiros, 2000; Mortensen, Skibsted, & Truscott, 2001; Parker, 1996; Terao, 1989). According to the TEAC test, carotenes (unoxxygenated carotenoids) exhibit the higher antioxidant properties with lycopene (linear molecule) having the

highest potential, followed by α - and β -carotene (both possessing ionone cycles) (Böhm, Puspitasari-Nienaber, Ferruzzi, & Schwartz, 2001; Miller, Sampson, Candeias, Bramley, & Rice-Evans, 1996). These carotenoid antioxidant tests have been carried out on single carotenoid, often from chemical synthesis. However, few or no data are available on the diversity of oxidability of plant carotenoids in regard to their supramolecular structure and the presence of other antioxidant. These aspects may be of the highest importance as the antioxidant behaviour of carotenoids is not always what is expected of it. Indeed, carotenoids can react as either an antioxidant or pro-oxidant depending on various factors, among them the structure, physical form (*cis* or *trans* configuration), site of action of the carotenoid molecule, potential for interaction with other carotenoids or antioxidant compounds, and the partial pressure of oxygen (Woodall, Lee, Weesie, Jackson, & Britton, 1997; Young & Lowe, 2001). As a result, although the majority of epidemiological studies showed clearly the positive impact of carotenoid-rich diets to reduce risk of several cancers (Young & Lowe, 2001), some contrasting data have been published from two intervention studies which resulted in an increased lung cancer incidence for smokers taking supplemental β -carotene. Several hypotheses were proposed to explain these contradictory results (Young & Lowe, 2001). Among them, it has been noted that an antioxidant is modified by the reaction of radical scavenging and the resulting structure might exhibit different properties. For instance, epoxides or small volatile

* Corresponding authors at: Department of Food Technology, School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology, 1 Dai Co Viet Road, Hanoi, Viet Nam.

E-mail addresses: lanch-ibft@mail.hut.edu.vn (L. Cao-Hoang), ywache@u-bourgogne.fr (Y. Waché).

amphiphilic compounds may exhibit deleterious effects through oxidation or membrane destabilisation (Bouchard, Boudreau, & Auger, 1996).

Although many studies (Terao, 1989; Woodall et al., 1997) have investigated the relation between structure and antioxidant activity, the degradation of natural mixture of carotenoids have not been much studied. However, if carotenoids are organised in different supramolecular structures with different compositions, it is likely that some will degrade more rapidly than other and that the oxidation products will be different. Among these mixtures, the potential synergistic effect of β -carotene and lycopene, two of the most antioxidant carotenoids with β -carotene being also a provitamin A, is of particular interest. These compounds are found in association in carotene extracts of *Momordica cochinchinensis* aril. This fruit, (called gac in Vietnamese) is a cucurbitacea with a red-orange fruit, popular in Vietnam for several purposes resulting from its specific composition. Furthermore, this fruit is particularly rich in β -carotene and lycopene (Aoki, Kieu, Kuze, Tomisaka, & Van Chuyen, 2002; Ishida, Turner, Chapman, & McKeon, 2004; Tran, Nguyen, Zabarar, & Vu, 2008).

To protect carotenoids from oxidation and to improve their stability, dispersibility and targeting, they may be encapsulated in materials such as cyclodextrin or poly(lactic acid) (Cao-Hoang, Fougère, & Waché, 2011; Polyakov, Leshina, Konovalova, Hand, & Kispert, 2004; Ribeiro, Chu, Ichikawa, & Nakajima, 2008). In this process, complexes might be formed between the carotenoid and the matrix which can result in a modification of the supramolecular properties of carotenoids resulting in a modification of the antioxidant properties (Cao-Hoang et al., 2011; Polyakov, Leshina, Salakhutdinov, Konovalova, & Kispert, 2006; Polyakov et al., 2009). The formation of these complexes has an impact on their degradation and it is likely to impact also the production of CPs (Fig. 1).

The present study aims at investigating the effect of encapsulation of carotenoid extracts from *Momordica cochinchinensis* on their sensitivity to oxidation and on the synthesis of CPs in autoxidation conditions. Moreover, the effect of a more reactive free radical environment will be tested by adding the reactive-oxygen species (ROS) generating xanthine oxidase.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Frozen gac seeds were purchased in a local store and stored at -20°C until analysed. Synthetic β -carotene (purity $>97\%$), hexane, Tween 80, xanthine oxidase (XO) (grade III from buttermilk), poly(lactic acid) (PLA, M_w 60,000) as well as standard β -ionone, β -cyclocitral, 5,6-epoxy- β -ionone using for gas chromatography analysis were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Dihydroactinidiolide was a generous gift from Donglian Aromatic Chemicals Development Company (China). All other chemicals used were of analytical grade.

2.2. Extraction of carotenoids from gac seeds and dispersion by different methods

Gac arils were first manually separated from gac seeds. An approximate weight (500 g) of gac arils was milled with 1 L of hexane in a kitchen blender for 30 min at room temperature. The hexane phase containing carotenoids was then collected. Two ways of preparation of gac's carotenoid solution were investigated using Tween 80 only or Tween 80 combined with PLA particles. In the first preparation method, based on the dispersion method of β -carotene previously proposed by Bosser and Belin (1994), Tween 80 (10% w/w) was used as surfactant and was added into the collected hexane phase containing carotenoid extracts. The mixture was homogenised for 3 min at room temperature with an IKA Ultra-Turrax T25 System

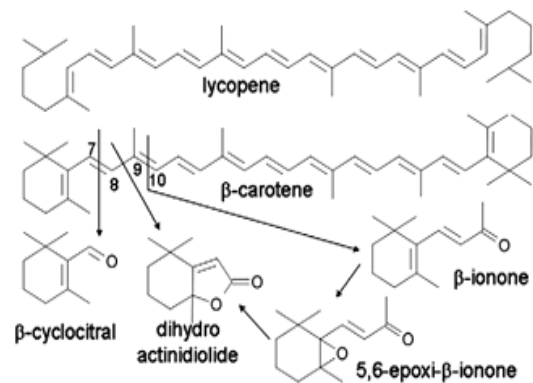


Fig. 1. Carotenoids investigated in this work and some volatile compounds produced. Arrows indicate the cleavage sites and the chemical pathway.

(IMLAB, Lille, France) set to 24,000 rpm. An emulsion containing β -carotene micelles was formed. Hexane was then removed from this emulsion by rotary evaporation under reduced pressure. The residue was dissolved in EDTA 0.25%, filtered and diluted in phosphate buffer (PBS, pH 8.5 mM) to the desired concentration.

In the second method of preparation of gac's carotenoid solution, Tween 80 was combined with PLA (polylactic acid) to encapsulate gac extracts into PLA particles. The method was previously described by Cao-Hoang et al. (2011) in their work with encapsulation of β -carotene from synthetic and natural origins. Tween 80 (10% w/w) and 25 mg of PLA were first added in the hexane phase containing gac's carotenoids. The organic solution was stirred at room temperature for 10 min and was then added with 100 mL of PBS, giving rise to an oil-in-water emulsion. After total evaporation of the organic phase, the gac's carotenoid extract was filtered and diluted in PBS to the desired concentration.

2.3. Thin layer chromatography (TLC) analysis

Thin layer chromatography (TLC) technique was used in order to determine the purity of the gac's extracts obtained. TLC is indeed a simple and quick procedure permitting to analyse the composition of a carotenoid mixture. It can also support the identification of a compound in a mixture by comparing the R_f of the compound with the one of a known reference compound and by scrapping the spot for further analysis. In our experiment, gac's extracts were dissolved in hexane before separation on silica gel TLC plates (SiLG, Merck, Germany). The mobile phase used was petroleum ether. The development time was approximately 15 min. After development, the plates were air dried for 3 min, and the pigments were visualised as yellow bands on a white background. The formed bands were scrapped off then dissolved in hexane for the UV-visible spectrum measurement using UV-absorption spectroscopy (V-570 UV/VIS/NIR, JASCO Corporation, Tokyo, Japan). Spectra were recorded in the range of 300–550 nm at data intervals of 1 nm, an average time of 0.1 s and a scan rate of 100 nm min^{-1} .

2.4. Particle analysis

The mean particle diameter and size distribution of β -carotene preparations with or without PLA were determined using a laser diffractometer Malvern Mastersizer model S2-01 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). The particle size of the prepared solutions was described by the surface-weighted mean diameters $D_{3,2}$. To calculate the particle size distribution, a refractive index ratio of 1.1 was used (Cao-Hoang et al., 2011).

Microscopic observation was carried out on a Zeiss Axioplan 2 imaging (Zeiss, Jena, FRG). The images from the AxioCam MRm camera were treated with Axio Vision 4 (Zeiss).

2.5. *In vitro* gac's carotenoid degradation study

To study the effect of encapsulation of gac's extracts on the synthesis of cleavage products (CPs), degradation of β -carotene was carried out using two systems: autooxidation as reference, and enzyme-generated reactive oxygen species (ROS) as previously described (Bossler & Belin, 1994). The reaction took place in an enzyme reactor at 37 °C under stirring at 250 rpm. In the second system of oxidation using enzyme, the aqueous phase was composed of phosphate buffer (50 mM, pH 8), acetaldehyde (48 mM) and enzyme XO (27×10^{-3} IU mL⁻¹). The total volume of the reaction was 100 mL. The concentration of β -carotene and lycopene were evaluated through their absorption at the various absorption peaks using a spectrophotometer (V-570 UV/VIS/NIR, JASCO Corporation, Tokyo, Japan) according to the Beer-Lambert Law (Davies, 1976). The kinetics of degradation was followed by determining the concentration of β -carotene remaining in the solution using spectroscopy. Changes in UV-visible spectra during the reaction were recorded from 300 to 550 nm during the degradation using UV spectrometry in order to compare the spectra of the β -carotene samples prepared by two different methods (with and without PLA).

2.6. Degradation product analyses

To extract CPs from the aqueous phase, 4-mL samples were extracted with diethyl ether (1:1) after the addition of methyl isoeugenol (10 mg L⁻¹). The organic phase was then concentrated at 44.5 °C to a final volume of 1 mL in a Macro Snyder Kuderna concentrator column (Sigma-Aldrich). This column is generally used to concentrate volatile or semivolatile organics that have been previously extracted. The floating ball vapor valves in the column provide improved vapor/liquid contact during reflux yielding rapid, clean separation of volatiles from heavier fractions. Each column section is about 50 mm in length. After concentration, the concentrated organic phase was analysed in HP6890GC Series gas chromatograph (CPG) equipped with a FID (flows: H₂ 30 mL min⁻¹, air 300 mL min⁻¹) and a capillary HP-Innowax HP 1909 1N-113 column. Nitrogen was used as GC gas carrier. The temperature of the oven was constantly increased from 75 °C to 250 °C at 1.5 °C min⁻¹. The flow of the vector gas was set to 4.0 mL min⁻¹. The injection of 1 μ L was done in a 10:1 ratio split mode. The retention times of all the peaks obtained were then compared with the retention times of external standards (β -ionone, β -cyclocitral, 5,6-epoxy- β -ionone and dihydroactinidiolide) to identify the apparition of these potentially produced volatile compounds.

3. Results and discussion

3.1. Characterisation of the carotenoid extract by TLC

TLC was first used for investigation of the purity of the sample of carotenoids extracted from gac in comparison with synthetic β -carotene from Sigma-Aldrich. When dissolved in hexane then submitted to TLC on silica gel, the synthetic β -carotene displayed only one band ($R_f = 0.073$) after 15-min migration in petroleum ether. The band was next scraped off and desorbed with hexane for investigation of UV spectra. The UV-spectra obtained of the TLC band were similar to those obtained with sample dissolved in hexane before migration (results not shown).

With regard to sample of gac, two major and one minor bands were obtained after 15-min migration on TLC silica gel in petroleum ether as mobile phase. Interestingly, the UV-visible absorption spectra of the two major bands corresponded to the spectra of lycopene (427; 469; 501) and β -carotene (427; 451; 478), with $R_f = 0.073$ and 0.018, respectively. The minor band possessed a R_f of 0.036 and the spectra corresponded to the one of *cis*-lycopene (425; 459; 494). This result confirms that lycopene and β -carotene isomers are the two carotenes in gac's aril.

3.2. Particle size measurements of the gac's carotenoid preparations with or without PLA

The particle size distributions of the resulting gac's carotenoid solutions prepared with or without polymer are given in Fig. 2. Interestingly, gac's carotenoid prepared with the two methods showed very different distributions and dimensions. Preparation without PLA resulted in a bimodal particle size distributions with an average surface-weighted mean diameter around 1.6 μ m, whereas preparation with PLA showed a monomodal particle size distributions with bigger particles as more than 90% of the particles having diameter greater than 1.9 μ m (Fig. 2). This result is surprisingly the reverse of what we expected and what we had observed before with synthetic β -carotene (Cao-Hoang et al., 2011) that using PLA encapsulation resulted in smaller particles compared with the non encapsulation system. Samples were also checked in microscopic observations. It is observed that the Tween micelle-preparation in our experiment contained particles although bigger than those obtained after high-pressure homogenisation by Yuan, Gao, Zhao, and Mao (2008), having smaller size than the PLA polymer-particles (results not shown). This results is thus in agreement with the result obtained with particle size measurement using laser diffractometer. Indeed, for PLA polymer-particles, we observed spherical particles which were orange inside with a more intense colour for bigger particles (Fig. 2). From these observations, it can be deduced that PLA particles were

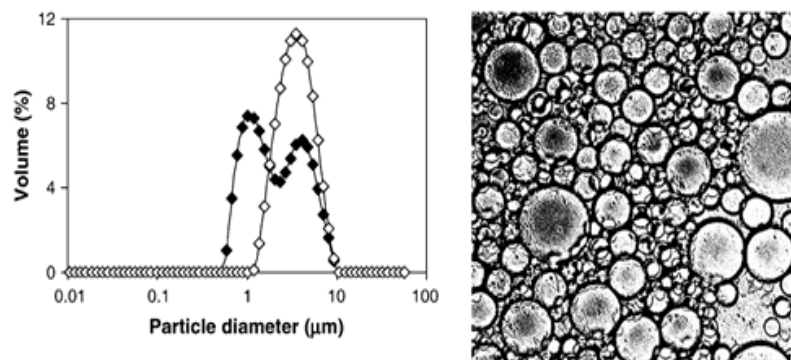


Fig. 2. Poly-lactic acid particles with carotene. Left: Particle size distribution of preparations of *Momordica cochinchinensis* carotenoids extracts with (◊) or without (◆) PLA encapsulation. Right: Microscopic view of the PLA particles with the grey colour corresponding to the orange/red colour of carotenes.

highly charged with carotenoids, giving them thus a bigger size compared with Tween 80 particles.

3.3. Spectra of carotenoid extracts with or without encapsulation

The encapsulation of molecules is a way to protect them from oxidation. It results in a different supramolecular structure (Polyakov et al., 2006) and kinetics of oxidation and oxidation products could be thus modified.

UV-Vis absorption spectra of *Momordica cochinchinensis* carotenoids extract were recorded before and during oxidation of both carotenoid extracts encapsulated in polylactic acid (PLA) particles or dispersed through micelles in the aqueous phase as direct dispersion is not possible (Wackerbarth, Stoll, Gebken, Pelters, & Bindrich, 2009). Interestingly, both spectra of gac's extract with or without PLA encapsulation displayed λ_{max} at 452, 478 and 506 nm with the major peak at 478 nm (Fig. 3). These peaks are close to the specific peaks of lycopene and, for 452 and 478 nm, of β -carotene. These two apolar carotenoids and their *cis* isomers are the only carotenoids that have been detected in the gac aril (Aoki et al., 2002; Ishida et al., 2004). As shown above, in our samples, thin layer chromatography confirmed their presence. Interestingly, PLA encapsulated samples showed different UV-Vis spectra compared with that of non-encapsulated samples, with a very sharp peak of lycopene at 506 nm and a decrease in absorbance at shorter wavelengths (Fig. 3). It indicates that, in comparison with non-encapsulated samples, the encapsulated samples may contain more lycopene but less compounds having absorption spectra peaking at shorter wavelengths, which correspond to products of carotenoid oxidation (Cao-Hoang et al., 2011). In one hand, these results are in agreement with those obtained previously by Cao-Hoang et al. (2011), who suggested that the encapsulation in PLA particles was a selective step. Indeed, according to these previous results, PLA particles have a higher affinity for β -carotene than for its oxidation products which are more polar. Thus, these latter compounds are less retained in the PLA matrix due to the encapsulation selectivity. In the other hand, our spectra with relatively slight differences between encapsulated and non-encapsulated carotenes may reflect interactions between the carotenoid complex and the polymer. We have investigated the extraction of carotenes from PLA particles and observed that the extraction in hexane was rapid and seemed important. The amount of lycopene extracted with hexane was about 50% higher than the one of β -carotene as revealed by TLC-UV-Vis spectrometry and the extraction of the two carotenes together was of about 3 mg g^{-1} of PLA.

When interacting with the encapsulating material, the carotene extract changes its supramolecular structure and as a consequence, its sensitivity to oxidation. During oxidation, the spectra evolved only slightly, without significant modification of absorbance at the wavelength specific for BC and carotenoid oxidation products (Fig. 4). However, with regards to non-encapsulated samples, it

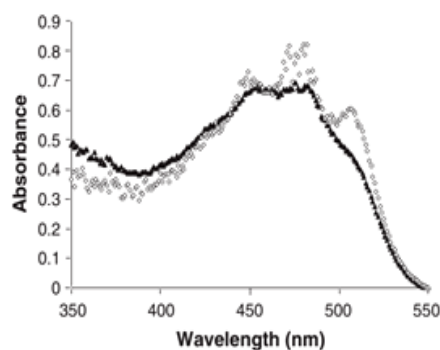


Fig. 3. UV-Vis absorption spectra of *Momordica cochinchinensis* carotenoids extracts with (○) or without (●) PLA encapsulation.

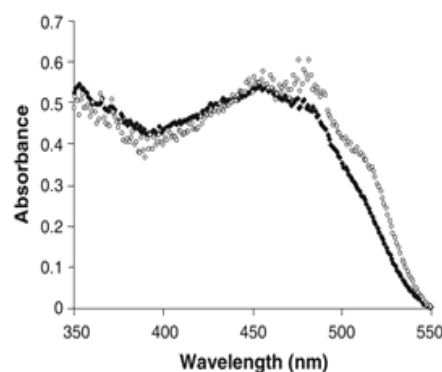


Fig. 4. UV-absorption spectra of *Momordica cochinchinensis* carotenoids extract with (○) or without (●) PLA encapsulation after a 24-h enzymatic degradation.

could be observed that the major absorption peak changed from the one at 478 nm in the beginning to the one at 452 nm after 24-h degradation. Concerning the PLA encapsulated samples, at the lycopene specific peak around 500 nm, a significant decrease in absorbance was observed. In both cases with and without encapsulation, it seems that oxidation has more striking effect on lycopene than on β -carotene.

3.4. Kinetics of degradation of carotenoid extracts with or without PLA

As demonstrated in the above paragraph, it seems that lycopene was more affected by oxidation than β -carotene. We thus focussed on lycopene to evaluate the kinetics of degradation of the carotenoid extract. At the lycopene specific peak, a significant decrease in absorbance was observed. The degradation was calculated from the absorbance around 500 nm and was represented in mM of lycopene degraded (Fig. 5). Interestingly, the bleaching reaction as evaluated by the degradation of lycopene was more rapid and stronger in the samples prepared with PLA than without PLA. After 24-h oxidation, about 11 mM of lycopene were degraded in preparation with polymer vs. 7 mM in preparation without polymer (Fig. 5). This suggests that the encapsulation modifies the structure or mixture of the extracts, resulting, in a surprising way, in a less protected extract.

Although the degradation of lycopene was lower than that observed previously for the oxidation of pure β -carotene (Cao-Hoang et al., 2011), it is quite surprising that lycopene was bleached whereas β -carotene was only very slightly degraded and there was no evidence of the appearance of any light-absorbing reaction products between 350 and 400 nm.

To explain the selective degradation of lycopene, it can be noted that this carotene possesses a higher antioxidant potential than β -carotene as observed with the TEAC test (Böhm et al., 2001). This higher reactivity results also in a faster degradation: Woodall et al. (1997) have shown that the rate of oxidation with free radical of lycopene was about four times higher than that of β -carotene. This was explained by the relationship between the structure and the reactivity of the carotenoids. The high reactivity of lycopene could be attributed to the easy addition of peroxy radicals to the longer conjugated polyene chain, but hydrogen abstractions may also be a major feature in this case. Compared with β -carotene, lycopene has an extended chromophore. Furthermore, all the C=C bonds of lycopene are coplanar, while the β -rings of β -carotene are twisted out of plane (Woodall et al., 1997). This unique chemical structure of lycopene makes it very sensitive to oxidation as well as isomerisation reaction during cooking and extraction processing (Shi, Dai, Kakuda, Mittal, & Xue, 2008). Lycopene could have thus a protective effect towards the degradation of β -carotene upon oxidation.

However, with the degradation of synthetic β -carotene (Cao-Hoang et al., 2011), both lycopene and β -carotene from gac's

extracts were less degraded than synthetic β -carotene in the same condition of oxidation. This point may reflect the specific composition or structure of gac's extracts. Beside carotenoids, this fruit is rich in unsaturated fatty acids (Ishida et al., 2004; Vuong, Dueker, & Murphy, 2002), which may have been extracted with carotenoids and could exhibit a protective effect on the pigments. The supramolecular structure could also be different in gac compared to synthetic β -carotene, resulting in a protection of carotenes from oxidation. It is for instance very surprising that lycopene was oxidised more rapidly when encapsulated and no such results have been reported before to our knowledge. This could result from the specific encapsulation of non-polar compounds in PLA particles: more polar compounds playing an active protecting role against oxidation may have been eliminated from encapsulation.

To investigate this point we analysed the apparition of β -carotene cleavage products in both encapsulation and non encapsulation systems.

3.5. Apparition of cleavage products

CPs apparition in the medium is presented in Table 1. An important difference is observable between the degradation of β -carotene encapsulated in PLA particles or not. Without PLA, the main CP is β -cyclocitral yielding 0.15 and a small amount of dihydroactinidiolide is also encountered. With PLA, the amount of β -cyclocitral is significantly reduced while β -ionone and epoxy- β -ionone are also present. It is interesting to note that the total amount of these cyclic CPs is rather not different between the two conditions while the nature of the product reveals a difference in the cleavage site: without PLA, the main cleavage occurs in the C7-8 bond while in PLA particles, the cleavage site shifts from one to two bonds in the direction of the centre of the molecule. These differences reflect certainly a difference in accessibility of xanthine oxidase-generated free radicals to β -carotene. Without PLA, only the extremity of the β -carotene molecule is accessible whereas, in the case of PLA encapsulation, although the cleavage bond in C7-8 remains major, the favoured cleavage bond determined from molecular modeling calculation in vacuum and from experimental results increases (Bossier & Belin, 1994; Ly, Cao-Hoang, Belin, & Waché, 2008; Waché, Bossier De Ratuld, Ly, & Belin, 2002; Waché, Bossier-DeRatuld, & Belin, 2006; Waché, Bossier-DeRatuld, Lhuguenot, & Belin, 2003).

4. Conclusion

The carotenoid fraction of *Momordica cochinchinensis* is, in contrast with other plant carotenoids that we have tested in our laboratory, very stable. Moreover, the degradation of these carotenoids is selective as lycopene seems to be more highly degraded than β -carotene. Surprisingly, the degradation is higher for carotenoid extracts encapsulated in PLA particles showing that the encapsulation

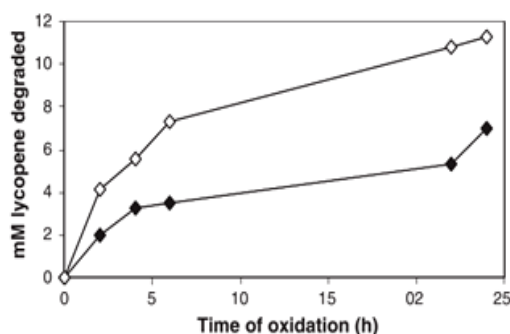


Fig. 5. Amount of lycopene degraded calculated from the absorption at the near-500 nm specific peak; (♦) without PLA, (○) with PLA.

Table 1

Amount of main cleavage products (CPs) after degradation of *Momordica cochinchinensis* carotenoid extracts in presence of xanthine oxidase.

Cleavage product	CPs molar yield in % from the initial concentration of BC	
	Without PLA	With PLA
β -Cyclocitral	15	10
β -ionone	-	4
5,6-Epoxy- β -ionone	-	2
Dihydroactinidiolide	2	2

modifies the structure or mixture of the extracts, resulting in a less protected extract. Despite the low degradation by xanthine oxidase-generated free radicals, almost all the degraded carotenoids are giving rise to cyclic CPs with a cleavage site favoured at the C7-8 bond in non encapsulated conditions whereas the C9-10 site is increasing for PLA encapsulated extracts. Both low degradation and high amount of cyclic CPs are specificities of gac and this requires further investigation on the presence of antioxidant and the supramolecular structure of carotenoids.

Acknowledgements

This work is supported by the French Agency for Research (ANR programme "Transaronat"). The authors thank Christine Rojas for her technical assistance and Tran Hai Dang for purchasing the gac samples. We also wish to thank Pierre-André Marechal for the financial support of AgroSup Dijon for Francisco J. Osorio Puentes.

References

Aoki, H., Kieu, N. T., Kuze, N., Tomisaka, K., & Van Chuyen, N. (2002). Carotenoid pigments in GAC fruit (*Momordica cochinchinensis* SPRENG). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(11), 2479–2482.

Astorg, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci Technol*, 8, 406–413.

Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2001). Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 221–226.

Bossier, A., & Belin, J.-M. (1994). Synthesis of beta-ionone in an aldehyde/xanthine oxidase/beta-carotene system involving free radical formation. *Biotechnology Progress*, 10, 129–133.

Bouchard, M., Boudreau, N., & Auger, M. (1996). Membrane fluidity response to odorants as seen by 2H-NMR and infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1282(2), 233–239.

Cao-Hoang, L., Fougère, R., & Waché, Y. (2011). Increase in stability and change in supramolecular structure of [beta]-carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. *Food Chemistry*, 124(1), 42–49.

Cao-Hoang, L., & Waché, Y. (2009). Carotene dispersion in liquid media. In L. Haugen, & T. Bjornson (Eds.), *Beta-Carotene: Dietary Sources, Cancer, and Cognition* (pp. 283–298). New York: Novapublishers.

Davies, B. H. (1976). Carotenoids. In T. W. Goodwin (Ed.), *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, Vol. 2. (pp. 38–165) London, New York, San Francisco.

Ishida, B. K., Turner, C., Chapman, M. H., & McKeon, T. A. (2004). Fatty acid and carotenoid composition of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 274–279.

Köhn, S., Kolbe, H., Korgner, M., Köpsel, C., Mayer, B., Auweter, H., et al. (2008). Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids. *Carotenoids. Natural Functions*, Vol. 4. Basel: Birkhäuser Verlag.

Ly, M. H., Cao-Hoang, L., Belin, J.-M., & Waché, Y. (2008). Improved co-oxidation of beta-carotene to beta-ionone using xanthine oxidase-generated reactive oxygen species in a multiphase system. *Biotechnology Journal*, 3(2), 220–225.

Matos, H. R., Di Mascio, P., & Medeiros, M. H. (2000). Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture [In Process Citation]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(1), 56–59.

Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 384(3), 240–242.

Mortensen, A., Skibsted, L. H., & Truscott, T. G. (2001). The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 13–19.

Parker, R. S. (1996). Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(5), 542–551.

- Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Konovalova, T. A., Hand, E. O., & Kispert, L. D. (2004). Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: 1H NMR, EPR, and optical studies. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 872–880.
- Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Meteleva, E. S., Dushkin, A. V., Konovalova, T. A., & Kispert, L. D. (2009). Water soluble complexes of carotenoids with arabinogalactan. *Journal of Physical Chemistry B*, 113(1), 275–282.
- Polyakov, N. E., Leshina, T. V., Salakhutdinov, N. F., Konovalova, T. A., & Kispert, L. D. (2006). Antioxidant and redox properties of supramolecular complexes of carotenoids with [beta]-glycyrrhizic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(10), 1804–1809.
- Ribeiro, H. S., Chu, B. -S., Ichikawa, S., & Nakajima, M. (2008). Preparation of nanodispersions containing [beta]-carotene by solvent displacement method. *Food Hydrocolloids*, 22(1), 12–17.
- Shi, J., Dai, Y., Kakuda, Y., Mittal, G., & Xue, S. J. (2008). Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato purée. *Food Control*, 19(5), 514–520.
- Terao, J. (1989). Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24(7), 659–661.
- Tran, T. H., Nguyen, M. H., Zabaraz, D., & Vu, L. T. T. (2008). Process development of Gac powder by using different enzymes and drying techniques. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 359–365.
- Vuong, L., Dueker, S., & Murphy, S. (2002). Plasma Beta-carotene and retinol concentrations of children increase after a 30-d supplementation with the fruit Momordica cochinchinensis (gac). *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(4), 872–879.
- Waché, Y., Bosser De Ratuld, A., Ly, H. M., & Belin, J. -M. (2002). Cooxidation of β -carotene in biphasic media. *Journal of Molecular Catalysis B*, 19–20, 197–201.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, 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, 2337–2341.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Lhuguenot, J. C., & Belin, J. M. (2003). Effect of cis/trans isomerism of β -Carotene on the Ratios of Volatile Compounds Produced during Oxidative Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1984–1987.
- Wackerbarth, H., Stoll, T., Gebken, S., Pelters, C., & Bindrich, U. (2009). Carotenoid protein interaction as an approach for the formulation of functional food emulsions. *Food Research International*, 42(9), 1254–1258.
- Woodall, A. A., Lee, S. W. -M., Weesie, R. J., Jackson, M. J., & Britton, G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1336, 33–42.
- Young, A. J., & Lowe, G. M. (2001). Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 20–27.
- Yuan, Y., Gao, Y., Zhao, J., & Mao, L. (2008). Characterization and stability evaluation of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*, 41(1), 61–68.

Après ces premières études sur l'extraction et l'évaluation de la stabilité des caroténoïdes de l'arille de gac, certaines remarques peuvent être formulées :

- Le procédé d'extraction n'est pas encore efficace à cause de la texture fine et collante de l'arille de gac qui empêche le contact des tissus avec le solvant pendant le mélange.

- Le produit du procédé d'extraction est un mélange des isomères de lycopène, β -carotène avec les acides gras de l'huile de gac qui ont pu avoir des effets protecteurs entre eux contre l'oxydation en comparaison avec le β -carotène pur de synthèse.

- Seuls les spectres d'absorption UV-visible ont été utilisés pour évaluer la dégradation des caroténoïdes de gac par l'oxydation. Cependant, le mélange de plusieurs caroténoïdes donne des valeurs d'absorbance des pics maximaux de chaque caroténoïde et sur la structure supramoléculaire qui peuvent être difficiles à interpréter. Ceci ne permet pas d'avoir des résultats absolus sur la dégradation du lycopène et du β -carotène de l'extrait.

- Le spectre des caroténoïdes n'a pas été observé aux longueurs d'onde de 300 à 350 nm où peuvent se trouver les pics de *cis*-isomères de lycopène et β -carotène. L'augmentation de l'absorbance aux longueurs d'onde de 350 à 400 nm pendant la dégradation des caroténoïdes peut être non seulement causée par des produits d'oxydation mais aussi par des *cis*-isomères.

A partir de ces remarques, certains travaux sont proposés pour la suite de notre étude. La teneur en lycopène et en β -carotène de l'arille de gac est très intéressante, le procédé d'extraction doit être amélioré pour diminuer le gaspillage des caroténoïdes dans les résidus après l'extraction. De plus, la séparation de lycopène et β -carotène de l'extrait est aussi proposée pour étudier la stabilité de chaque caroténoïde en évitant l'influence d'autres composés du mélange.

3.2 EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DU LYCOPENE ET DU B-CAROTENE DE L'ARILLE DE GAC

Cette partie présente la démarche suivie dans la recherche d'un procédé d'extraction adapté pour l'arille de gac permettant d'extraire séparément et proprement ses principaux caroténoïdes. Elle commence par une étude bibliographique des procédés existants d'extraction des caroténoïdes de certaines sources végétales.

3.2.1 Procédés d'extraction au solvant de caroténoïdes naturels

Les caroténoïdes sont extraits de plusieurs sources naturelles telles que des plantes (huile de palme, tomate, carotte), des algues et des microorganismes (*Blakeslea trispora*, *Dunaliella salina*). L'extraction de ces substances hydrophobes est souvent réalisée avec un ou plusieurs solvants apolaires comme le tétrahydrofurane, le *n*-hexane, le pentane ou le chloroforme. Dans certains travaux de laboratoire, un mélange d'hexane, acétone et éthanol a été utilisé pour extraire le lycopène et le β -carotène de la tomate et du pamplemousse rose (Sadler et al., 1990). Les sous-produits de tomate (épluchures) ont été extraits par le chloroforme (Rozzi et al., 2002). Certains autres végétaux (dont la carotte, le brocoli, la graine de moutarde et la courge jaune) ont été manipulés avec le pentane après avoir été homogénéisés avec l'éthanol pour extraire l' α - et le β -carotène (Marsili et al., 1993). Pour l'arille de gac, les caroténoïdes ont été extraits en utilisant un mélange de tétrahydrofurane et de méthanol (4 : 1) (Nhung et al., 2010) ou encore du dichlorométhane ou du méthanol (Ishida et al., 2004).

Avant d'être mélangés au solvant, les tissus végétaux peuvent être prétraités par un traitement thermique de 50 à 70°C (Ishida et al., 2009) ou un traitement enzymatique (cellulase) à environ 50°C pendant 4 à 6 heures (Ferrari et al., 2013). Ces traitements aident à déstructurer les tissus pour libérer les caroténoïdes, cependant ils peuvent également causer l'isomérisation ou la dégradation des substances extraites. Après l'extraction, les solvants sont éliminés par évaporation pour récupérer un extrait concentré. Parfois, pour obtenir des caroténoïdes plus propres, une étape de saponification est nécessaire pour les séparer de l'huile (Ausich et al., 1999). Par la suite, les caroténoïdes du concentré peuvent être séparés par une méthode chromatographique : une charge alimentée par un liquide contenant le concentré permet d'adsorber du carotène et ensuite, le carotène est recueilli en alimentant la charge par un diluant (Hama et al., 1993; Haigh 1994). En comparaison avec la méthode Soxhlet classique, la saponification et la chromatographie se

sont avérées plus avantageuses dans le cas de l'extraction des caroténoïdes de l'huile de palme car elles permettent de réduire l'utilisation de solvant et la durée du traitement thermique.

Par ailleurs, les caroténoïdes peuvent être purifiés et récupérés par cristallisation en fonction de leur concentration de solubilité. La plupart des caroténoïdes ont tendance à former des cristaux quand leurs solutions deviennent sursaturées. Dans certains cas, les cristaux obtenus sont un mélange de plusieurs isomères d'un ou plusieurs caroténoïdes qui peuvent être séparés par une étape de fractionnement (Haigh 1994; Khachik 2006). Ce dernier procédé a permis notamment de séparer l'ensemble de *cis*-isomères et l'ensemble de caroténoïdes *all-trans* extraits de l'huile de palme déjà saponifiée.

Les méthodes de purification citées ont été brevetées pour les extraits de tomate, d'huile de palme, d'algues ou de microorganismes unicellulaires dont les composants paraissent moins complexes ou moins huileux que l'arille de gac. Les traitements nécessaires pendant l'extraction sont aussi dépendants de la texture des résidus et des caroténoïdes extraits. Pour l'arille de gac, le mélange de lycopène (très sensible à la température et à l'oxydation) et de β -carotène peut causer certains problèmes, par exemple la dégradation du lycopène avant récupération du β -carotène, que les procédés présentés ci-dessus ne peuvent pas tous résoudre. Ainsi, la recherche d'un autre procédé d'extraction plus doux mais plus efficace et qui conviendrait à l'arille de gac est indispensable.

3.2.2 Mise au point du procédé d'extraction de caroténoïdes de l'arille de gac

Pour commencer, nous avons extrait les caroténoïdes de l'arille de gac en suivant la méthode de laboratoire qui a été décrite dans l'article de la partie 3.1.2. A partir de ces travaux, nous avons rencontré des difficultés liées au faible rendement du procédé. Un autre procédé d'extraction assistée et dit « innovant » a été mis au point.

3.2.2.1 Tissus de l'arille de gac

Avant d'engager l'extraction des caroténoïdes de l'arille de gac, l'observation des tissus de l'arille est intéressante pour connaître la localisation de ces caroténoïdes dans les matières premières. L'image microscopique nous montre que les caroténoïdes se trouvent dans les gouttelettes lipidiques qui sont partout dans le cytoplasme et entourent les vacuoles (figure 19). La couleur orange dans la figure présente le β -carotène qui est bien dispersé dans la phase lipidique, tandis que le lycopène est moins dispersé ou se trouve

sous forme de cristaux rouges superposés autour ou dans les gouttelettes. Ils sont entourés par des couches membranaires transparentes.

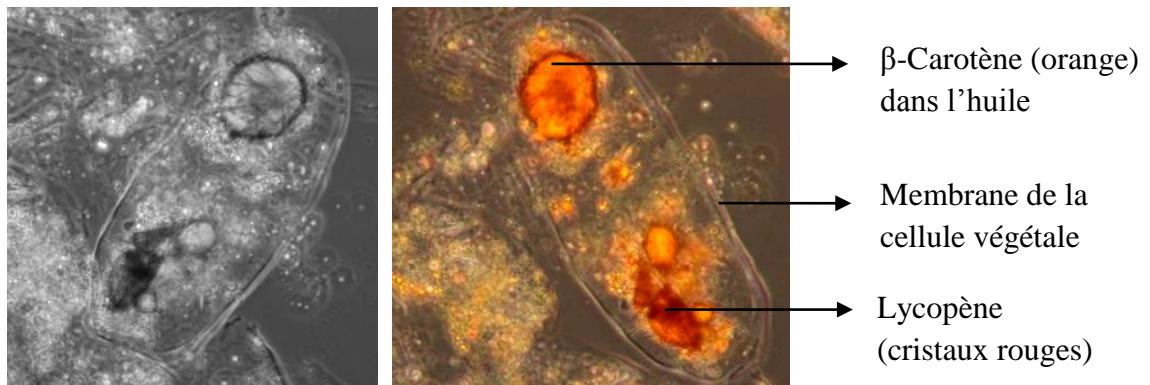


Figure 19 : Localisation du lycopène et du β -carotène dans les tissus de l'arille de gac avant l'extraction. Observation dans l'eau avec un objectif $\times 100$.

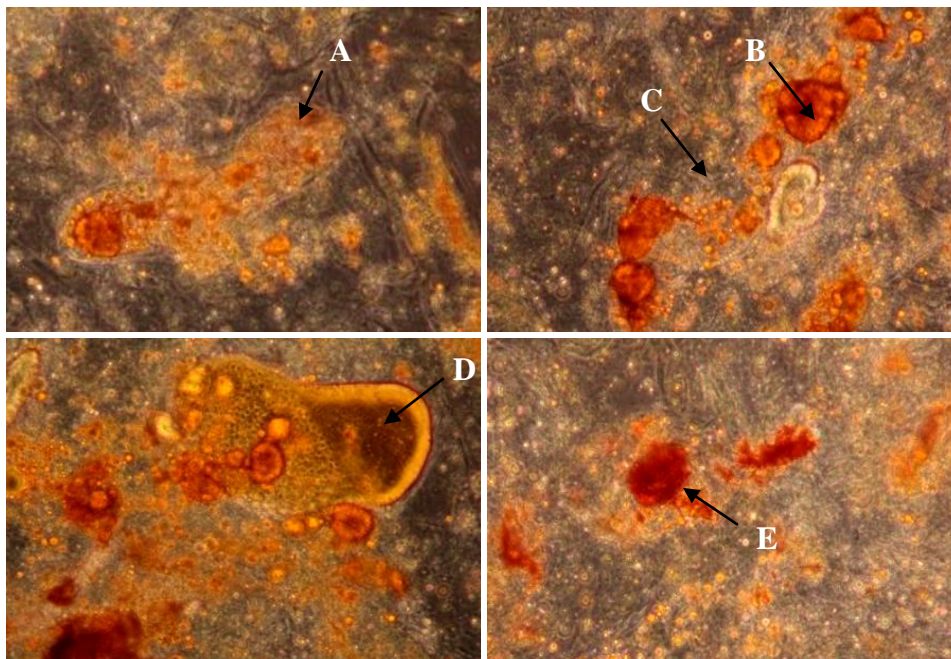


Figure 20 : Observation microscopique de la libération des gouttelettes lipidiques contenant les caroténoïdes pendant l'extraction au solvant, dans l'hexane avec un objectif $\times 100$. A : cellule entière ; B, E: cristaux de lycopène ; C : membrane cellulaire cassée ; D : β -carotène dans l'huile.

Pendant l'extraction, une fois les membranes cellulaires cassées par l'agitation, les caroténoïdes sont libérés et dispersés dans le solvant avec les gouttelettes lipidique (figure 20). Comme les cristaux de lycopène sont moins solubles que le β -carotène, ils restent suspendus et sont plus résistants à la libération par le solvant.

3.2.2.2 Procédé d'extraction assisté du lycopène et du β -carotène de gac

Comme le fruit de gac utilisé dans cette étude est de la variété gluante, l'arille est constitué d'une couche rouge, humide, épaisse et collante. La matière première soumise à l'extraction est une purée fine et assez collante qui a causé certains problèmes pendant la manipulation, surtout lors de l'agitation du mélange des tissus de gac avec le solvant.

Plusieurs procédés ont été testés dans le but d'extraire les caroténoïdes des matières premières jusqu'à épuisement. Dans le protocole décrit dans l'article de Cao-Hoang et al. (2011), l'arille de gac décongelé est mixé et agité dans l'hexane à l'intérieur d'une fiole, sur une table d'agitation Thermoshake Gerhardt. Cette méthode d'agitation n'a pas été efficace dans notre cas car les matières premières ont formé un paquet rouge collant au fond de la fiole quand le solvant apolaire a été ajouté. Par conséquent, l'arille de gac n'a pas pu être bien mélangé et correctement mis en contact avec le solvant. Pour résoudre ce problème, on a fait une agitation assistée par un barreau magnétique mis directement dans la purée rouge. Le contact entre le solvant et les tissus de l'arille de gac a été ainsi amélioré, cependant la texture visqueuse de la purée a empêché la rotation régulière du barreau. La question qui se pose est donc : comment réduire la viscosité du résidu et faciliter son agitation dans le solvant ?

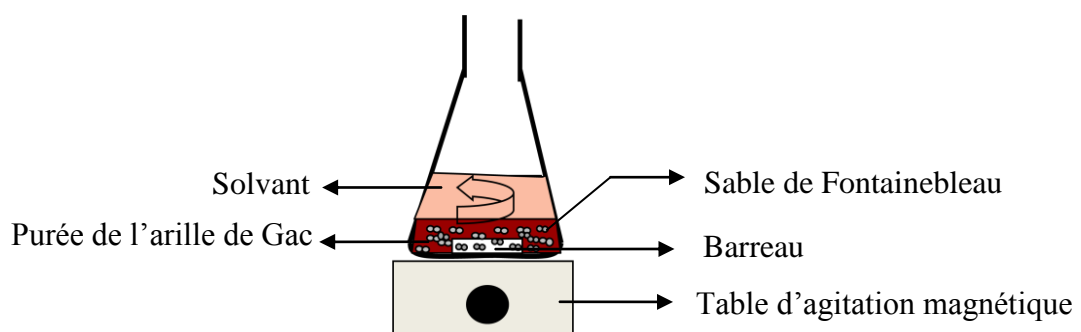


Figure 21 : Agitation de la purée d'arille de gac dans l'hexane par mélange avec du sable pendant l'extraction de caroténoïdes de l'arille de gac

Pour répondre à la question ci-dessus, nous avons utilisé du sable fin comme assistant à l'agitation de la purée d'arille de gac dans le solvant. Les grains de sable ont

écarté les tissus fins du résidu et rendu la purée moins collante. Le schéma de la manipulation réalisée est décrit dans la figure 21.

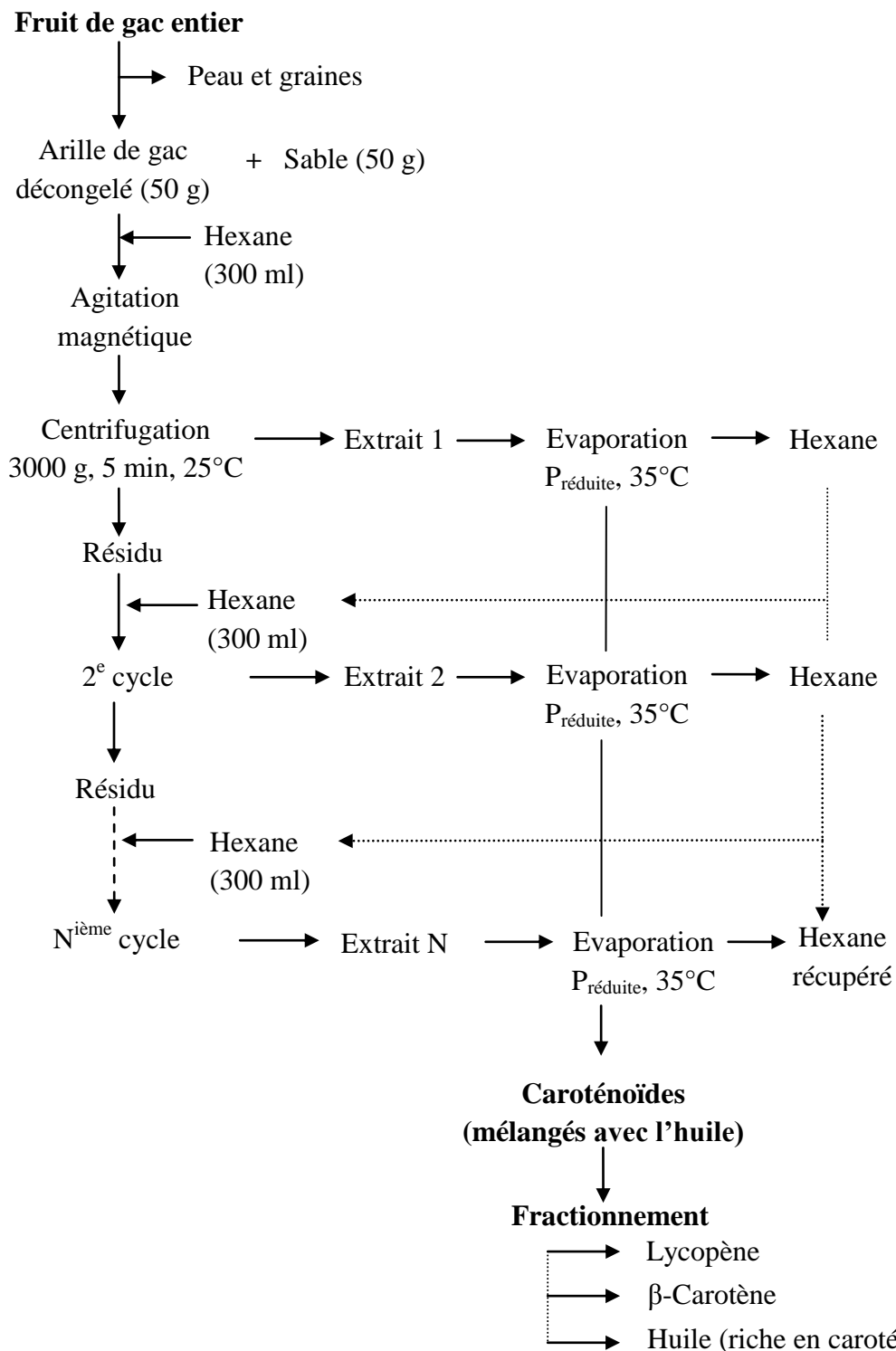


Figure 22 : Schéma de l'extraction par l'hexane et de la purification du lycopène et du β-carotène de l'arille de gac

A l'échelle du laboratoire, 50 g de l'arille de gac sont mélangés avec 50 g de sable de Fontainebleau avant d'ajouter de l'hexane. Le volume de solvant est dans la proportion de 3 : 1 avec le résidu, dans une fiole d'un litre. Pour chaque cycle d'extraction, 300 ml d'hexane sont agités avec 100 g d'arille et du sable pendant 30 min. La phase de solvant riche en caroténoïdes est récupérée par centrifugation à 3000 g, pendant 5 min et à 25°C. Ensuite, le solvant est éliminé de l'extrait puis récupéré par évaporation sous pression réduite (150 mbar) à 35°C. Il est ensuite réutilisé pour les cycles suivants. Après environ dix cycles d'extraction, le résidu est épuisé. Ce procédé d'extraction dit « discontinu », schématisé dans la figure 22, est mis en œuvre dans une chambre climatisée à température inférieure à 25°C et dans l'obscurité pour éviter la perte des caroténoïdes par dégradation.

A la fin du procédé, un mélange de caroténoïdes (lycopène et β -carotène) dans de l'huile de gac est récupéré. Dans le but d'obtenir séparément le lycopène et le β -carotène naturels, l'extrait est passé par une étape supplémentaire appelée « fractionnement ». Cette étape n'est pas détaillée ici en raison du caractère confidentiel du procédé associé, à la demande du projet Natencaps qui désire l'exploiter. Presque 95 % du volume d'hexane utilisé pendant tout le procédé est encore réutilisable pour les extractions suivantes après récupération.

3.2.2.3 Caractérisation des extraits fractionnés de l'arille de gac

Le lycopène et le β -carotène obtenus après fractionnement sont considérés comme les produits finaux de notre procédé. La pureté par rapport aux autres pigments et la qualité de ces produits ont ensuite été évaluées.

a. Spectre d'absorption des produits fractionnés

Les spectres d'absorption des caroténoïdes fractionnés dans l'hexane ont été comparés à ceux des caroténoïdes de meilleures qualités disponibles commercialement (Sigma-Aldrich) comme standard de qualité. Les ratios de *cis* et de structure supramoléculaire sont les paramètres comparatifs. Les figures 23 et 24 montrent que les longueurs d'ondes maximales d'absorption du lycopène et du β -carotène fractionnés par notre procédé sont similaires aux standards des isomères *all-trans* qui sont à 444, 471 et 502 nm pour le lycopène et à 451 et 478 nm pour le β -carotène. De plus, aux longueurs d'onde autour de 360 nm (pour le lycopène) et 340 nm (pour le β -carotène), aucun pic n'a été détecté chez les produits fractionnés, ainsi leur ratio *cis* est considéré comme nul, de même que pour les spectres des caroténoïdes standards.

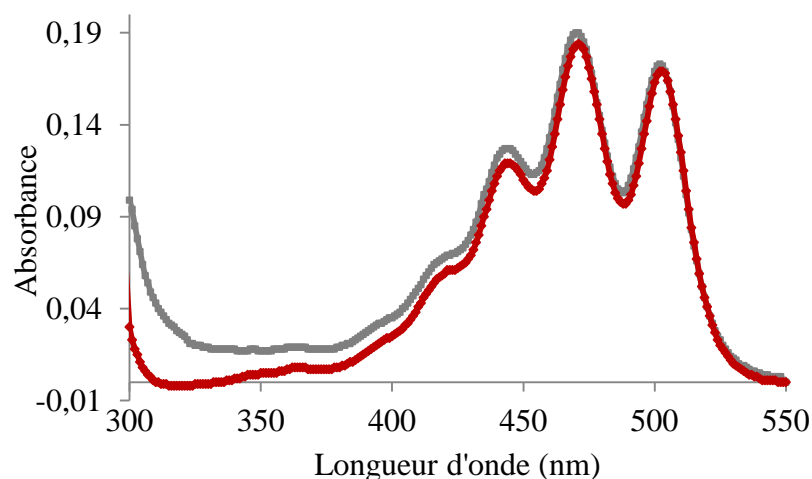


Figure 23 : Absorbance spectrale du lycopène fractionné de l'arille de gac dans l'hexane (en rouge) en comparaison avec le lycopène *all-trans* naturel de Sigma-Aldrich (en gris)

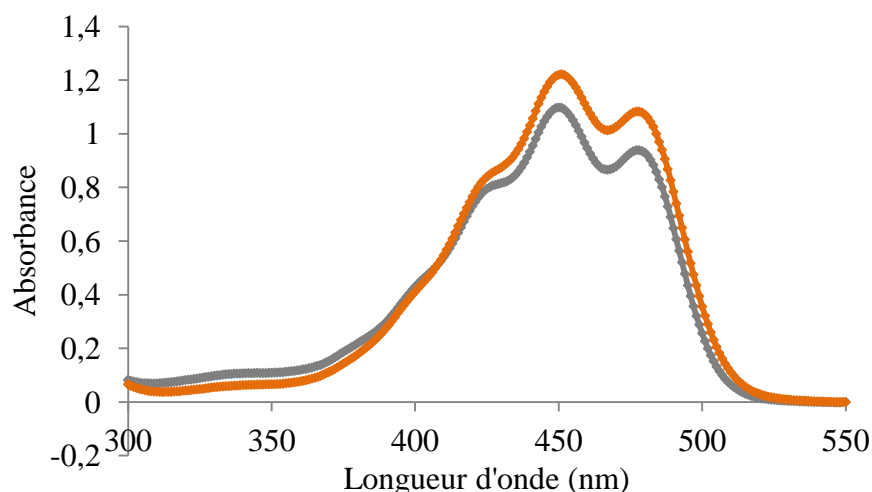


Figure 24 : Absorbance spectrale du β -carotène fractionné de l'arille de gac dans l'hexane (en orange) en comparaison avec le β -carotène *all-trans* de synthèse de Sigma-Aldrich (en gris)

Concernant le ratio de structure supramoléculaire (tableau 11), on voit que le lycopène fractionné a exactement la même structure que le lycopène *all-trans* extrait de la tomate de Sigma-Aldrich (ratio de 81 %). Cependant, le ratio de structure supramoléculaire du β -carotène extrait de gac (34 %) est légèrement plus élevé que celui du β -carotène de synthèse (32 %). Cela signifie que notre produit possède un seul caroténoïde et qu'il a, plus encore que son homologue synthétique, une structure mono-moléculaire. De tout cela, on peut conclure que les caroténoïdes fractionnés sont des isomères *all-trans* et que leur qualité est comparable à celle des standards commercialisés.

Tableau 11 : Ratio de structure supramoléculaire du lycopène et du β -carotène fractionnés de l'arille de gac

% III/II	Lycopène	β-Carotène
Sigma	81	32
Fractionné de l'arille de gac	81	34

b. Analyse HPLC des produits fractionnés

La qualité du lycopène et du β -carotène extraits et fractionnés a ensuite été vérifiée par l'analyse HPLC à 20°C, pendant 30 min avec les gradients d'éluant décrits dans la méthodologie. Dans ces conditions, les isomères de caroténoïdes ont commencé à être séparés à partir de 19,5 min. Le lycopène *all-trans* a été séparé à 25,13 min et le β -carotène *all-trans* à 21,90 min. Les chromatogrammes dans la figure 25 montrent la séparation des caroténoïdes fractionnés par notre procédé. On voit que l'huile a été proprement éliminée de nos produits. Aucun pic d'impuretés n'a été détecté. Pour la fraction du lycopène, un grand pic du lycopène *all-trans*, qui représente 95 % de la solution, a été détecté. Les petits pics correspondant au β -carotène *all-trans* et un lycopène *cis* non-identifié représentent 5 % du total. Dans le cas du β -carotène, seul un grand pic du β -carotène *all-trans* a été détecté, cela veut dire que le β -carotène fractionné par notre procédé est complètement séparé de toute trace de lycopène ou d'isomères *cis* du carotène. Ces résultats nous permettent de conclure que notre procédé a réussi à fractionner proprement le lycopène et le β -carotène en les séparant de l'huile et avec une pureté d'au moins de 95 % d'isomère *all-trans*.

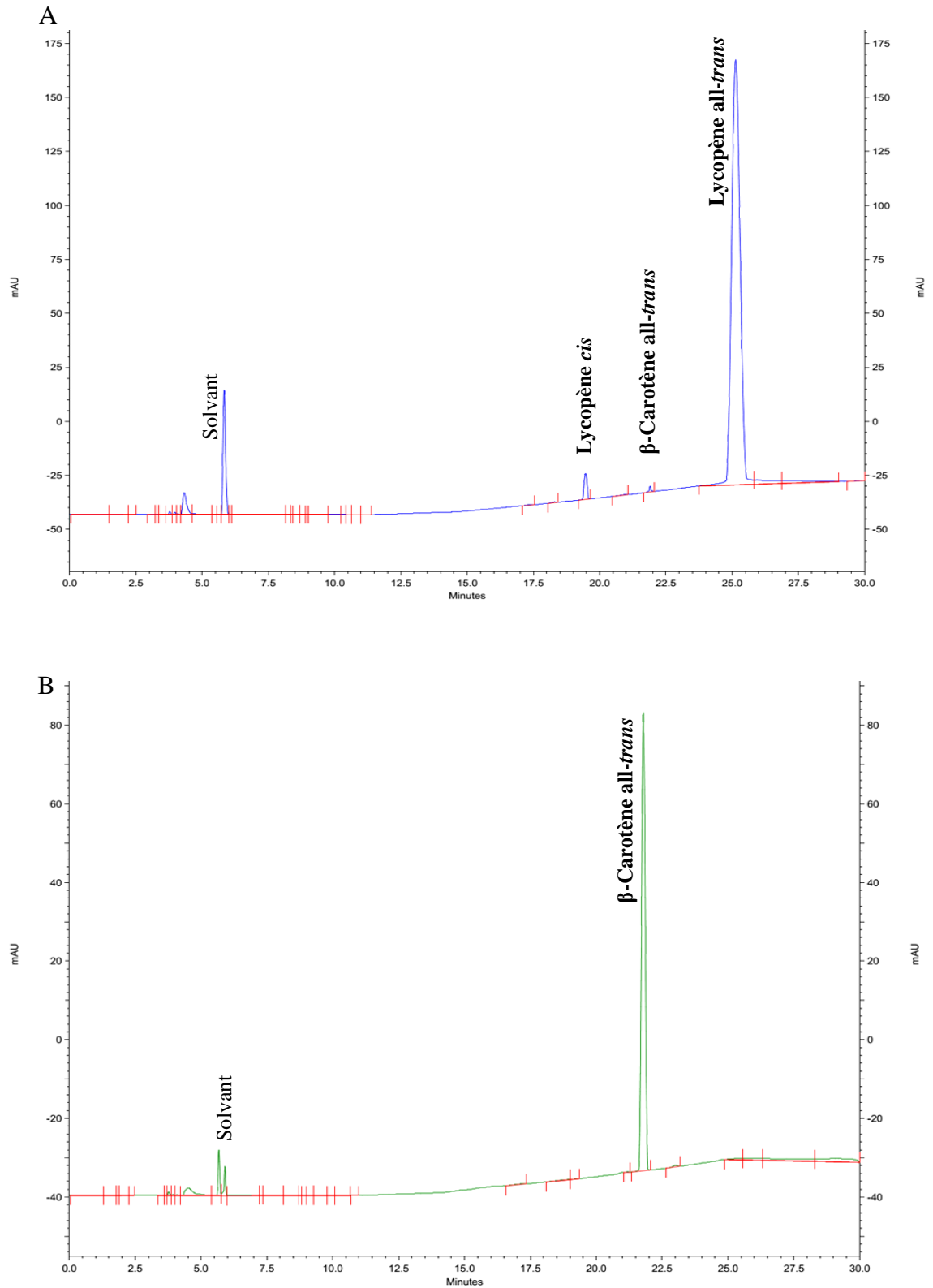


Figure 25 : Chromatogramme HPLC du lycopène (A) et du β -carotène (B) fractionnés à 20°C, 30 min

c. Rendement du fractionnement du lycopène et du β -carotène

Pour évaluer le rendement du procédé, la quantité de caroténoïdes fractionnés et d'huile obtenue a été comparée aux données de la bibliographie. Dans certaines études précédentes sur l'arille de gac, les caroténoïdes ont été extraits et purifiés par plusieurs étapes en utilisant plusieurs solvants (méthanol, dichlorométhane et tétrahydrofurane) avec une petite quantité pour les analyses HPLC (Ishida et al., 2004; Vuong et al., 2006). Le tableau 12 montre que nous avons réussi à fractionner la plupart des caroténoïdes de l'arille de gac, surtout le lycopène dont environ 145 mg ont été fractionnés de 100 g d'arille de gac frais. Le lycopène obtenue est proche de la valeur maximale du lycopène *all-trans* reporté par Ishida et al. (2004). Pourtant, le fractionnement de β -carotène n'est pas encore optimal car son rendement n'a été que de 20 mg pour 100 g d'arille de gac frais.

Tableau 12 : Rendement de l'extraction des caroténoïdes de l'arille de gac (mg/100 g poids frais) en comparaison avec quelques études précédentes

Références	Lycopène	β -Carotène	Huile (%)
Ishida et al. (2004)	190,3 \pm 12,2 (<i>trans</i>)	64,1 \pm 7,1 (<i>trans</i>)	22
Vuong et al. (2006)	40,8 \pm 17,9	8,3 \pm 4	10
Etude actuelle	145,1 \pm 10,5	20,1 \pm 3	14

Les teneurs en lycopène et en β -carotène de l'arille de gac sont aussi dépendantes de la variété de fruit de gac, de la qualité du fruit (mûrissement, région de culture, saison) avant l'extraction et de la méthode d'extraction et d'analyse. C'est pourquoi les résultats sont toujours variables d'une étude à l'autre. La teneur en huile, contenant la majeure partie des caroténoïdes dans l'arille de gac, peut aussi avoir une relation avec la teneur en caroténoïdes dans les matières premières. Dans notre étude, l'arille de gac ne contient que 14 % d'huile en comparaison à 22 % dans l'étude d'Ishida et al. (2004), ce qui pourrait vouloir dire que l'arille de gac utilisé dans notre étude serait moins riche en caroténoïdes que celle de l'autre étude.

d. Huile de gac

Après le fractionnement, l'huile restante est encore très riche en caroténoïdes. Sur 100 g d'arille frais, on peut récupérer 14 g d'huile dont le spectre d'absorption dans l'hexane est présenté dans la figure 26. Les pics maximaux se trouvent à 450 nm et 473 nm, ce qui correspond à la présence de β -carotène et de lycopène. On trouve que le pic du β -carotène est plus élevé que celui du lycopène, ce qui veut dire qu'il y a une majorité de β -carotène dans l'huile par rapport au lycopène. Nous l'avons comparé avec certaines huiles commercialisées à base de gac, tels que les produits Vinaga et Vinadica, qui ont été extraites par pressage thermique, emballées dans des capsules et vendues sur le marché du Vietnam.

D'après les spectres d'absorption, on voit que les caroténoïdes de notre huile n'ont pas été isomérisés tandis que les deux autres huiles présentent certains pics représentatifs de la présence d'isomères *cis* entre 340 et 360 nm de longueur d'onde. Les traitements drastiques de l'extraction industrielle ont sans doute changé la qualité des caroténoïdes du gac. D'autre part, le stockage à température ambiante peut aussi être la cause de la perte de qualité des huiles du marché malgré l'encapsulation. Ces observations nous permettent de déduire que les caroténoïdes de l'huile de gac obtenue par notre procédé sont de bonne qualité et qu'il y a plus de β -carotène que de lycopène.

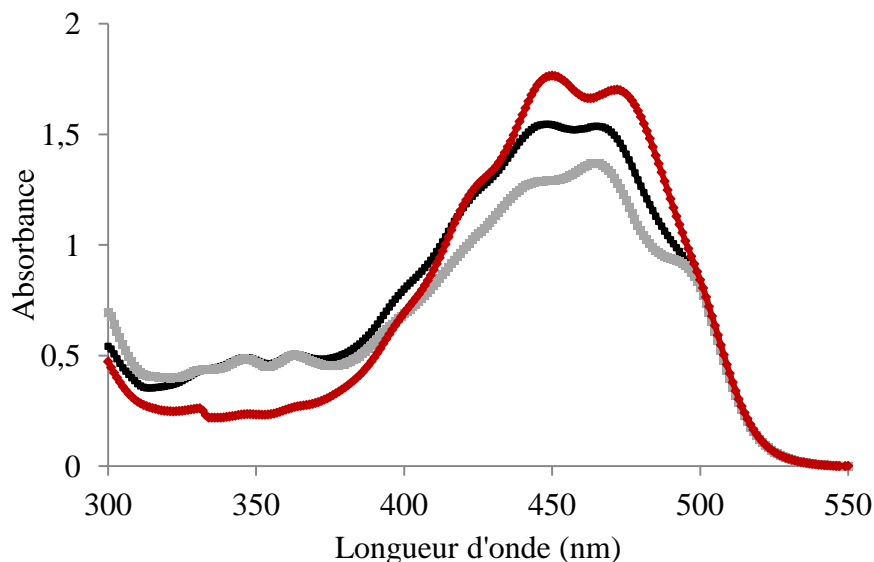


Figure 26 : Absorbance spectrale de l'huile de gac après le procédé d'extraction fractionnée dans l'hexane (en rouge) en comparaison avec des huiles commerciales, Vinaga (en noir) et Vinadica (en gris), provenant du Vietnam

3.2.3 Conclusion

Nous avons réussi à extraire séparément le lycopène et le β -carotène de l'arille de gac par une méthode douce d'extraction au solvant et de fractionnement pour protéger les isomères d'origine. Dans le fruit de gac, le lycopène et le β -carotène sont majoritairement sous forme d'isomères *all-trans* et se localisent dans les gouttelettes lipidiques des tissus de gac. Durant l'extraction, les caroténoïdes avec l'huile se dissolvent dans le solvant et se libèrent des cellules végétales cassées. Malgré l'utilisation d'un solvant peu écologique, notre procédé permet de réduire sa consommation car la plupart du solvant utilisé a été récupérée par évaporation pour être réutilisé. La technique d'extraction assistée par du sable est efficace et convient à l'extraction de l'arille de gac.

Notre procédé de fractionnement s'est révélé être une étape innovante pour séparer le lycopène *all-trans* et le β -carotène *all-trans* de l'huile de gac. Le rendement de fractionnement du β -carotène est moins élevé que celui du lycopène parce que le β -carotène est plus soluble dans l'huile et n'a donc pas encore été entièrement fractionné. Les analyses de spectres par spectrométrie UV-visible et HPLC ont montré que le lycopène et le β -carotène fractionnés présentent une haute qualité et pureté. De 100 g d'arille frais, nous avons fractionné 145 mg de lycopène *all-trans*, 20 mg de β -carotène *all-trans* et 14 mg d'huile riche en caroténoïdes.

Ce procédé simple et doux permet d'extraire les caroténoïdes de l'arille de gac en conservant leur qualité. Pour la suite de ce travail, la stabilité, les propriétés antioxydantes et la bio-activité du lycopène et du β -carotène extraits et fractionnés seront évalués. L'huile récupérée, ne constituant pas un objectif prioritaire de notre travail, ne sera pas analysée dans les prochaines parties.

3.3 STABILITE ET BIO-ACTIVITE DU LYCOPENE FRACTIONNE DE L'ARILLE DE GAC

3.3.1 Rappel bibliographique

3.3.1.1 Stabilité thermique du lycopène

Le lycopène est connu pour être très sensible à l'oxydation dont la vitesse dépend de la température de l'environnement réactionnel. Plus la température est élevée, plus les oxydants sont actifs et l'oxydation se passe plus rapidement. C'est pourquoi les procédés avec traitement thermique sont toujours limités pour l'extraction et le stockage du lycopène. Le traitement thermique du lycopène doit se faire sur un temps court pour éviter sa dégradation. Beaucoup d'études sur la stabilité thermique du lycopène ont été réalisées dans des milieux différents tels que des solvants organiques (Lee et al., 2002), une émulsion d'huile dans l'eau (Ax et al., 2003), de l'huile végétale (Mayer-Miebach et al., 2005) et des tissus végétaux de tomate (Shi et al., 2003; Colle et al., 2010). La sensibilité du lycopène à la température est différente suivant ces milieux. L'étude bibliographique montre que le lycopène localisé dans les matrices de tomate est plus stable que celui dissout dans l'huile ou dans un solvant organique pendant les traitements thermiques (Hackett et al., 2004). L'isomérisation et la dégradation du lycopène dans l'huile et dans un solvant peuvent se passer plus rapidement que dans les tissus végétaux. Pourtant, le lycopène dans la tomate sèche en poudre peut aussi être significativement dégradé pendant le stockage à température douce, avec une perte d'environ 50 % après 20 jours à 40°C (Baloch et al., 1997) ou de plus de 70 % après 90 jours à 37°C (Zanoni et al., 1998) sans lumière et sous air.

Sous l'effet de la température, le lycopène est souvent isomérisé avant d'être dégradé. Cela dépend non seulement de la nature des milieux réactionnels mais aussi de la température et de la durée du traitement. Dans les études antérieures, le lycopène est souvent traité à des températures variant de 25°C à 150°C pour des durées différentes. En fonction de ces conditions, les effets sur son isomérisation et sa dégradation peuvent être différents. Le tableau 13 récapitule certains résultats rapportés par plusieurs études différentes sur le traitement thermique du lycopène. Dans la plupart de ces études, le lycopène traité a été « encapsulé » dans l'émulsion, l'huile ou des tissus de tomate, il a été plutôt isomérisé que dégradé lors du chauffage de 50 à 90°C pour une courte durée. Au-

delà de cet intervalle de température ou pour une durée plus longue, le lycopène peut être dégradé.

Tableau 13 : Synthèse des principaux résultats bibliographiques concernant l'isomérisation et la dégradation du lycopène en fonction des conditions de traitement thermique

T°C	Temps	Isomérisation	Dégradation	Milieu de traitement	Références
25	30 h	-	+	Emulsion H/E, sans O ₂	Ax et al. (2003)
50-60	30 min	x- <i>Cis</i>	-	Pulpe de tomate	Colle et al. (2010)
	3 h	9- <i>Cis</i> (léger)	-	Lycopène séché	Lee et al. (2002)
	18 h	-	++		
70-90	2 h	9- <i>Cis</i>	+	Emulsion H/E, sans O ₂	Ax et al. (2003)
	30 min	13- <i>Cis</i>	-	Tomate dans l'huile d'olive	Colle et al. (2010)
	10 min	13- <i>Cis</i> , 9- <i>Cis</i> (léger)	-	Purée de tomate avec de l'huile	Knockaert et al. (2012)
100-120	30 min	9- <i>Cis</i> (léger)	+	Végétal brut, sans O ₂	Mayer-Miebach et al. (2005)
	30 min	9- <i>Cis</i> , 15- <i>Cis</i>	++	Végétal brut dans l'huile, sans O ₂	
	40 min	-	+++	Lycopène séché	Lee et al. (2002)
	10 min	13- <i>Cis</i> , 9- <i>Cis</i>	+	Purée de tomate avec de l'huile	Colle et al. (2010), Knockaert et al. (2012)
130-150	3 min	-	+++	Lycopène séché	Lee et al. (2002)

'+' : niveau de dégradation ; '-' : pas d'isomérisation, pas de dégradation ; x-*cis* : isomère *cis* non déterminé ; « léger » : avec une petite quantité

D'autre part, la stabilité thermodynamique des isomères de lycopène dépend également de leur énergie relative par rapport à l'all-*trans*-isomère, ce qui est illustré par la figure 27. Plus cette valeur est élevée, moins le *cis*-isomère est stable. A partir des résultats de cette étude de Chasse et al. (2001), la stabilité énergétique de certains isomères du lycopène est classée dans l'ordre suivant: 5-*cis* > all-*trans* > 9-*cis* > 13-*cis* > 15-*cis* > 7-*cis* > 11-*cis*. Dans la nature, le lycopène est souvent sous la forme de l'isomère le plus stable, surtout all-*trans*. Malgré la plus forte stabilité, la forme de 5-*cis* isomère y est rarement trouvée. Seul une petite quantité de ce dernier *cis*-isomère a été détectée dans la tomate et leurs dérivés (Lee et al., 2002; Colle et al., 2010). Parmi les isomères ci-dessus, les 9-*cis*, 13-*cis* et 15-*cis* sont les plus fréquemment identifiés dans les traitements thermiques du lycopène.

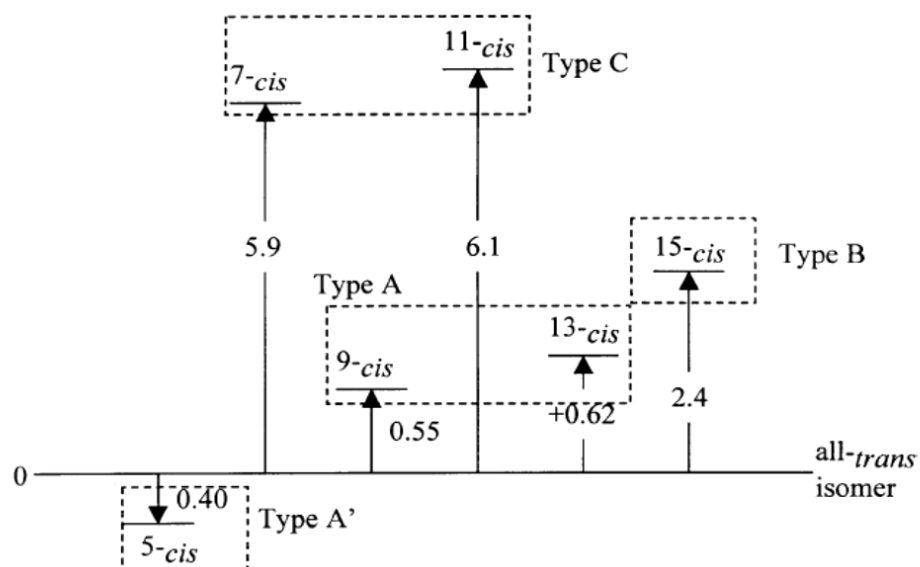


Figure 27 : Illustration schématique des énergies relatives (kcal.mol⁻¹) de certains *cis*-isomères du lycopène par rapport à la forme *all-trans* (Chasse et al., 2001)

Dans notre étude, le lycopène extrait de l'arille et fractionné comme décrit dans la partie précédente, est d'une grande pureté. Sa stabilité thermique a été testée directement dans l'hexane à deux températures, 50 et 80°C, auxquelles il semble que la stabilité du lycopène commence à être changée. Les caractéristiques physico-chimiques initiales du lycopène étudié sont comparables à celles du lycopène naturel de Sigma (données en Annexe).

3.3.1.2 Incohérence de la capacité antioxydante du lycopène

Le potentiel chimio-préventif du lycopène peut être expliqué par son activité forte d’extinction de l’oxygène singlet. Une chaîne de 11 doubles liaisons conjuguées et deux non conjuguées dans sa structure chimique rend le lycopène plus vulnérable aux réactifs électrophiles comme l’oxygène et les radicaux libres. En général, comme les autres caroténoïdes, le lycopène peut réagir avec les radicaux libres par les trois chemins principaux qui sont le transfert d’électron, l’abstraction d’hydrogène et l’addition de radicaux (Young et al., 2001). D’autre part, le lycopène pourrait aussi régénérer les vitamines antioxydantes à partir de leurs radicaux comme ceux du δ -tocophérol (Bast et al., 1998). Après cette réaction, le lycopène se transformerait en cations radicaux qui réagiraient et formeraient des produits plus stables en l’absence de tocophérol (Mortensen et al., 1997). Les réactions potentielles de l’activité antioxydante du lycopène sont résumées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Réactions liées à l’effet antioxydant du lycopène (Kelkel et al., 2011)

Réactions potentielles	Equation de réaction
Extinction de l’oxygène singlet	${}^1\text{O}_2 + \text{LYC} \rightarrow {}^3\text{O}_2 + {}^3\text{LYC}$ ${}^3\text{LYC} \rightarrow \text{LYC} + \text{chaleur}$
Réaction avec les radicaux libres :	
<i>Transfer d’électron</i>	$\text{ROO}^\bullet + \text{LYC} \rightarrow \text{ROO}^- + \text{LYC}^{++}$
<i>Conception d’hydrogène</i>	$\text{ROO}^\bullet + \text{LYC} \rightarrow \text{ROOH} + \text{LYC}^\bullet$
<i>Addition de radical</i>	$\text{ROO}^\bullet + \text{LYC} \rightarrow (\text{ROO-LYC})^\bullet$
Régénération des vitamines antioxydantes à partir de leurs radicaux	$\text{LYC} + \text{TO}^\bullet + \text{H}^+ \rightarrow \text{LYC}^{++} + \text{TOH}$ $\text{LYC}^{++} + \text{LYC}^{\bullet+} \rightarrow \text{produits}$

LYC : lycopène ; LYC^{++} : radical cationique de lycopène; ${}^3\text{LYC}$: lycopène à état triplet ; TOH : tocophérol ; TO^\bullet : radicaux de tocophérol ; ${}^1\text{O}_2$: oxygène à état singlet ; ${}^3\text{O}_2$: oxygène à état triplet

La propriété antioxydante puissante du lycopène est connue depuis quelques dizaines d’années grâce à sa capacité à réduire les facteurs oxydatifs dans plusieurs études *in vitro*. Les tests chimiques ont montré qu’il présente une activité antioxydante deux fois supérieure à celle du β -carotène et trois fois supérieure à celle de certains xanthophylles (Böhm et al., 2001). Certains *cis*-isomères du lycopène sont plus actifs que leur forme all-

trans (Miller et al., 1996). *In vitro*, le traitement des cellules avec du lycopène a arrêté sélectivement le développement des cellules cancéreuses de la prostate et du sein en provoquant une apoptose de ces cellules sans influencer les cellules normales (Soares et al., 2013; Uppala et al., 2013; Gloria et al., 2014). Une relation entre l'allègement de stress oxydatifs et la présence de lycopène a été également trouvée (Kim et al., 2011; Liu et al., 2013).

Récemment, des études *in vivo* sur une alimentation régulière riche en lycopènes ont montré que le lycopène peut inhiber le développement de cancers des poumons (Kim et al., 2000), de la prostate (Zu, Mucci et al. 2014), de l'ovaire (Xinli et al., 2014) et du côlon (Tang et al., 2011). Le lycopène a également été relié à la diminution des risques de certains cancers comme les cancers du sein (Hultén et al., 2001), du foie (Astorg et al., 1997; Bernal et al., 2013) et à la réduction de stress oxydatifs chez les poissons (Yonar 2013).

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré la capacité antioxydante du lycopène sur la prévention de divers cancers (Trejo-Solís et al., 2013). Pourtant, elle n'a pas été prouvée dans certains cas de cancer prostatique (Erdman Jr et al., 2009; Ilic et al., 2011; van Breemen et al., 2011). L'effet négligeable du lycopène dans ces derniers tests peut être expliqué par les réponses différentes des sujets des expériences au stress oxydatifs ou par la concentration de lycopène absorbé qui pourrait être insuffisante pour avoir un effet significatif. Des dommages sur l'ADN des cellules HT29 sous l'effet du lycopène ont aussi été identifiés, qui peuvent-être liés à l'état de transition en prooxydant du lycopène à haute concentration (Lowe et al., 1999). *In vitro*, il a été montré qu'à 10 μM , le lycopène devenait prooxydant à cause de l'apparition de produits oxydatifs sous l'effet d'une forte attaque par irradiation ultraviolette (Yeh et al., 2005). Dans un milieu riche en triglycérides, l'ajout d'environ 50 μM de lycopène peut faire augmenter la quantité d'hydro-péroxydes, produits de la peroxydation sous l'effet de la lumière à température ambiante (Jomová et al., 2012). Parallèlement, l'activité du lycopène dépend également de l'hydrophobie des radicaux libres dans le milieu. A concentration élevée (20 μM), le lycopène possédait une propriété antioxydante envers la peroxydation des lipides causée par le générateur de radicaux libres hydrophiles, mais il devenait prooxydant avec des radicaux générés par l'initiateur lipophile (Yeh et al., 2000).

En conclusion, le lycopène est une substance séduisante pour son effet anti-cancérogène qui a été prouvé dans plusieurs études différentes depuis longtemps. Pourtant,

dans certaines expérimentations, il reste toujours un doute sur son effet antioxydant qui peut avoir une relation avec sa forme d'isomère, sa concentration et la nature des oxydants dans le milieu réactionnel.

3.3.2 Effet du traitement thermique sur l'isomérisation et l'augmentation de la propriété antioxydante du lycopène de l'arille de gac

A partir des connaissances acquises dans la partie précédente sur l'isomérisation et les propriétés antioxydantes/pro-oxydantes du lycopène, le traitement thermique, classiquement employé dans les procédés d'extraction et de formulation, a été utilisé pour étudier la stabilité du lycopène de l'arille de gac. Sa propriété antioxydante a également été étudiée en lien avec son isomérisation. Nos résultats, présentés dans la troisième partie, indiquent que l'isomérisation est la seule transformation détectée du lycopène dans l'hexane à température inférieure à 100°C, et ses multiples isomères présentent des pouvoirs antioxydants différents. Ces résultats sont consignés dans l'article intitulé : « **Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV-Vis spectra as a marker** ». Le contrôle de la température et de la durée du chauffage nous a permis d'avoir plusieurs *cis*-isomères qui ont provoqué une activité antioxydante plus puissante que l'*all-trans*-isomère. Les observations sur la capacité antioxydante des isomères de lycopène ont été évaluées par le test TEAC. D'autre part, cet article a abordé pour la première fois l'analyse des ratios spectroscopiques du mélange des différents isomères du lycopène en combinaison avec son activité antioxydante. Cette dernière analyse a validé une méthode simple pour étudier l'évolution de l'isomérisation du lycopène durant le traitement thermique.

La bio-activité du lycopène extrait de l'arille de gac sera présentée et discutée à la suite de cette partie.

Article 2 : Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV–Vis spectra as a marker

Hanh Phan-Thi, Yves Waché

Food Chemistry 156(2014) 58-63

Titre: Isomérisation et augmentation des propriétés antioxydantes du lycopène extrait de *Momordica cochinchinensis* (gac) par traitement thermique modéré. Spectres UV-visibles utilisés comme marqueur

Résumé: *Momordica cochinchinensis* (gac) est un fruit riche en lycopène. Ce pigment tend à se dissoudre dans l'huile et est facilement endommagé pendant l'extraction. L'impact du traitement thermique sur la *cis*-isomérisation du lycopène libéré de l'huile a été étudié à 50 et 80°C pendant 240 minutes dans l'hexane par spectrométrie UV-visible, DAD-HPLC et par le test TEAC. Les isomères *all-trans* dans la solution initiale ont été isomérisés en 13-*cis*-isomères plus rapidement à 80°C qu'à 50°C. Après ce traitement thermique, 16 % des lycopènes dans la solution se sont retrouvés sous forme 9-*cis*. Ce dernier isomère a provoqué une augmentation des propriétés antioxydantes qui a été détectée à partir d'une concentration d'environ 9 % et a résulté en un changement de 2,4 à 3,7 µmol de Trolox équivalent. Il est ainsi possible d'augmenter la bio-activité du lycopène par un chauffage contrôlé. L'évolution des ratios calculés en se basant sur le spectre d'UV-visible global est représentative de la *cis*-isomérisation et la spectrométrie peut ainsi constituer une méthode simple pour évaluer l'état d'isomérisation des solutions de lycopène.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment with UV–Vis spectra as a marker



Hanh Phan-Thi*, Yves Waché

UMRA PAM (Food and Microbial Process), AgroSup Dijon, University of Burgundy and Natencaps, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2013

Received in revised form 5 December 2013

Accepted 14 January 2014

Available online 23 January 2014

Keywords:

Momordica cochinchinensis (gac)

Natural carotenoids

Lycopene

Extraction

Isomerization

Heat treatment

Antioxidant

Marker

ABSTRACT

Momordica cochinchinensis (gac) is a plant rich in lycopene. This pigment tends to solubilize in oil and get damaged during extraction. The impact of heating on *cis*-isomerization of oil-free lycopene in hexane was studied at 50 and 80 °C during 240 min with UV–Vis spectrometry, DAD–HPLC and TEAC test. The initial all-*trans*-form isomerized to the 13-*cis* isomer more rapidly at 80 °C. After this treatment, 16% of the lycopene compounds were in the 9-*cis*-form. This isomer triggered an increase in the antioxidant properties which was detectable from concentrations above 9% and resulted in a change from 2.4 to 3.7 μmol Trolox equivalent. It is thus possible to increase the bioactivity of lycopene samples by controlling heating. The evolution of ratios calculated from the global UV–Vis spectrum was representative of *cis*-isomerization and spectrometry can thus be a simple way to evaluate the state of isomerization of lycopene solutions.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Carotenoids are important compounds in food as they can be used as colours, provitamin A or antioxidants and provide several interesting health benefits. Lycopene is a natural pigment that contributes to the red colour of many fresh fruits. This carotenoid is a non-provitamin A with potent antioxidant activity. In comparison with β-carotene and certain xanthophylls, lycopene is more antioxidant (Böhm, Puspitasari-Nienaber, Ferruzzi, & Schwartz, 2001; Cao-Hoang, Phan-Thi, Osorio-Puentes, & Waché, 2011; Miller, Sampson, Candeias, Bramley, & Rice-Evans, 1996). The interest in lycopene and its potential cancer preventing properties are known and have been studied for 20 years (Clinton et al., 1996). However, the different isomers of lycopene behave differently, particularly concerning their bioavailability. It was suggested that *cis*-lycopenes may be better absorbed than the all-*trans* parent structure (Britton, 1995; Stahl, Schwarz, Sundquist, & Sies, 1992). This may be explained by a greater solubility of *cis*-isomers as observed in bile acid micelles (Boileau, Merchen, Wasson, Atkinson, & Erdman,

1999), and this could explain why in serum and tissues, lycopene is more than 50% *cis*-lycopene contrasting with the composition of food sources (Clinton et al., 1996).

Momordica cochinchinensis (gac) is considered as a fruit with a high nutritional potential, a “superfruit” popular in Vietnam for its health benefits and for its use in traditional cooking. This fruit is particularly rich in lycopene (Aoki, Kieu, Kuze, Tomisaka, & Chu-yen, 2002; Ishida et al., 2004; Vuong, Franke, Custer, & Murphy, 2006). The extraction of lycopene from this “fruit from heaven” demands moderate condition because this pigment is very prone to oxidative degradation (Cao-Hoang et al., 2011; Mortensen, 2006). Dehydration of gac aril by moderate heat causes lycopene losses exceeding 36% in comparison with freeze drying (Tran, Nguyen, Zabarás, & Vu, 2008). In gac oil also, carotenoids are quickly degraded under high temperature storage conditions (Nhung, Bung, Ha, & Phong, 2010). Natural lycopene is extracted from plant tissues with heat treatment to decrease enzymatic activity or to disrupt tissues for facilitating pigment extraction. However, heat processing may be responsible for carotenoid isomerization (Schieber & Carle, 2005) and degradation (Graziani et al., 2003). The effect of heating has been studied on tomatoes that are also a fruit rich in lycopene. It has been shown that heating leads to an improvement in nutritional quality and an increase in carotenoid bioavailability in processed tomato products. Lycopene uptake by

* Corresponding author. Address: Laboratoire de Procédés Alimentaires et Microbiologiques, AgroSup Dijon, Université de Bourgogne, 1 Esplanade Erasme, F-21000 Dijon, France. Tel.: +33 (0) 380 77 23 94; fax: +33 (0) 380 77 23 84.

E-mail address: phanhanh.ub@gmail.com (H. Phan-Thi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.040>

0308-8146/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

humans is greater from heat-processed than from unprocessed tomato-oil mixtures (Stahl & Sies, 1992). Despite the fact that isomerization is the first step of carotenoid degradation, *cis*-isomers, which are formed during processing, are better absorbed than all-*trans* compounds (Achir, Randriantoandro, Bohuon, Laffargue, & Avallone, 2010; Boileau et al., 1999; Stahl & Sies, 1992). It is therefore possible that the higher lycopene absorption from *cis* isomer-rich products is due to higher temperature treatments (Unlua et al., 2007).

In nature, lycopene occurs mostly in the all-*trans* form, but *cis*-isomers may be more bioavailable. Controlling heating during extraction could result in lycopene with higher bioavailability and bioefficacy. Until now, the stability of lycopene from gac fruit has been mainly studied in its oil or in its crude tissues. Moreover, the antioxidant property of gac extracts has already been mainly related to the phenolic content of this fruit (Kubola & Siriamornpun, 2011). With the objective to use gac lycopene as a nutritional supplement, the current work aimed to study the isomerization of solvent-extracted lycopene from gac during mild heat treatments (50 and 80 °C) in hexane, controlling the isomeric state of lycopene, and relating this structural parameter to the antioxidant activity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Gac fruit was purchased from different markets in northern Vietnam. The seed pulp was removed from the cavity of the fruit and stored at –20 °C until extracted and analysed.

2.2. Solvent extraction

n-Hexane (from Sigma–Aldrich) was used as organic solvent to extract the lycopene from the gac aril. 10 g of de-frozen gac aril (weighed by a Precisa PJ3100CD balance) were mixed with Fontainebleau sand before being dispersed in solvent (300 ml). This paste of sand-gac aril was stirred in hexane with a magnetic bar in an Erlenmeyer flask at room temperature (under 25 °C) in the dark for 15 min. The solvent process was repeated about 6 times until the aril material lost its colour. After extraction, hexane was removed from the fraction containing lycopene by rotary evaporation under reduced pressure at 35 °C. The extracted lycopene was stored at –20 °C before experiments.

2.3. Heating experiments

Each 2 ml sample of lycopene in *n*-hexane was poured in 14 ml Pyrex glass tubes sealed by a cap with an organic solvent-resistant joint. The high headspace in the tubes was to reduce the developing pressure as *n*-hexane boils. In this experiment, two groups of 400 mg/l lycopene solutions were exposed to 50 and 80 °C in a bain-marie for 0, 60, 120, 180 and 240 min, respectively. Heat treatment experiments were carried out in the dark in triplicate.

2.4. UV–Vis spectrometry

After dilution in *n*-hexane (1:100), the absorbance of the samples was measured in an UV–Vis spectrophotometer (Shimadzu, UV-1650 PC, Tokyo, Japan) between 300 and 550 nm at sampling intervals of 1 nm with a medium scan rate.

Cis-isomers were identified by a λ_{\max} lower than those of all-*trans*-carotenoids and by the presence of the “*cis*” peak at the near-UV maximum (around 360 nm for lycopene). The location of the *cis*-double bond was indicated by the $\%A_B/A_{II}$, which is the ratio

of the height of the “*cis*” peak, designated A_B , to that of the middle main absorption peak, designated A_{II} . This ratio is an indicator of the intensity of the “*cis*” peak, which is greater as the *cis*-double bond is closer to the centre of the molecule.

The spectral fine structure of lycopene after treatment was characterized by the large value of $\%III/II$, which is the ratio of the height of the longest-wavelength absorption peak (A_{III}), designated III, to that of the middle absorption peak (A_{II}), designated II, relative to the valley peak between them multiplied by 100. This value can be equal to 0 if the peak A_{III} is present only as a shoulder (Cao-Hoang, Fougère, & Waché, 2011).

2.5. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)

The antioxidant activity of lycopene solutions was measured spectrophotometrically using the TEAC assay. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and potassium peroxodisulfate were obtained from Sigma–Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). All solvents used were of analytical grade.

The ABTS^{•+} radical cation solution was prepared by mixing 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate in HPLC grade water. This solution was then stored for 16 h in the dark at room temperature before use. An ABTS^{•+} working solution was prepared immediately before use by diluting the solution with methanol to an absorbance of 0.7 ± 0.01 at 734 nm. Trolox prepared at 1 mg/ml in methanol for stock solution was used as an antioxidant standard. The reaction was incubated at 30 °C for 6 min. The absorbance was measured at 734 nm using methanol as blank. The lycopene stock concentration was prepared at 25 ± 0.5 mg/l in hexane for testing at about 1.25 mg/l in the reaction medium. Each sample was analysed in triplicate.

2.6. DAD–HPLC

Lycopene was analysed using the LaChrom Elite HPLC system (Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, USA) equipped with the L-2130 pump, an automatic injector and the L-2455 diode array detector (DAD). The Acclaim™ C30 column (C30, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Dionex, ThermoScientific) was employed to analyse lycopene samples at 10 °C according to the guide from supplier. A solvent system of methyl-*tert*-butyl ether, acetonitrile and methanol (50:15:35, v/v/v) was used as mobile phase. The flow rate was 1.0 ml/min and the detection wavelength was set to 220–600 nm. All samples were diluted ten times with *n*-hexane for injection. Isomers of lycopene were identified by comparison of the separated isomer retention time and spectrum with characteristics obtained from standard for all-*trans* lycopene (from Sigma, Sigma–Aldrich, St.-Quentin-Fallavier, France) or identification data reported in the literature (Ishida, Ma, & Chan, 2001; Mercadante, Steck, & Pfander, 1998; Müller, Pietsch, Faccin, Schierle, & Waysek, 2008). Identification data from the spectrum were those described above (λ_{\max} , “*cis*” peak and $\%A_B/A_{II}$).

The distribution percentage of lycopene isomers in the samples was determined from the percentage of the area of the compounds in the total area.

2.7. Statistical analysis

All results are given as mean \pm standard deviation. Differences between variables were tested for significance using a one way ANOVA.

3. Results

3.1. Characterisation of gac lycopene through its isomerization spectra

Investigation on the stability of gac lycopene was carried out spectroscopically during moderate heat treatment. The UV–Vis spectrum was first used to confirm the isomer form of lycopene extracted from gac. The black spectrum in Fig. 1 shows that gac lycopene was in the all-*trans*-form after the extraction process. When dissolved in *n*-hexane, the absorption spectrum of gac all-*trans*-lycopene exhibited three maxima at wavelengths 444, 471 and 503 nm. The isomerization of gac lycopene submitted to heating can be seen in the modification of the UV–Vis spectrum after the treatment. The effect of *trans*-to-*cis* isomerization can be seen in the UV region through the dramatic rise of a peak at 362 nm for *cis*-lycopene and in a blue-shift (toward shorter wavelengths) of 2–5 nm for each maximum as reported previously (Tan & Soderstrom, 1989). The change of the peak wavelengths of lycopene as a function of the heat treatment is presented in Table 1.

3.2. Effect of heat treatment on isomerization of gac lycopene

Changes in UV–Vis absorption spectra were recorded during gac lycopene isomerization. The ratios of *cis* peak and fine structure defined above were used to study isomerization of gac lycopene when submitted to heat treatment. Regarding the *cis* ratio evolution (Fig. 2A), lycopene isomerization at 80 °C was more rapid than at the 50 °C treatment. The global *cis* ratio evolution rate was rapidly superior at 0.3% per minute during the first 60 min at the higher temperature, as opposed to 0.06% per minute at 50 °C. However, after 60 min, the rate of isomerization decreased to zero and the ratio was stable for 180 min for the 80 °C-treatment, whereas for the 50 °C solution, the *cis* ratio continued to increase linearly.

The global fine structure ratio (Fig. 2B) decreased during isomerization from the initial value recorded from the all-*trans*-lycopene extracted from gac (%III/II = 82) to 53% at 80 °C, but only to 72% at 50 °C after 240 min of treatment. At the higher temperature, this ratio collapsed after a few minutes of treatment. During the first 60 min, the rate of the fine structure ratio decrease of samples submitted to 80 °C was 0.38% per minute, compared with 0.05% per minute at 50 °C. After that time, the rate of evolution of the ratio remained almost unchanged at 50 °C (about 0.04% per minute), whereas it decreased to 0.03% per minute for 80 °C. There was no stable period in the fine structure ratio evolution at either heat treatment temperature, contrasting with the *cis*-ratio evolution. The kinetics of the *cis*- and fine structure ratios showed a temperature and time-dependent isomerization of lycopene submitted to heat treatment. Our results show that the isomerization of

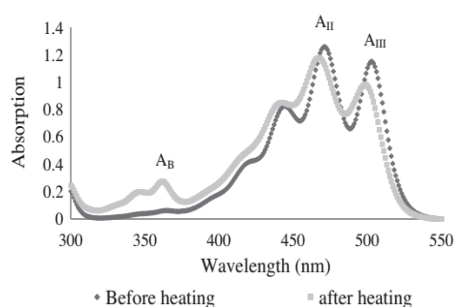


Fig. 1. UV–Vis absorption spectra of gac lycopene before (♦) and after (■) heat treatment in hexane. The apparition of the *cis*-peak at 360 nm (A_B) for the after-heat treatment spectrum also exhibits a blue-shift of 2–5 nm in comparison with the before-heat treatment spectrum.

Table 1

Spectrum maxima wavelengths (nm) of lycopene solutions before and after heating at 50 °C and 80 °C.

Peak	Cis A_B	A_{II}	Valley	A_{III}
Before heating	–	471	489	503
After heating				
50 °C	362	470	487	502
80 °C	362	467	485	499

lycopene took place in a significantly different way between the heat treatments at 80 °C or 50 °C.

3.3. Effect of heating on the antioxidant capacity of gac lycopene

The antioxidant property of lycopene submitted to the heat treatments was investigated with a chemical test comparing the antioxidant effect with that of Trolox and giving the results as Trolox equivalent (TE). The evolution of the antioxidant capacity of the mixture of lycopene isomers during heat treatments is shown in Fig. 3. Results show that one micromole of all-*trans*-lycopene was equivalent to 2.4 μ mol of Trolox. During heat treatment, this value increased to 3.7 μ mol of TE as a maximum. At higher temperature, the antioxidant capacity increase was significantly faster than that at 50 °C. The TEAC value of the mixture of *cis*-isomers for the 80 °C treatment increased significantly during the first 120 min of heating ($p < 0.05$). Meanwhile, no significant increase ($p > 0.05$) in antioxidant activity was observed for the 50 °C treatment up to 180 min, but a significant difference was observed after 240 min in comparison with the untreated sample.

3.4. Identification of lycopene isomers by DAD–HPLC

The effect of heating on *trans*–*cis*-isomerization of gac lycopene was further studied by HPLC. Table 2 shows the identification data of *cis*-lycopenes separated by DAD–HPLC. Separation was completed within 45 min for all lycopene isomers. Isomers could be identified by their retention time, the main peak wavelengths, the *cis*-peak ratio $\%A_B/A_{II}$ and/or the fine structure ratio %III/II. By comparing reported ratio values and retention time with references from Mercadante et al. (1998) and Müller et al. (2008), we identified the all-*trans*-, 13-*cis*-, 9-*cis*- and 15-*cis*-lycopene and noticed some *cis*-isomers that we could not identify in the treated samples. These results are in agreement with the study of Rao and Agarwal (1999). There were some small differences between our data and references and these could be caused by differences in the HPLC column, solvent and lycopene source qualities. In this study, amongst *cis*-lycopene isomers, 9-*cis*-, 13-*cis*- and 15-*cis*- isomers were identified by their *cis* ratio which was (in %) 14.4 ± 0.6 , 58.2 ± 0.2 and 73.5 ± 2.1 , respectively, and their fine structure ratios (in %) 67.7 ± 0.2 , 52.1 ± 0.4 and 39.8 ± 1.1 , respectively. Besides, there were a small number of other peaks exhibiting the same main peak wavelengths as the identified isomers but with different ratio values. These non-identified isomers were called *x-cis*-lycopene and could be other single or double *cis* isomers.

3.5. Kinetics of lycopene isomer evolution during heat treatment

Lycopene solutions taken during heat treatments were separated by DAD–HPLC and the kinetics of the evolution of the various isomers was followed. The percentage of each lycopene isomer was based on the % of the area of each isomer peak in the total area according to HPLC. The evolution of each *cis*-isomer is presented in Fig. 4. At 80 °C, the all-*trans*-lycopene was first isomerized to

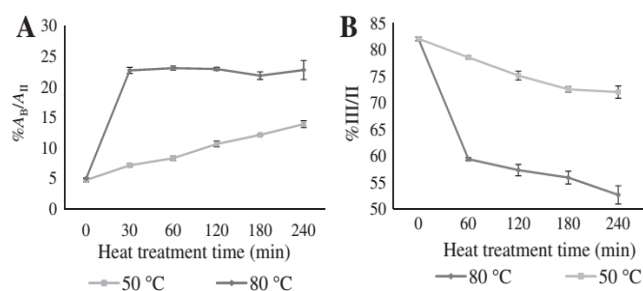


Fig. 2. Spectral ratio evolution of gac lycopene during heat treatments at 50 °C (■) and 80 °C (◆). (A) Cis ratio (% A_B/A_{II}) and (B) fine structure ratio (% III/II).

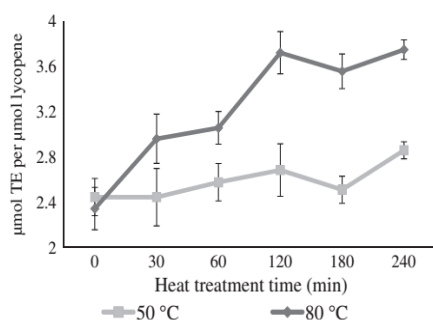


Fig. 3. Antioxidant capacity evolution during heat treatments at 50 °C (■) and 80 °C (◆).

13-*cis*, with a small amount of the 15-*cis* isomer and then to the 9-*cis* isomer. When submitted to a lower temperature, only 13-*cis* and 15-*cis*-lycopene were detected. For the first 60 min, 13-*cis*-lycopene amounted to approximately 6% but reached 22% after 240 min with a small amount of the 15-*cis* isomer (1%). Extended heating at 80 °C caused 9-*cis*-isomerization (6%) beside 13-*cis*

and 15-*cis* isomers. It should be noted that after 60 min at this temperature, 13-*cis*-lycopene reached approximately 22%. This value did not increase anymore with extended heating but slightly decreased at 180 min. A small amount of 15-*cis*-lycopene (2%) was also detected in samples at higher temperature. When the heating time was prolonged up to 180 min, a slight decrease in the amount of 13-*cis*-lycopene was observed at 80 °C. Meanwhile, there was a constant increase in 9-*cis*-lycopene to 16% at 240 min.

Gac's lycopene was sensitive to heat even at moderate temperature. Heating at 50 °C could keep 10% more lycopene in the all-*trans*-form when compared to the higher temperature treatment. A significant isomerization was recorded and all-*trans*-lycopene was mainly converted to 9-*cis*- and 13-*cis*-lycopene.

4. Discussion

Up to now, isomerization by isomer identification of gac carotenoids has only been mentioned in one study (Tran et al., 2008). In gac, lycopene mostly exists in the all-*trans* form. In our study, when lycopene was moderately heated, significant differences were observed on the extent of *trans*-*cis*-isomerization depending

Table 2
Identification data for lycopene isomers separated by DAD–HPLC.^a

Lycopene isomer	Retention time (min)	Wavelength (nm)			%A _B /A _{II} ^b	%III/II ^c
All- <i>trans</i> -lycopene	34.69 ± 0.38	446	472	503	6.7 ± 0.6	73.4 ± 1.7
9- <i>cis</i> -Lycopene	28.93 ± 0.27	360	441	467	14.4 ± 0.6	67.7 ± 0.2
13- <i>cis</i> -Lycopene	26.03 ± 0.19	360	440	465	58.2 ± 0.2	52.1 ± 0.4
15- <i>cis</i> -Lycopene	25.19 ± 0.21	360	444	470	73.5 ± 2.1	39.8 ± 1.1

^a HPLC mobile phase of MTBE-acetonitrile-methanol (50:15:35, v/v/v).

^b Corresponds to *cis* ratio.

^c Corresponds to fine structure ratio.

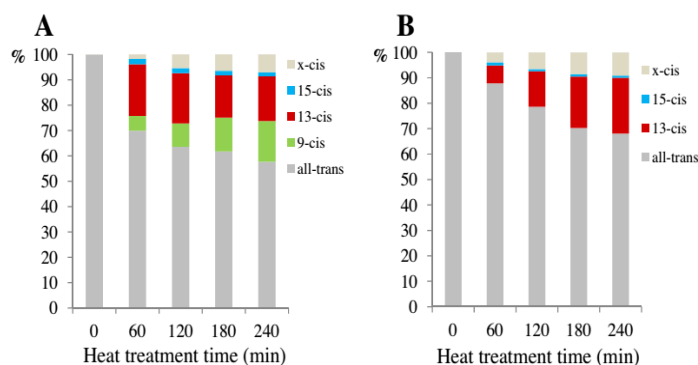


Fig. 4. Cis-lycopene evolution during (A) 80 °C treatment and (B) 50 °C treatment in hexane.

on the temperature of the treatment at 50 °C and 80 °C in hexane. Our results suggest that, when carried out in hexane, the first effect of heat on lycopene was isomerization before degradation. The formation of *cis*-lycopene without degradation has also been observed during intense thermal pasteurisation (Knockaert et al., 2012). The lycopene total content of tomato halves was shown to be unaffected by drying at 80 °C (Zanoni, Peri, Nani, & Lavelli, 1998). Consistent with this observation, there was no significant change in the total lycopene content ($p > 0.05$) at either temperature in the present study (results not shown).

Cis-isomerization generated isomers according to a certain order, whatever the treatment temperature. The heat process in the current study provoked consecutively the appearance of 15-*cis*, 13-*cis* and 9-*cis*-lycopene from the all-*trans*-isomer. That could be explained by the increased order of rotational barriers of these isomers (Guo, Tu, & Hu, 2008). The stability of carotenoids depends on the different free energies of carotenoid isomers and of the degradation products which are themselves related to the different cleavage sites for *cis/trans*-isomers (Waché, Bosser-DeRatuld, Lhuguenot, & Belin, 2003). For lycopene, the stability of isomers is in the following order: all-*trans* > 9-*cis* > 13-*cis* > 15-*cis* (Chasse et al., 2001). In our study, although the 15-*cis* isomer occurred at the beginning, the main *cis*-lycopenes generated during the heat treatment were 13-*cis* and then 9-*cis*. This observation is consistent with the results of Ax, Mayer-Miebach, Link, Schuchmann, and Schubert (2003) and Knockaert et al. (2012). When heated for longer, the increase in 9-*cis*-lycopene was accompanied by a slight decrease in 13-*cis*-lycopene after 180 min at 80 °C. This isomerization change has also been reported in another study at 90 °C (Ax et al., 2003).

The isomerization of carotenoids is often investigated from the modifications in the absorption spectrum and particularly from the *cis*-ratio, which indeed is a good indicator of isomerization taken very globally (Cao-Hoang et al., 2011; Mercadante et al., 1998; Qiu, Chen, & Li, 2009; Tan & Soderstrom, 1989). In our study, useful information on the changes of the isomer state of lycopene was gained from the *cis*-ratio completed by the fine structure-ratios of absorption spectra of lycopene solutions. From our knowledge, the increase in *cis*-peak ratio during isomerization has relation with the decrease in the fine structure ratio of carotenoid spectra (Tan & Soderstrom, 1989). However, in the present study, we show that these two global ratios, although they follow many similar trends, do not behave in the same way. At higher temperature, the difference between the two ratio evolutions was better shown. During the period of stability of the global *cis*-ratio after 60 min, the fine structure ratio decreased continuously with a moderate rate. The global *cis*-ratio evolution during heat treatment was examined against the *cis*-isomer formation according to DAD-HPLC. At 50 °C, the 13-*cis*-lycopene evolution was representative of both ratio evolutions as it was the main *cis*-isomer generated in the heated solution at the lower temperature treatment. However, the apparition of another *cis*-lycopene in high concentration caused different evolutions of these ratios at the 80 °C treatment. According to the identification data of each separate *cis*-lycopene, 13-*cis* isomer has a higher impact on the *cis* ratio but a lower effect on the fine structure ratio than the 9-*cis* isomer. At 80 °C, the *cis* ratio of the lycopene solution increased during the first hour, was stable in the second and slightly decreased after 3 h heating. This corresponded to an increase in the main 13-*cis*-lycopene isomer during the first hour, its stability in the second and a slight decrease after 3 h heating. Meanwhile, for the first 60 min, the fine structure ratio of lycopene solution decreased with the increase in 13-*cis* isomer, which was still the main *cis*-lycopene in the solution. When a significant amount of 9-*cis*-lycopene appeared (responsible for a higher %III/II), the evolution of the fine structure ratio followed this *cis*-isomer evolution. These two global ratios

above taken together are good markers to rapidly assess the extent of *cis*-isomerization in lycopene during heat treatment at different temperatures. From the ratios of individual isomers, it can be seen that *cis*-double bonds account more for the *cis*-ratio if they are in the centre of the molecule (e.g. 15-*cis*: 58% and 9-*cis*: 15%), whereas they have a greater impact on the fine-structure ratio if they are far from the centre of the molecule (e.g. 9-*cis*: 68% and 15-*cis*: 52%). If the increase in the *cis* ratio has the same rate as the decrease in the fine structure ratio, there is only one main *cis*-lycopene in the mixture. When there is a different tendency of ratio evolution, heat treatment generates another significant *cis*-lycopene that is isomerized in the double bonds localized nearer the extremity of the carbon chain.

Extended *trans-cis*-isomerization of lycopene correlated also with antioxidant property changes of lycopene solution. The generation of *cis*-lycopene caused an increase in the antioxidant capacity of the treated samples. At higher temperature, because the isomerization was more important, the antioxidant capacity increase was significantly faster than at 50 °C. This result is consistent with published results that confirmed the higher antioxidant capacity of *cis*-isomer of lycopenes compared to the all-*trans*-isomer (Böhm et al., 2001).

On the other hand, the antioxidant capacity of the mixture of lycopene isomers depends on the structure and the amount of each *cis*-isomer. A significant amount of 13-*cis*-lycopene after 240 min at lower temperature made the lycopene isomer solution significantly more antioxidant than the one composed of all-*trans*-lycopene alone. Particularly, 9-*cis*-lycopene was shown to be more antioxidant than the 13-*cis* isomer. Indeed, solutions exhibited a strong increase in the ABTS^{•+} bleaching activity after 120 min at 80 °C when they contained a significant percent of the 9-*cis* isomer (9%).

The higher activity of *cis*-lycopenes in comparison with all-*trans*-lycopene could be related with the higher solubility of *cis*-isomers (Failla, Chitchumroonchokchai, & Ishida, 2008). In foods, the bioavailability of lycopenes from heat treated tomatoes is higher than lycopenes obtained from fresh tomatoes (Dewanto, Wu, Adom, & Liu, 2002; Shi, 2000). Thermal processing increased the *in vitro* bioaccessibility of lycopene isomers (Colle, Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2010). Lycopene from *cis*-lycopene-rich tomato sauce was demonstrated to be more bioavailable in human nutrition than from the all-*trans*-isomer (Unlu et al., 2007). Moreover, 13-*cis*- and 9-*cis*-lycopene were also detected in plasma during uptake processing (Holloway, Yang, Paganga, Rice-Evans, & Bramley, 2000). Amongst these *cis*-isomers, 9-*cis* isomer was found in nature as a better antioxidant than its all-*trans* counterpart (Lavy, Amotz, & Aviram, 1993; Levin & Mokady, 1994). In agreement with previous observations, our results confirmed the higher antioxidant capacity of 9-*cis*-lycopene in comparison with the all-*trans*- and 13-*cis*-lycopene. However, the difference in antioxidant properties between the lycopene isomers has not yet been clearly explained. It must be noted that isomerization can be considered as a first step of degradation, as *cis*-isomers are less stable and can be cleaved more easily than the all-*trans* form (Waché et al., 2003). Moreover, as the ratio of isomerized compounds is higher in the tissues than in the food source, it is possible that an isomerization step takes place during metabolism (Boileau et al., 1999; Stahl et al., 1992). Therefore, the control of isomerization proposed in this study, which is efficient for antioxidant improvement, must be checked *in vivo* for its impact on organisms.

5. Conclusions

Although lycopene of gac aril has always been shown to be very fragile (especially in gac oil), our results show that lycopene,

separated from the tissues and oil, resists heating quite well. Indeed, no degradation was observed, only isomerization took place. Moreover, isomerization by heat treatment made gac lycopene solutions more antioxidant. Controlling this treatment could afford a highly biologically active lycopene isomer preparation without provoking the degradation of the molecule. However the bioefficacy of *cis*-forms compared to the all-*trans* form remains to be studied *in vivo*, especially as *cis*-isomerization is a primary step in carotenoid degradation. In investigating the extend of the *trans-cis*-isomerization of lycopene, the ratios of *cis* and fine structure based on different absorption spectra could be used as a simple and rapid marker to study lycopene isomerization and its relationship with antioxidant capacity.

Acknowledgements

This study was funded by AgroSup Dijon, Oséo (BPI) and the French Embassy in Vietnam. It has been carried out in the frame of the development of Natencaps. The authors are thankful to Annick Barrey and Christine Bernard-Rojas for technical help.

References

- Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A., & Avallone, S. (2010). Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 349–361.
- Aoki, H., Kieu, N. T. M., Kuze, N., Tomisaka, K., & Chuyen, N. V. (2002). Carotenoid pigments in GAC fruit (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66, 2479–2482.
- Ax, K., Mayer-Miebach, E., Link, B., Schuchmann, H., & Schubert, H. (2003). Stability of lycopene in oil-in-water emulsions. *Engineering in Life Sciences*, 3(4), 199–201.
- Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G., & Schwartz, S. J. (2001). Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomers of α -carotene, β -carotene, lycopene, and zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 221–226.
- Boileau, A. C., Merchen, N. R., Wasson, K., Atkinson, C. A., & Erdman, J. W. (1999). *Cis*-lycopene is more bioavailable than *trans*-lycopene in vitro and in vivo in lymph-cannulated ferrets. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 129, 1176–1181.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, 9, 1551–1558.
- Cao-Hoang, L., Fougère, R., & Waché, Y. (2011). Increase in stability and change in supramolecular structure of β -carotene through encapsulation into poly(lactic 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 gac (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation – Protective effect of lycopene on β -carotene. *Food Research International*, 44, 2252–2257.
- Chasse, G. A., Mak, M. L., Deretey, E., Farkas, I., Torday, L. L., Papp, J. G., et al. (2001). An ab initio computational study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 571(1–3), 27–37.
- Clinton, S. K., Emenhiser, C., Schwartz, S. J., Bostwick, D. G., Williams, A. W., & Moore, B. J. Jr. (1996). *Cis-trans* lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 5, 823–833.
- Colle, I., Lemmens, L., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Effect of thermal processing on the degradation, isomerization, and bioaccessibility of lycopene in tomato pulp. *Journal of Food Science*, 75(9), C753–C759.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Liu, R. H. (2002). Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 3010–3014.
- Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C., & Ishida, B. K. (2008). In vitro micellarization and intestinal cell uptake of *cis* isomers of lycopene exceed those of all-*trans* lycopene. *Journal of Nutrition*, 138, 482–486.
- Graziani, G., Pernice, R., Lanzuise, S., Vitaglione, P., Anese, M., & Fogliano, V. (2003). Effect of peeling and heating on carotenoid content and antioxidant activity of tomato and tomato-virgin olive oil systems. *European Food Research and Technology*, 216, 116–121.
- Guo, W.-H., Tu, C.-Y., & Hu, C.-H. (2008). *Cis-trans* isomerizations of β -carotene and lycopene: A theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(38), 12158–12167.
- Holloway, D., Yang, M., Paganga, G., Rice-Evans, C. A., & Bramley, P. M. (2000). Isomerization of dietary lycopene during assimilation and transport in plasma. *Free Radical Research*, 32(1), 93–102.
- Ishida, B. K., Turner, C., Chapman, M. H., & McKeon, T. A. (2004). Fatty acid and carotenoid composition of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 274–279.
- Ishida, B. K., Ma, J., & Chan, B. (2001). A simple, rapid method for HPLC analysis of lycopene isomers. *Phytochemical Analysis*, 12, 194–198.
- Knockaert, G., Puliserry, S. K., Colle, I., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M., & Loey, A. V. (2012). Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing. *Food Chemistry*, 135(3), 1290–1297.
- Kubola, J., & Siriamornpun, S. (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, 127(3), 1138–1145.
- Lavy, A., Amotz, A. B., & Aviram, M. (1993). Preferential inhibition of LDL oxidation by the all-*trans* isomer of β -carotene in comparison with 9-*cis* β -carotene. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 31, 83–90.
- Levin, G., & Mokady, S. (1994). Antioxidant activity of 9-*cis* compared to all-*trans* β -carotene in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 17(1), 77–82.
- Mercadante, A. Z., Steck, A., & Pfander, H. (1998). Carotenoids from Guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and structure elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 145–151.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384(3), 240–242.
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, 78, 1477–1491.
- Müller, A., Pietsch, B., Faccin, N., Schierle, J., & Waysek, E. H. (2008). Method for the determination of lycopene in supplements and raw material by reversed-phase liquid chromatography: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 91(6), 1284–1297.
- Nhung, D. T. T., Bung, P. N., Ha, N. T., & Phong, T. K. (2010). Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. *Food Chemistry*, 121(2), 326–331.
- Qiu, D., Chen, Z.-R., & Li, H.-R. (2009). Effect of heating on solid β -carotene. *Food Chemistry*, 112(2), 344–349.
- Rao, A. V., & Agarwal, S. (1999). Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutrition Research*, 19(2), 305–323.
- Schieber, A., & Carle, R. (2005). Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 416–422.
- Shi, J. (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(4), 293–334.
- Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A. R., & Sies, H. (1992). *Cis-trans* isomers of lycopene and [beta]-carotene in human serum and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 294(1), 173–177.
- Stahl, W., & Sies, H. (1992). Uptake of lycopene and its geometrical isomers is greater from heat-processed than from unprocessed tomato juice in humans. *Journal of Nutrition*, 122, 2161–2166.
- Tan, B., & Soderstrom, D. N. (1989). Qualitative aspects of UV-Vis spectrophotometry of β -carotene and lycopene. *Journal of Chemical Education*, 66, 258–260.
- Tran, T. H., Nguyen, M. H., Zabaraz, D., & Vu, L. T. T. (2008). Process development of Gac powder by using different enzymes and drying techniques. *Journal of Food Engineering*, 85(3), 359–365.
- Unlue, N. Z., Bohna, T., Francisa, D. M., Nagarajaa, H. N., Clintona, S. K., & Schwartz, S. J. (2007). Lycopene from heat-induced *cis*-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-*trans*-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 98(01), 140–146.
- Vuong, L. T., Franke, A. A., Custer, L. J., & Murphy, S. P. (2006). *Momordica cochinchinensis* Spreng (gac) fruit carotenoids reevaluated. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 664–668.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Lhuguenot, J.-C., & Belin, J.-M. (2003). Effect of *cis/trans* isomerism of β -carotene on the ratios of volatile compounds produced during oxidative degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 1984–1987.
- Zanoni, B., Peri, C., Nani, R., & Lavelli, V. (1998). Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. *Food Research International*, 31(5), 395–401.

3.3.3 Bio-activité du lycopène de l'arille de gac sur les cellules sanguines dans le plasma

Suite à la caractérisation des lycopènes traités, nous allons chercher à comprendre la relation entre leur qualité et leur bioactivité. L'effet des lycopènes, avant et après le traitement thermique, sur des cellules sanguines dans le plasma a été testé à différentes concentrations via le test KRL.

3.3.3.1 Test KRL

Pour les préparatifs, l'hexane a été éliminé du lycopène sous azote à température ambiante. Le lycopène séché a ensuite été dispersé dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour avoir une solution mère d'1 mg/mL. Puis, cette dernière solution a été diluée dans du tampon phosphate isotonique 10 mM (PBS), pH 7,4 pour être introduite dans la solution sanguine. La dissolution des agrégats du lycopène dans du tampon a été assistée par ultrason pendant environ 15 min à 20°C.

Le sang de cheval BH-F provenant de BIOMERIEUX® SA, Marcy l'Etoile, France a été dilué jusqu'à une concentration de 22,2 % dans du tampon PBS 10 mM (pH 7,4). Cette solution plasmique diluée a été mise en contact avec des radicaux libres organiques produits par la décomposition thermique de 50 mM de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH). Enfin, le milieu réactionnel final, après avoir ajouté la préparation du lycopène, est une solution sanguine dans du tampon PBS avec 0,44 % DMSO. L'effet du lycopène sur les cellules sanguines a été testé aux trois concentrations suivantes: 4, 20 et 100 µM. L'hémolyse des cellules soumises à l'attaque des radicaux libres a été suivie par la mesure de l'absorbance pendant 3 heures à 37°C. La solution de 0,44 % DMSO dans du tampon PBS 10 mM (pH 7,4) a été le témoin pour la mesure de l'activité du lycopène.

La toxicité du lycopène envers les cellules sanguines a également été testée dans les mêmes conditions de milieu réactionnel mais sans ajouter le générateur de radicaux libres AAPH.

3.3.3.2 Résultats et discussion

La solubilité faible du lycopène dans le milieu réactionnel a causé certains problèmes dans notre étude. Malgré l'assistance ultrasonique, le lycopène ne s'est pas entièrement dispersé dans le milieu. Une partie du lycopène testé a été mal dissoute et s'est agrégée. Ces agrégats ont été récupérés et dissouts dans l'hexane pour calculer la quantité de lycopène non dissouts. La concentration du lycopène bien dissout dans le milieu

réactionnel a été appréciée par la différence entre la concentration du lycopène ajouté et du lycopène non dissout (tableau 15). Le traitement thermique à 80°C a augmenté la solubilité du lycopène par rapport au lycopène non traité et chauffé légèrement à 50°C. Dans ces derniers échantillons, seuls environ 10 % du lycopène ajouté a été dissout dans le milieu réactionnel. Cependant, plus de 50 % du lycopène chauffé à 80°C a été dissout. D’après ces calculs, les concentrations de lycopène soumises à ce test sont présentées dans le tableau 15.

Tableau 15 : Concentration estimée du lycopène dissout dans le milieu réactionnel du test KRL

Lycopène ajouté (µM)	Lycopène dispersé (µM)		
	Sans traitement	50°C	80°C
0	0	0	0
4	0,4	0,4	2,2
20	2,0	2,2	11
100	10	11	56

D’après le tableau 16, le lycopène de l’arille de gac présente une forte activité antioxydante de protection des cellules sanguines contre l’hémolyse causée par des oxydants. Cette activité atteint 124 TE (µmole/µmole). Cet effet augmente quand la concentration du lycopène augmente jusqu’à environ 2 µM. Pourtant, à concentration très élevée (environ 10 µM), le lycopène devient toxique. Le traitement à 50°C ne change pas la qualité antioxydante du lycopène. Le lycopène chauffé à 50°C pendant 240 min possède les mêmes propriétés antioxydantes que celui non chauffé. Cependant, le traitement à haute température fait nettement diminuer cette activité antioxydante. Après 240 min de chauffage à 80°C, le lycopène de l’arille de gac n’a augmenté que de 34 % le temps d’hémolyse des cellules sanguines, ce qui équivaut à 28 TE (µmole/µmole) à une concentration d’environ 2 µM, soit une activité 5 fois moindre que celle du lycopène non chauffé. A concentration très élevée, le lycopène traité à 80°C est également toxique. Ces résultats montrent que la propriété antioxydante du lycopène de l’arille de gac est dépendante de sa concentration. Il est probable qu’il soit converti en prooxydant à concentration très élevée. D’autre part, quand le lycopène réagit avec les radicaux libres, il

peut également générer certains produits oxydatifs du lycopène qui pourraient présenter un effet prooxydant sur les cellules à haute concentration (Yeh et al., 2000; Yeh et al., 2005).

Tableau 16 : Activité antioxydante du lycopène de l'arille de gac chauffé à 50°C et à 80°C sur la défense contre la demi-hémolyse des cellules sanguines dans le plasma, en équivalent Trolox en fonction de la concentration du lycopène

	Concentration (μM)	^a Sans traitement	Traitement, 240 min	
			50°C	80°C
% HT ₅₀	0,4	27 ± 5	31	-
	2-2.2	137 ± 5	154	34
	10-11	Tox	Tox	153
	56	-	-	Tox
TE	0,4	123 ± 15	134	-
	2	124 ± 2	133	28
	10-11	Tox	Tox	25
	56	-	-	Tox

^a Valeur moyenne sur 2 répétitions ; Tox : Toxicité

% HT₅₀ : Pourcentage du potentiel global de défense anti-radicalaire du sang témoin

TE : μmole de Trolox par μmole de lycopène

De plus, l'effet du traitement thermique sur la capacité antioxydante du lycopène vis-à-vis du temps d'hémolyse cellulaire a été évalué en fonction du temps. La figure 28 montre que le chauffage à 50°C augmente légèrement l'activité antioxydante du lycopène ce qui peut être dû à la présence du lycopène 13-*cis* (identifié par DAD-HPLC dans l'article 3.3.2). Cependant, l'apparition de 9-*cis*-isomère dans le lycopène chauffé à 80°C pourrait être la cause de la diminution de son activité antioxydante. Comme le 9-*cis* est plus antioxydant que les autres isomères (d'après le test TEAC), il réagit plus sensiblement avec les radicaux libres en présence d'oxygène. Une voie possible de cette réaction antioxydante est qu'elle fasse apparaître provisoirement des espèces radicalaires du lycopène 9-*cis*, d'après l'hypothèse de Kennedy et al. (1992). Aux concentrations testées, ces radicaux peuvent causer un effet prooxydant, contrairement à l'activité antioxydante des autres isomères dans la solution de lycopène. Donc, cet effet provenant de 9 *cis*-isomère peut freiner l'activité antioxydante totale de ce mélange.

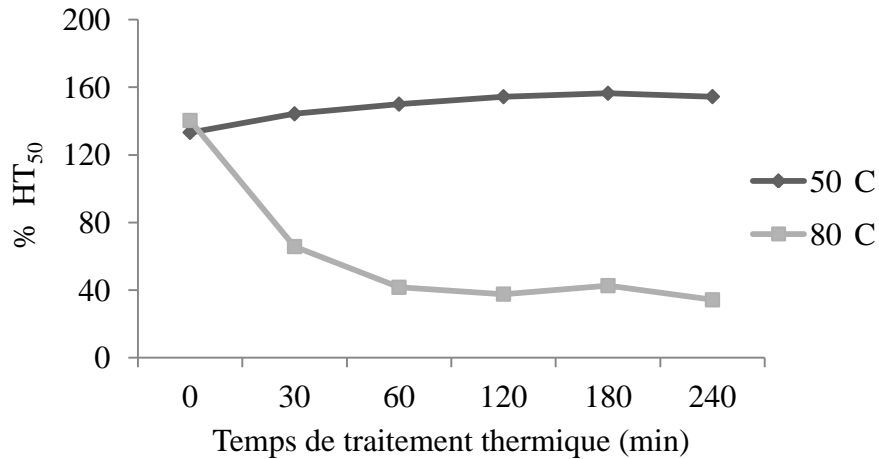


Figure 28 : Evaluation de l'activité antioxydante du lycopène de l'arille de gac chauffé à 50°C (◆) et à 80°C (■) à 2 µM sur la défense contre la demi-hémolyse de cellules sanguines dans le plasma en fonction du temps de traitement

3.3.4 Conclusion

La qualité et la stabilité du lycopène extrait et fractionné de l'arille de gac par notre procédé ont été étudiées. Nos résultats montrent que le lycopène extrait résiste assez bien à la température. En effet, il n'a pas été dégradé pendant le traitement thermique mais seulement isomérisé. De plus, les lycopènes 15-*cis*, 13-*cis* et 9-*cis* ont été détectés pendant les traitements. Le 9-*cis*-isomère a seulement été trouvé dans le lycopène chauffé à 80°C. La propriété antioxydante des isomères du lycopène peut être classée dans l'ordre suivant : 9-*cis* > 13-*cis* > all-*trans*. Cela correspond également aux résultats du test TEAC. Cependant, dans le test biologique, le lycopène 9-*cis* peut réagir comme un prooxydant à haute concentration. On peut également en tirer la conclusion que le lycopène présente un fort pouvoir antioxydant, cependant il peut devenir toxique pour les cellules sanguines s'il est introduit à concentration élevée.

3.4 STABILITE ET BIO-ACTIVITE DU B-CAROTENE FRACTIONNE DE L'ARILLE DE GAC

3.4.1 Rappel bibliographique

3.4.1.1 Absorption et bio-activité du β -carotène

* Alimentation et absorption du β -carotène :

Le β -carotène, comme les autres caroténoïdes, ne peut pas être synthétisé chez les êtres humains mais il est accumulé dans les organes humains par l'alimentation et l'absorption des carotènes naturels de légumes, d'autres sources alimentaires ou de compléments santé. Après l'alimentation, le β -carotène est absorbé par l'intestin, transporté dans le plasma sanguin et peut y avoir une concentration plus élevée que dans les autres organes du corps humain, surtout après une complémentation en β -carotène (Biesalski et al., 2008). A plus long terme, le β -carotène est plus présent dans les organes tels que le foie, les reins, les glandes surrénales, la graisse, les testicules et les ovaires pour lesquels le taux de β -carotène est présenté dans le tableau 17. Chez l'homme, le β -carotène se trouve normalement à moins d'1 μ M dans le sérum sanguin et jusqu'à 32 nmole/g dans les glandes surrénales (Stahl et al., 1992).

Tableau 17 : Taux de β -carotène et de caroténoïdes totaux dans le sérum humain (en μ M) et des tissus différents (en nmole/g) (adapté de Stahl et al. (1992))

Organes	Caroténoïdes	β -Carotène	
	totaux	Min	Max
Sérum sanguin	1,1 \pm 0,9	0,12	0,89
Foie	5,1 \pm 3,6	0,16	8,62
Reins	0,9 \pm 0,7	0,08	2,03
Glandes surrénales	9,4 \pm 7,8	0,68	31,83
Graisse	0,8 \pm 0,8	0	1,05
Testicules	7,6 \pm 6,9	0,75	4,77
Ovaires	0,9 \pm 0,5	0,18	0,95
Tronc cérébral	< 0,04	nd	nd

nd: non déterminé

L'absorption du β -carotène avec des compléments santé a été étudiée depuis longtemps. Comme vu au-dessus, le plasma et le sérum sanguin sont les milieux dans

lesquels le β -carotène est transporté après absorption. De plus, pour analyser le β -carotène absorbé *in vivo*, la prise de sang est plus facilement réalisée que le prélèvement à partir des autres organes du corps humain. C'est pourquoi, le taux de β -carotène dans le plasma et le sérum sanguin est le marqueur de l'absorption du β -carotène par l'alimentation. Les études citées dans le tableau 18 montrent les résultats obtenus sur l'absorption du β -carotène dans le plasma et le sérum sanguin. La plupart de ces études disent que la concentration du β -carotène dans le plasma sanguin ne dépasse pas 6 μ M, sauf l'étude de Tamai et al. (1995). Dans cette dernière étude, la quantité de β -carotène supplémentaire a été augmentée et les personnes examinées étaient des hommes japonais en bonne santé, âgés de 20 à 25 ans. Malgré ces éléments, qui peuvent expliquer la grande différence entre les résultats de cette étude et les autres, une concentration aux alentours d'un mM de β -carotène dans le plasma pourrait être exagérée et provenir d'une erreur d'écriture.

Tableau 18 : Etude de l'absorption du β -carotène (BC) apporté par des compléments alimentaires

Etude	Données	Augmentation de la concentration du BC par rapport au témoin
Levy et al. (1999)	30 mg/jour, 3 semaines	3,3 fois (plasma)
Wang et al. (1999)	20 mg/jour, 6 mois	0,11 μ M, 20 fois (plasma)
Omenn et al. (1996)	30 mg/jour, 5 ans	3,9 μ M, 12 fois (sérum)
Peram et al. (1996)	30 mg/jour, 3 mois	4,02 \pm 0,45 μ M 17 fois (sérum)
Iftikhar et al. (1996)	30 mg/jour	2,9 – 5,8 μ M (sérum)
Tamai et al. (1995)	60 mg/jour, de 1 à 11 mois	1,5 mM, 4 fois (BC synthèse, plasma) 0,9 mM, 2,4 fois (BC naturel, plasma)

* Bio-activité du β -carotène :

Comme nous le savons, le β -carotène présente une forte propriété antioxydante qui a beaucoup été étudiée depuis longtemps. Par le même mécanisme que le lycopène, le β -carotène peut réagir contre les radicaux libres oxydatifs présents dans les milieux chimiques et biologiques comme les milieux cellulaires (Tsuchihashi et al., 1995). Cette propriété du β -carotène a été montrée dans les études *in vitro* et *in vivo* par des résultats différents. A une concentration comprise entre 0,001 et 0,01 %, le β -carotène présente une activité « scavenger » de radicaux DPPH et d'anions superoxydé (Gupta et al., 2013).

D'autre part, une alimentation complémentaire en β -carotène peut empêcher les dommages causés au foie par le stress oxydatif de l'alcool chez les souris et inhiber l'apoptose des cellules du foie (Lin et al., 2009; Peng et al., 2013). Le β -carotène participe à la protection de la peau des souris imberbes contre le stress dermatologique causé par l'ozone (trioxygène) (Valacchi et al., 2009) et également à la diminution du glucose dans le sérum des souris glycémie-diabétiques (Abdul-Hamid et al., 2014). Pourtant, *in vitro* et *in vivo*, l'équilibre entre les propriétés anti-carcinogènes et pro-cancéreuses du β -carotène est très délicat et doit être encore étudié plus avant (Kleinjans et al., 2004). En effet, le β -carotène solubilisé dans le solvant THF s'est montré toxique pour les cellules cancéreuses du côlon humain mais n'est pas cytotoxique quand il se trouve dans le sérum humain (Peram et al., 1996). Dans certaines conditions non-physiologiques telles qu'à haute pression d'oxygène et à concentration très élevée, le β -carotène a un effet prooxydant (Burton et al., 1984; Krinsky 1993). La complémentation en β -carotène en vue de réduire le stress cancéreux ou de maladies cardiaques n'a pas été efficace dans certaines populations (Omenn et al., 1996; Baker et al., 1999; Wang et al., 1999; Almeida et al., 2013). L'effet inattendu ou négatif du β -carotène dans ces dernières études pourrait être lié à la surdose de β -carotène qui peut provoquer un effet antagoniste de son métabolisme excentrique par les β -apo-caroténoïdes (Sommerburg et al., 2003; Eroglu et al., 2012). Le mélange de plusieurs produits différents de coupure du β -carotène, tels que certains apo-caroténals, le β -cyclocitral, la β -ionone, le 5,6-époxyde de β -ionone et le dihydroactinidiolide, pourrait être génotoxique car ces produits pourraient provoquer une aberration chromosomique (Alija et al., 2004).

3.4.1.2 Isomérisation thermique du β -carotène

Par rapport au lycopène, le β -carotène est moins sensible à la température. La qualité du β -carotène n'est presque pas changée à température inférieure à 60°C. Le traitement thermique du β -carotène *all-trans* à température comprise entre 80 et 100°C provoque les 13-*cis*- et 15-*cis*-isomérisations du β -carotène (Kuki et al., 1991; von Doering et al., 1995) alors que le 9-*cis*-isomère est le produit principal obtenu au cours d'un traitement à plus de 100°C (von Doering et al., 1995). Dans les tissus végétaux, le β -carotène présente une stabilité thermique plus élevée que dans l'hexane. La pasteurisation du jus de carotte brut à 100°C ne cause pas de *trans-cis*-isomérisation significative du β -carotène et sa stérilisation à 80°C pendant 60 minutes fait apparaître un seul isomère du β -carotène, le 13-*cis* (Chen et al., 1995). Cette isomérisation du β -carotène peut causer un changement de sa biodisponibilité et de sa capacité antioxydante. Les *cis*-isomères peuvent présenter une

solubilité plus élevée que l'all-*trans* (Failla et al., 2008) et de plus, ils pourraient devenir plus bioactifs. En effet, *in vitro*, le 9-*cis* présente une capacité antioxydante plus élevée que le β -carotène all-*trans* dans la protection du linoléate de méthyle contre l'oxydation (Levin et al., 1994). Pourtant, dans une autre étude sur l'alimentation par dose orale (environ 387 nmol) de chaque isomère du β -carotène, il apparaît que le β -carotène all-*trans* est plus biodisponible que le 9-*cis* ou le 13-*cis* et qu'il est mieux absorbé, transporté dans les tissus que les deux autres isomères (Deming et al., 2002). D'autre part, la propriété antioxydante du β -carotène est aussi dépendante de son origine naturelle ou de synthèse. Le β -carotène synthétique est deux fois plus efficace que le β -carotène de *Dunaliella*, une algue riche en β -carotène (all-*trans* et 9-*cis*), en ce qui concerne l'inhibition de la susceptibilité des lipoprotéines à la peroxydation (Lavy et al., 1993). Cela démontre également que le β -carotène all-*trans* est plus efficace que le mélange des β -carotène all-*trans* et 9-*cis*. Au contraire, chez les souris, la poudre de β -carotène extraite de *Dunaliella bardawil* (42 % d'all-*trans* et 43 % de 9-*cis*) inhibe mieux le stress oxydatif causé par l'alcool que le β -carotène de synthèse (97 % d'all-*trans*) (Werman et al., 1999).

En conclusion, malgré une grande capacité antioxydante, le β -carotène ne présente pas la même réaction sur des types de stress oxydant différents. On peut aussi affirmer que la propriété antioxydante du β -carotène dépend de son origine et de ses isomères, qui peuvent présenter une biodisponibilité différente. Toutefois, pour expliquer certains résultats contradictoires, des études nouvelles sur le β -carotène sont nécessaires. Parmi les marqueurs de la propriété antioxydante des caroténoïdes, le plasma sanguin où se trouvent les caroténoïdes après absorption sera un bon choix pour une étude *in vitro* de l'activité du β -carotène sur les cellules vivantes. Dans la suite de notre travail, les β -carotènes de différentes origines et leurs isomères engendrés par traitement thermique seront testés sur les cellules sanguines. Le β -carotène de synthèse Sigma est utilisé comme le standard pour l'étude (données en Annexe).

3.4.2 Effet du β -carotène sur la résistance des cellules sanguines à l'hémolyse

Le potentiel antioxydant du β -carotène a été largement étudié *in vitro* et *in vivo*. Pourtant, plusieurs résultats opposés ont été présentés, surtout dans les essais cliniques du β -carotène supplémentaire sur l'incidence et la mortalité des maladies cancéreuses et cardiovasculaires. Les propriétés antioxydantes et prooxydantes du β -carotène restent partiellement obscures avec les effets de sa concentration, son isomérisation et la présence de ses produits de dégradation. Ces deux derniers facteurs sont liés à la qualité du β -carotène, ce qui dépend de leurs procédés d'extraction, de transformation et de stockage dans lesquels le traitement thermique est souvent présent. Les sources et les procédés différents du β -carotène peuvent donner des qualités différentes qui sont ensuite liées à sa propriété antioxydante.

Les cellules sanguines qui transportent l'oxygène dans le plasma jusqu'aux organites cellulaires sont riches en acides gras polyinsaturés situés dans la bicouche phospholipidique. Elles possèdent une forte concentration de facteurs d'oxydation comme l'oxygène moléculaire et l'ion ferrique qui est un constituant de l'oxyhémoglobine. C'est pourquoi l'investigation de l'effet antioxydant du β -carotène dans le plasma sur les cellules sanguines *in vitro* peut générer des données représentatives sur son effet *in vivo*.

Dans cette étude, le contrôle de la qualité du β -carotène durant le traitement thermique et l'évaluation de ses capacités antioxydantes sur les cellules sanguines permettent d'établir les explications sur les effets opposés de ce pigment. De plus, le β -carotène extrait de l'arille de gac (BCG) a été comparé avec des β -carotènes d'origines différentes, un extrait naturel obtenu de manière conventionnelle (BCC) et un composé issu de synthèse chimique (BCS), provenant de l'industrie. Leur stabilité et bioactivité sur les cellules sanguines ont été appréciées et analysées en relation avec l'origine et la concentration. Durant le traitement thermique à 80°C, seul le β -carotène 15-*cis* a été produit. La présence de ce *cis*-isomère a augmenté la capacité antioxydante de la solution du β -carotène sur les cellules grâce à sa meilleure solubilité. Pourtant, pour un traitement plus long, le β -carotène peut être dégradé et transformé en forme oxydante, ce qui est détecté dans le BCC. A haute concentration, la présence des produits d'oxydation, surtout les caroténoïdes oxydés à longue chaîne, dans le BCC a causé un effet prooxydant sur l'hémolyse des cellules sanguines.

Ces résultats sont présentés dans l'article ci-après soumis au Journal of Functional Foods.

Article 3 : Effect of heat-processing on the antioxidant and prooxidant activity of β -carotene from natural and synthetic origins on red blood cells

Phan-Thi Hanh, Philippe Durand, Michel Prost, Emmanuelle Prost, Waché Yves

Titre : Effet du traitement thermique sur l'activité antioxydante et prooxydante du β -carotène d'origine naturelle ou synthétique sur les cellules sanguines

Résumé : L'effet du traitement thermique sur la bioactivité des β -carotènes, extrait doucement sans assistance thermique de *Momordica cochinchinensis* (gac) (BCG), extrait conventionnellement d'une autre source naturelle (BCC) et de synthèse (BCS), a été étudié. Leurs activités antioxydantes ont été évaluées à différentes concentrations par un test chimique et par l'hémolyse des cellules rouges sanguines de cheval BH-F, incubés avec 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride. La 15-*cis*-isomérisation thermique du β -carotène, caractérisée par la spectrométrie UV-visible et HPLC-DAD, entraîne une augmentation de 2,5 à 4,8 fois de l'effet anti-hémolyse (en % HT₅₀) à 4 μ M. Cette différence n'a pas été observée dans le test chimique. A la concentration plus élevée, le BCC a perdu ses propriétés antioxydantes et même il devient prooxydant à 100 μ M. Il se pourrait que cet effet soit causé par la présence des produits oxydés à long chaîne du BCC. Les résultats ont montré qu'un court traitement thermique améliore la bioactivité du β -carotène sur les cellules rouges sanguines mais quand il est encore plus chauffé, il devient prooxydant. Les procédés d'extraction et de formulation du β -carotène devraient ainsi être identifiables avant l'utilisation dans l'aliment fonctionnel.

Effect of heat-processing on the antioxidant and prooxidant activity of β -carotene from natural and synthetic origins on red blood cells

Phan-Thi Hanh^{1,2*}, Philippe Durand³, Michel Prost³, Emmanuelle Prost³, Waché Yves^{1,2}

¹UMR PAM (Food and Microbial Process) AgroSup Dijon/University of Burgundy and ²Natencaps, 1 Esplanade Erasme 21000 Dijon, France

³ Laboratoire de recherches appliquées Spiral/Kirial International, 3 rue des Mardors 21560 Couternon, France

*Author e-mail: phanhanh.ub@gmail.com

ABSTRACT:

The effect of heat-treatment on the bioactivity of β -carotenes, softly extracted without heat-assistance from *Momordica cochinchinensis* (BCG), conventionally extracted from another natural source (BCC), and synthetic (BCS), was investigated. Their antioxidant activities were evaluated at different concentrations by chemical assay and through hemolysis of horse red- blood-cell (RBC) BH-F, incubated with 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride. The thermal 15-*cis*-isomerization of β -carotene, characterized by UV-Vis spectrometry and DAD-HPLC, resulted in a 2.5- to 4.8-fold increase in the anti-hemolytic effect (in %HT₅₀) at 4 μ M. This difference was not detected in chemical assay. At high concentration, BCC lost its antioxidant properties and even became pro-oxidant at 100 μ M. This effect might be caused by long-chain oxidized products of BCC. Results demonstrated that a short heat-treatment improves the bioactivity of β -carotene on RBC but longer treatments make it prooxidant. The extraction and formulation processes of β -carotene should thus be identifiable before use as functional food.

Keywords: β -carotene, blood cells, bioavailability, isomerization, heat-treatment, *Momordica cochinchinensis* (gac), KRL

1. Introduction

Oxidative stress and free-radical mediated damages are involved in aging and in the genesis of many chronic diseases such as cancer, diabetes, cardiovascular and inflammatory diseases (Lesgards et al., 2002). They can result directly from nutritional behavior, lifestyle and environmental exposure or be caused by the metabolic syndrome (Marchetti et al., 2012). In these conditions, increased serum levels of products derived from oxidative damage are reported, promoting a proinflammatory state. As nutrition science has moved on from the classical concepts of avoiding nutrient deficiencies and basic nutritional adequacy to the concept of positive or optimal nutrition, functional foods are used nowadays in the prevention and amelioration of several chronic diseases (Khan et al., 2013).

β -Carotene carries desirable health-connected properties, which are related to its antioxidant power in inactivating certain reactive oxygen species, such as singlet oxygen (Burton et al., 1984). That is why, it is highly demanded in the market as an additive to cosmetics and for functional food applications (Weedon 1971; Kuhnen et al., 2009). Indeed, β -carotene-dietary supplement products in the market claim to have a function of protection against cellular damage, of promotion of immune health and as a vitamin A supplement. Moreover, the functional food industry has increased its efforts to produce bioactive compounds from natural sources through extraction and purification. In Nature, β -carotene is predominately in the all-*trans*-form found in *Momordica cochinchinensis* (gac) and in many plants and fresh fruits. This fragile substance may be stereo-isomerized (Schieber et al., 2005; Phan-Thi et al., 2014) and degraded (Siriamornpun et al., 2012; Igual et al., 2013) into non-healthy products because of the high temperature used during extraction and handling. Thus, the quality of β -carotene which includes its isomer composition, its supramolecular structure and the presence of other compounds contribute to its bioavailability and bioefficacy (Cao-Hoang et al., 2011; Cao-Hoang et al., 2011).

The antioxidant potential of β -carotene has been widely investigated and some disappointing results have been reported in clinical trials of supplemental β -carotene on the incidence and mortality of cancer and cardiovascular diseases. In these experiences, β -carotene supplementation was either non-protective (Hennekens et al., 1996) or even detrimental to smokers (Omenn et al., 1996). Thus, the antioxidant and pro-oxidant properties of β -carotene remain partly obscure. A study about antioxidant roles of carotenoids in human lung cells substantiated the hypothesis that the antioxidant or pro-oxidant activities of β -carotene are dependent on oxygen tension and concentration of β -

carotene (Zhang et al., 2001). It has also been suggested that some of the breakdown products of β -carotene, rather than β -carotene itself, may be pro-oxidant or procarcinogenic in relationship with their concentration (Alija et al., 2004). Besides, there are a number of other factors which may influence the bioavailability of carotenoids in biological systems such as their physical form (*cis* or *trans* configuration) (Böhm et al., 2001) and their location or site of action within the membrane cell (Young et al., 2001).

The cellular antioxidant activity in red blood cells is an interesting *in vitro* method to investigate the bioavailability of plant extracts (Britton 1989). The plasma and blood cells which supply molecular oxygen to cellular organelles are rich in polyunsaturated fatty acids in the phospholipid bilayer and possess higher concentrations of oxidation factors such as molecular oxygen and ferrous ion as constituents of oxyhemoglobin (Nakagawa et al., 1996). That is why the investigation of the antioxidant effect of β -carotene on plasma and blood cells *in vitro* is rather representative of the *in vivo* effect (Durand et al., 2003).

The present study aims at investigating the effect of the source of β -carotene, which includes its way of extraction, on its bioactivity on hemolysis of blood cells. Before evaluating bioactivity, we carried out a heat-treatment mimicking the process of formulation of the functional food and monitored the isomerization and degradation of β -carotene. The various carotenes studied, tested at different concentrations, were a β -carotene softly extracted without heat-assistance from gac, another natural β -carotene conventionally extracted and synthetic β -carotene.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Synthetic β -carotene (BCS) (purity > 97%) was obtained from Fluka (Sigma–Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Gac fruit β -carotene softly extracted by solvent without heat-assistance was from Natencaps, France (BCG: β -Carotene from Gac) and β -carotene conventionally extracted from natural raw material was obtained from a Chinese retailer (BCC: β -Carotene Conventionally extracted). All β -carotene samples were stored at -20 °C before use.

Fourteen volatile products chosen as potential oxidation products from carotenoids (Sommerburg et al., 2003; Carail et al., 2006) were used. β -Cyclocitral (> 90%), natural citral (> 95%), theaspirane (mixture of *cis* and *trans*, 85%), 6,10-dimethyl-5,9-undecadien-2-one (dihydropseudoionone, 97%), β -ionone (96%), pseudo ionone (mixture of isomers, \geq 90%), nerodiol, 3-methyl-4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-3-buten-2-one (α -iso-

methylionone, $\geq 85\%$) and 6-methyl-5-hepten-2-on (methylheptenone, 98%), were purchased from SAFC, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. Damascenone (natural, sol. 5% in ethanol), β -ionone epoxide, geraniol and dihydroactinidiolide were kindly furnished by IFF (France) S.A.R.L in Bois-Colombes and Robertet (Grasse, France).

Organic solvents used for dissolving β -carotene and for HPLC analysis including *n*-hexane, methyl-*tert*-butyl-ether (MTBE), acetonitrile and methanol were of HPLC-grade from Sigma-Aldrich. 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox) and potassium peroxydisulfate were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France).

2.2 Heating experiments

Each 2 ml-sample of β -carotene in *n*-hexane was poured in 14 ml-Pyrex-glass-tubes sealed by cap with an organic solvent-resistant joint. A high headspace was available in tubes to reduce the pressure developed when *n*-hexane boils. In this experiment, a 40 mg/l β -carotene solution was exposed to 80 °C in a bain-marie during 0, 30, 60, 120, 180 and 240 min respectively. Heat-treatment experiments were done in the dark and in triplicate.

2.3 UV-visible spectrometry

Samples were diluted in *n*-hexane (1:100) for measuring absorbance in an UV-vis spectrophotometer Shimadzu, UV-1650 PC (Tokyo, Japan) in the range of 250-550 nm at sampling intervals of 1 nm with a medium scan rate.

Cis-isomers were identified by their absorption λ_{\max} lower than those of all-*trans*-carotenoids and by the presence of the “*cis*” peak at the near-UV maximum (around 340 nm for β -carotene). The location of the *cis*-double bond was indicated by the $\%A_B/A_{II}$, which is the ratio of the height of the “*cis*” peak, designated A_B , to that of the middle main absorption peak, designated A_{II} . This ratio is an indicator of the intensity of the “*cis*” peak, which is greater as the *cis*-double bond is closer to the centre of the molecule.

The spectral fine structure of β -carotene after treatment was characterized by the large value of $\%III/II$, which is the ratio of the height of the longest-wavelength absorption peak (A_{III}), designated III, to that of the middle absorption peak (A_{II}), designated II, relative to the valley peak between them multiplied by 100. This value can be equal to 0 if

the peak A_{III} is present only as a shoulder (Rodriguez-Amaya 2001; Cao-Hoang et al., 2011).

According to the Beer-Lambert law, the absorbance of β -carotene in solution is directly proportional to the concentration. The following formula with the extinction coefficient of β -carotene $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$ at λ_{max} (450 nm) was used to estimate the concentration of total β -carotene isomers in solution based on the following calculation:

$$\text{total } \beta\text{-carotene content (mg/L)} = \text{Abs (450 nm)} \times \text{dilution} / (2592 \times 10000)$$

2.4 DAD-HPLC

β -Carotene was analyzed using the LaChrom Elite HPLC system (Hitachi High Technologies America, Inc., Schaumburg, USA) equipped with the L-2130 pump, an automatic injector and the L-2455 diode array detector (DAD). The AcclaimTM C30 column (C30, 5 μm , 4.6 x 150 mm, Dionex, ThermoScientific) was employed to analyze β -carotene samples at 10°C according to the guide from supplier. A solvent system of MTBE, acetonitrile, methanol (50:15:35, v/v/v) was used as mobile phase. The flow rate was of 1.0 ml/min and the detection wavelength was set to 220-600 nm. All samples were diluted ten times with *n*-hexane for injection. Isomers of β -carotene were identified by comparison of the separated isomer retention time and spectrum with identification data from the column supplier's guide. All β -carotene isomers had retention time lower than 30 min. Identification data from the spectrum were those described above (λ_{max} , "cis" peak and %A_B/A_{II}). The distribution percentage of β -carotene isomers in samples was determined from the percentage of the area of the compounds in the total area.

2.5 Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC)

The antioxidant activity of β -carotene solutions was measured spectrophotometrically using the TEAC assay. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) and potassium peroxydisulfate were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). All solvents used were of analytical grade.

The ABTS^{•+} radical cation solution was prepared by mixing 7 mM ABTS and 2.45 mM potassium persulfate in HPLC grade water. This solution was then stored during 16 h in the dark at room temperature before use. An ABTS^{•+} solution was prepared immediately before use by diluting the solution with methanol to an absorbance of 0.7 ± 0.01 at 734 nm. Trolox prepared at 1 mg/ml in methanol for stock solution was used as an antioxidant

standard. The reaction was incubated at 30 °C for 6 min. The absorbance was measured at 734 nm using methanol as blank. The β -carotene stock concentration was prepared at 25 ± 0.5 mg/L in hexane for testing at about 1.25 mg/L in reaction medium. The test was to compare the chemical antioxidant effect of β -carotene with the one of Trolox and giving the results in μmol Trolox equivalent (TE).

2.6 Cellular antioxidant activity on red blood cells (RBC) of β -carotene and its oxidation products

Whole horse blood BH-F from BIOMERIEUX[®] SA, Marcy l'Etoile, France were submitted in an isotonic phosphate buffer solution (pH 7.4) to organic free radicals from thermal decomposition of a 50 mM solution of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) (KRL test, SPIRAL, Couternon, France). The capability of erythrocytes to resist the free radicals generated from the thermal decomposition of a AAPH solution was evaluated at 37 °C for 3 hrs (Durand et al., 2003; Caspar-Bauguil et al., 2009)

The extracellular and intracellular antioxidant defenses contribute to maintain RBC membrane integrity and function until cell lysis. The total antioxidant activity of RBC was measured by the time required to reach 50% of maximal hemolysis (HT₅₀) of RBC exposed to a controlled free radical attack. The cell lysis was recorded using a 96-well microplate reader by measuring the optical density decay at 620 nm. Results were expressed as the increase rate in RBC's half-hemolysis time (in %HT₅₀) in comparison with control experiment and as the Trolox equivalent to β -carotene or oxidation volatile product ($\mu\text{mol}/\mu\text{mol}$). The measurement of HT₅₀ was very reproducible and was shown to be highly representative of the overall defense against free radicals in human and animal blood (Lesgards et al., 2002).

β -Carotene samples were evaporated under nitrogen at ambient temperature (25 °C) until dryness and then dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to make a 1 mg/mL stock solution. A sonication at room temperature (< 30 °C) during 10 min was applied to better dissolve β -carotene in DMSO. This solution was then dispersed in an isotonic phosphate buffer solution pH 7.4 (PBS) to be added into the blood solution at concentrations of 4, 20 and 100 μM . DMSO dissolved in PBS tampon at a final concentration of 0.44% was used for the control experiments.

The fourteen volatile products were directly dissolved in ethanol to make 22.5 mM-stock solutions. Their activity on RBC resistance was tested at concentrations from 10 to 1000 μ M. Ethanol (0.44%) in PBS tampon was used for the control experiments.

2.7 Data analysis

All results are given as mean \pm standard deviation of at least three experiments. Differences between variables were tested for significance by one way ANOVA procedure.

3. Results

To assess the bioactivity of β -carotene and its degradation products on red blood cells, it was first necessary to characterize precisely the modification undergone by carotenoid molecules during the heat-treatment. In that goal, several techniques were used and results are presented in this part followed by the assessment of the activity on red blood cells.

3.1 Spectroscopic characteristics and heat-degradation of β -carotene

The UV-Vis spectrum was first used to verify the global quality of β -carotene sources (Figure 1). Before heating, the main peak wavelength for all β -carotenes was at 451 nm. In addition, the natural conventionally extracted β -carotene (BCC) exhibited initially a minor peak at 425 nm and many other minor shoulders at shorter wavelengths of about 400 and 374 nm. After moderate heating at 80 °C, the spectra of all β -carotene samples changed with the rise of a *cis* peak at 340 nm and a 3-nm-blue shift of the maxima peak.

The concentration of total β -carotene of BCG, BCS and BCC during heating was estimated spectrophotometrically (Figure 2). At 80 °C, the loss of total β -carotenes of BCG and BCS samples was not significant. The total BCC β -carotene content decreased strongly from 60 min and lost about 30% after 240 min.

3.2 Kinetics of β -carotene isomerization during heat-treatment

The heating effect on β -carotene samples was further studied by DAD-HPLC. β -Carotene isomers were identified according to their spectrometric and chromatographic properties (Table 1) in comparison with the guide from the column supplier and with data available in the literature (Dan et al., 2008). Two β -carotene isomers, all-*trans*- β -carotene and 15-*cis*- β -carotene, were identified. All-*trans*- β -carotene displayed a UV-Vis peak at

452 nm as the main peak. The 15-*cis* isomer absorbed at 339 nm as the *cis* peak with the main peak shifted 6 nm shorter than the one of all-*trans*- β -carotene.

Table 2 shows the change in isomer distribution in β -carotene solutions during heat-treatments according to the DAD-HPLC analyses. Beside all-*trans*- and 15-*cis*- β -carotene, there was a small amount (%area < 1%) of other non-identified peaks that might be, according to their spectral properties, thermal oxidative degradation products of β -carotene (called x-carotenoids in this study).

Before heating, all-*trans* β -carotene was the major (> 97%) form encountered in all three sources. A small amount of 15-*cis*- β -carotene (0.3-1%) was already present in BCG and BCS solutions. X-carotenoids were not found in BCG sample while there was an amount of about 1% and 3% of non-identified carotenoids in BCS and BCC, respectively. After the heat treatment, only 15-*cis*- β -carotene was identified as the main *cis* isomer of β -carotene solutions. The kinetics of evolution of concentration for all-*trans*- β -carotene were similar for the three sources with a fast decrease rate for the first 30 min (0.57% per min), a lower rate of 0.15% per minute for the next 30 min and a stability at 76% of total area for the last 120 min heating. The percentage of 15-*cis* isomers increased accordingly to the all-*trans* decrease in BCS and BCG solutions. The percentage of x-carotenoids in BCS solution did not change during heating. In contrast for BCC, kinetics suggest that 15-*cis*- β -carotene, which was formed in the beginning, was transformed at the end into x-carotenoids.

3.3 β -Carotene isomer activity on ABTS^{•+} radical cation discoloring

The evolution kinetic of the antioxidant capacity of β -carotene samples during heating on ABTS^{•+} radical cation discoloring is shown in Figure 3. Before heating, the antioxidant property of the synthetic β -carotene (BCS) was slightly higher than the one of the natural β -carotenes (BCG and BCC) ($P > 0.05$) with 2.1 ± 0.3 TE (BCS) and 1.7 ± 0.2 TE (BCG, BCC). During heat-treatment, the BCS solution exhibited unchanged antioxidant properties with 2.2 TE while there was a slight increase in antioxidant activity of natural β -carotenes (BCG and BCC) to 2.1 ± 0.2 TE (BCG) and 2.2 ± 0.3 TE (BCC). However, these increases on the antioxidant activity of β -carotenes were not significant ($P > 0.05$).

3.4 β -Carotene activity on red blood cell (RBC) resistance to free radicals

When absorbed, β -carotene is first encountered in plasma at concentrations that can be high especially in supplemented diets although other tissues are targeted (Biesalski et al., 2008). In plasma, blood cells are often submitted to many oxidant stresses coming from intra- and extra-cellular sources (Machlin et al., 1987). The measurement of half-hemolysis (%HT₅₀) was used as it is reproducible and representative of the overall defense against free radicals in human and animal blood (Lesgards et al., 2002). Figure 4 shows the antioxidant effect of β -carotene at different concentrations and coming from various origins through different processes, on the global potential of antiradical defense of blood. The results were interpreted in %HT₅₀ and in Trolox equivalent (TE).

3.4.1 Bioactivity of β -carotene as a function of its concentration and origin in relationship with heat-induced modification

The antioxidant activity of β -carotene on RBC depended on its concentration in the reaction medium in relationship with its origin. The increase in concentration of β -carotene enhanced RBC resistance to free radical up to around a 170% increase in HT₅₀. Once this value reached, increasing concentrations had no effect. Indeed, before heating, at a concentration of 20 μ M, BCG and BCS resulted in a fivefold higher increase in %HT₅₀ than at 4 μ M. For the highest concentration of 100 μ M, the increase in HT₅₀ was lower, around 127% (BCG) and 101% (BCS). Contrasting with these β -carotene sources, the %HT₅₀ of BCC increased less significantly and BCC became pro-oxidant for a concentration of 100 μ M.

Furthermore, the difference between the antioxidant behaviors of the three β -carotene sources was more clear when they were heated. After the heat-treatment, the presence of the mixture of β -carotene isomers (identified by HPLC) enhanced the RBC resistance to hemolysis ($P < 0.05$) for preparations from all β -carotene origins (BCG, BCS and BCC) at the lowest concentration (4 μ M). Heating provoked an increase in HT₅₀ of 116% (BCG), 115% (BCS) and 134% (BCC) ($P > 0.05$), which was four-fold higher than for unheated carotenes ($P < 0.05$). At 20 μ M, BCG and BCS increased slightly their antioxidant activity around the same maximum %HT₅₀ value as before heating, 169% ($P < 0.05$) and 144% ($P > 0.05$), respectively. On the contrary, heated BCC lost significantly its antioxidant properties at the concentration of 20 μ M ($P < 0.05$) and caused a hemolytic effect on RBC at the highest concentration. These results show that natural β -carotene from gac (BCG) and synthetic β -carotene (BCS) exhibited a similar antioxidant activity on

blood cells. The natural β -carotene conventionally extracted (BCC) had a pro-oxidant property in relationship with its concentration and heat-treatment.

3.4.2 Antioxidant activity of β -carotene in Trolox equivalent (TE)

Before heating, at 4 μM , the antioxidant activity of one μmol of BCG and BCC corresponded to 22.7 ± 1.5 and 17.3 ± 1.1 μmol Trolox, respectively, but it was lower, at 15.8 ± 1.0 (BCG) and 11.2 ± 0.7 TE (BCC) for 20 μM while the BCS one went up from 11.8 ± 0.8 to 17.4 ± 1.1 TE when increasing the concentration. At the highest concentration, the antioxidant activity of all three sources was not significantly different from one TE. Heating, for its part, triggered the activity of β -carotenes to around 60 TE at 4 μM , decreased it slightly at 20 μM to 16.4 ± 0.2 (BCG), 14.3 ± 7.7 (BCS) and 5.3 ± 1.2 TE (BCC). Finally, at 100 μM , heating had no effect on the activity which remained around one TE.

3.5 Effect of volatile degradation products of β -carotene on RBC

To explain the contrasting results of β -carotene activity on RBC resistance, the antioxidant (or pro-oxidant) properties of its oxidation or degradation products were investigated. Fourteen potential volatile products of carotenoid oxidation were tested on RBC for their capacity to increase %HT₅₀ as a function of the concentration (10 - 200 μM) as shown in Figure 5. Generally, all volatile products tested had a slight antioxidant activity that varied between a 2% to a 19% increase in HT₅₀ except damascenone that exhibited more than twice as much antioxidant activity (45% increase in HT₅₀).

4. Discussion

The effect of β -carotene from different sources was studied on blood. In that goal, the toxicity of synthetic and natural β -carotenes and of their degradation products was assessed through a study of blood cell hemolysis to provide information for potential applications of these substances.

Before testing on biological material, the antioxidant capacity of β -carotene and its isomers were evaluated by the TEAC test. This classical test is based on the chemical reaction of conversion of the blue ABTS radical cation into its colorless neutral form by contact with an antioxidant. For unheated samples, the synthetic β -carotene solution was slightly more antioxidant than natural β -carotenes ($P < 0.1$). During heating, the increase in the proportion of 15-*cis*-isomer in natural samples was correlated with the slight increase

in the antioxidant activity of β -carotene preparations. This very low increase in the antioxidant activity in presence of *cis*-isomers does not contradict the results reported by Böhm et al. (2001) in which no significant differences in the antioxidant capacity of all-*trans*- β -carotene and 15-*cis*- β -carotene were observed through the discoloring of ABTS radical cation.

Contrasting with the TEAC results, for the evaluation of the antioxidant activity of β -carotene on blood cells submitted to a free radical attack, a clear correlation was found with the level of isomerization of β -carotene. The observation that, after heating, β -carotenes enhanced RBC resistance to hemolysis at lower concentration was probably due to the increase in the proportion of *cis*- β -carotenes that would be more bioactive than the all-*trans*-one. However, contrasting results have been published on the antioxidant properties of *cis*-isomers of β -carotene, some reporting a lower antioxidant activity towards plasma lipoproteins in vitro (Lavy et al., 1993) and a lower bioavailability in gerbils in vivo (Deming et al., 2002) compared to all-*trans*- β -carotene. Beside the intrinsic reactivity of the molecule, the enhancement of the antioxidant property of *cis*- β -carotene can be explained by its greater availability through a better solubility than the all-*trans* one as observed previously with hydro-soluble micelles (Boileau et al., 1999). Indeed, *cis*-isomers have lower melting points than their all-*trans* counterparts, due to a decrease in their crystallization capacity (Schieber et al., 2005). These opposite results could be caused by the different accessibility degree of β -carotene, as a lipophilic compound, to oxidant generated in hydrophilic or hydrophobic systems (Yeh et al., 2000). The reason why 15-*cis*- β -carotene is more antioxidant in biological systems could be related to its greater dispersion more than to its enhanced reactivity.

In the blood cell hemolysis process, reactive oxygen species generated in plasma, cell membrane, or intracellular compartments attack erythrocyte membranes, compromise cell integrity, and induce oxidation of lipids and proteins (Delmas-Beauvieux et al., 1995; Bracci et al., 2002). Additionally, the peroxy radicals (ROO^{\bullet}) generated by the water-soluble AAPH induce oxidation of polyunsaturated lipids in blood-cell membrane and may cause lipid peroxidation (Chen et al., 2009). That is why the location of the antioxidant between hydrophilic and hydrophobic phases is important and its localization in cell membrane could probably reduce the oxidant effect on cell hemolysis. In presence of membranes, β -carotene localizes in the interior of the membrane bilayer or of lipoproteins (Zhang et al., 2001). Its size and completely hydrophobic character makes it lie without contact with the polar heads of phospholipids mostly parallel with the membrane surface

and deep within the hydrophobic core (Cao-Hoang et al., 2010). In this location, it impacts on erythrocytes membrane fluidity (Han et al., 2011) and exhibit a protecting effect against lipid peroxidation and lipid protein damages (Sarkar et al., 1995).

In vitro, a few studies have reported the relationship between high doses of carotenoids and their pro-oxidant effects under controlled oxygen tension (Young et al., 2001). Our results (fig 4A) from BH-F blood cells at normal oxygen tension (fewer than 95% air) showed that, with increasing concentrations, isomer-rich β -carotene preparations did not increase the antioxidant activity. At higher concentration, it is likely that β -carotene perturbs the membrane structure, the more so as it is poorly soluble, even in plasma membranes, and growing concentrations will generate aggregates (Cao-Hoang et al., 2010) resulting in a phenomenon of saturation of its activity. Contrasting with β -carotene, Trolox is a highly hydro-soluble antioxidant, which traps mostly oxidant compounds in aqueous compartments. This explains that β -carotene is far more active than Trolox on RBC but their difference in activity decreases when the concentration increases (fig 4B).

Besides, BCC exhibited pro-oxidant properties at higher concentration. β -Carotene itself behaves as a free radicals scavenger but it might promote lipid peroxidation or exhibit the formation of free radicals and other reactive oxygen species at high concentration (Palozza et al., 2003). Among them, carotenoid oxidation products (typically epoxides or apo-carotenals produced via oxidative cleavage) may influence the antioxidant (or pro-oxidant) activities of carotenoids in biological systems (Young et al., 2001; Alija et al., 2004). That might be a reason why using high-dose- β -carotene supplements do not show protective effects against cancer or cardiovascular disease (Paiva et al., 1999). Regarding the conventionally extracted β -carotene at the highest concentration, it accelerated the hemolysis of blood cells, the more so if it was heat-treated (results not shown). The HPLC analyses showed an amount of unidentified carotenoids in the BCC sample which increased after heating. They were mostly detected at shorter retention times and with spectral maxima at shorter wavelengths around 400 nm by DAD-HPLC (results not shown). From these results they are likely to be long-chain oxidized molecules of β -carotene. The high temperature used during conventional extraction could be responsible for the β -carotene oxidation products that continued to be degraded during heating in our study, with a significant decrease in the carotene concentration from BCC after heating. Beside long-chain oxidized carotenoids, the products of β -carotene degradation are also volatile short-chain compounds (Sommerburg et al., 2003; Carail et al., 2006). Our results on the bioactivity of the main potential volatile products of carotenoid oxidation

demonstrated that they were not the cause of BCC pro-oxidation effect, which could come from long-chain oxidized substances.

In conclusion, our study shows that the antioxidant or pro-oxidant activity of β -carotene on BH-F blood cells is dependent on its concentration, its source and its extraction process which could alter its accessibility to oxidant radicals, its location in cell membranes and the presence of long-chain oxidized carotene. During heat-processing, 15-*cis*- β -carotene, the best isomer for vitamin A generation (Waché et al., 2003) is produced. This isomer exhibits more antioxidant properties than the all-*trans* one thanks to its greater solubility *in vitro*. However, for longer processing, β -carotene is transformed into oxidant forms (for BCC). For functional foods, heat-processing causes a significant effect on the stability and bioactivity of β -carotene which were dependent on its origin. The results suggest that β -carotene should not be too much heat-processed and that at less than 4 μM it has a good antioxidant efficacy on hemolysis resistance.

References

- Alija, A.J., Bresgen, N., Sommerburg, O., Siems, W., & Eckl, P.M. (2004). Cytotoxic and genotoxic effects of β -carotene breakdown products on primary rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 25(5), 827-831.
- Biesalski, Hans Konrad, & Tinz, Jana. (2008). Nutritargeting. *Advances in Food and Nutrition Research*, 54, 179-217.
- Böhm, Volker, Puspitasari-Nienaber, Ni Luh, Ferruzzi, Mario G., & Schwartz, Steven J. (2001). Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(1), 221-226.
- Boileau, Amy C., Merchen, Neal R., Wasson, Katherine, Atkinson, Christine A., & Erdman, John W. (1999). Cis-Lycopene Is More Bioavailable Than Trans-Lycopene In Vitro and In Vivo in Lymph-Cannulated Ferrets. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 129, 1176-1181.
- Bracci, R., Perrone, S., & Buonocore, G. (2002). Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. *Acta Paediatrica Supplement*, 91, 130-134.
- Britton, George. (1989). Carotenoid Biosynthesis — An Overview. In Norman I. Krinsky, MichelineM Mathews-Roth & RichardF Taylor (Eds.), *Carotenoids* (pp. 167-184): Springer US.
- Burton, G. W., & Ingold, K.U. (1984). β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224, 569-573.

- 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.
- Cao-Hoang, Lan, Phan-Thi, Hanh, Osorio-Puentes, Francisco J., & Waché, Yves. (2011). Stability of carotenoid extracts of gâc (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation — Protective effect of lycopene on β -carotene. *Food Research International*, 44, 2252-2257.
- Cao-Hoang, Lan, & Waché, Yves. (2010). Factors governing the dispersion of highly apolar compounds in polar environment: case of β -carotene. *Nanotechnology Research Journal*, 3(1-2), 35-50.
- Carail, Michel, & Caris-Veyrat, Catherine. (2006). Carotenoid oxidation products: From villain to saviour?*. *Pure and Applied Chemistry*, 78, 1493-1503.
- Caspar-Bauguil, Sylvie, Maestre, Nicolas, Segafredo, Céline, Galinier, Anne, Garcia, Jésus, Prost, Michel, . . . Casteilla, Louis. (2009). Evaluation of whole antioxidant defenses of human mononuclear cells by a new in vitro biological test: Lack of correlation between erythrocyte and mononuclear cell resistance to oxidative stress. *Clinical Biochemistry*, 42(6), 510-514.
- Chen, Yifan, & Deuster, Patricia. (2009). Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chemico-Biological Interactions*, 182(1), 7-12.
- Dan, CHOU, Zhi-Rong, CHEN, & Hao-Ran, LI. (2008). Qualitative Analysis of β -carotene Isomers. *Food Science*, 29(4), 50-53.
- Delmas-Beauvieux, M.C., C.Combe, Penchant, E., Carbonneau, M.A., Dubourg, L., Précigout, V. de, . . . Clerc, M. (1995). Evaluation of Red Blood Cell Lipoperoxidation in Hemodialysed Patients during Erythropoietin Therapy Supplemented or Not with Iron. *Nephron*, 69, 404-410.
- Deming, Denise M., Teixeira, Sandra R., & Erdman, John W. (2002). All-trans β -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis β -Carotene in Gerbils Given Single Oral Doses of Each Isomer. *The Journal of Nutrition*, 132(9), 2700-2708.
- Durand, G., Polidori, A., Salles, J. P., Prost, M., Durand, P., & Pucci, B. (2003). Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derived from PBN and lipoic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(16), 2673-2676.
- Han, Xiu-Xia, Zhang, Ming, Ma, Ai-Guo, Ge, Sheng, Shi, Xue-Xiang, Sun, Yong-Ye, . . . Liang, Hui. (2011). Antioxidant micronutrient supplementation increases erythrocyte membrane fluidity in adults from a rural Chinese community. *British Journal of Nutrition*, 106(11), 1676-1682.
- Hennekens, Charles H., Buring, Julie E., Manson, JoAnn E., Stampfer, Meir, Rosner, Bernard, Cook, Nancy R., . . . Peto, Richard. (1996). Lack of Effect of Long-Term Supplementation with Beta Carotene on the Incidence of Malignant Neoplasms and Cardiovascular Disease.

New England Journal of Medicine, 334(18), 1145-1149. doi:
doi:10.1056/NEJM199605023341801

- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2013). Jam processing and storage effects on β -carotene and flavonoids content in grapefruit. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 736-744.
- Khan, MuhammadIssa, Anjum, FaqirMuhammad, Sohaib, Muhammad, & Sameen, Aysha. (2013). Tackling metabolic syndrome by functional foods. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(3), 287-297.
- Kuhnen, Shirley, Lemos, Priscilla Maria Menel, Campestrini, Luciano Henrique, Ogliari, Juliana Bernardi, Dias, Paulo Fernando, & Maraschin, Marcelo. (2009). Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. *Journal of Functional Foods*, 1(3), 284-290.
- Lavy, Alexandra, Amotz, A. Ben, & Aviram, M. (1993). Preferential Inhibition of LDL Oxidation by the all-*trans* Isomer of β -carotène in Comparison with 9-*cis* β -carotène. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 31, 83-90.
- Lesgards, Jean-François, Durand, Philippe, Lassarre, Magali, Stocker, Pierre, Lesgards, Guy, Lanteaume, André, . . . Lehucher-Michel, Marie-Pascale. (2002). Assessment of Lifestyle Effects on the Overall Antioxidant Capacity of Healthy Subjects. *Environmental Health Perspectives*, 110, 479-487.
- Machlin, L J, & Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- Marchetti, Enrico, Monaco, Annalisa, Procaccini, Laura, Mummolo, Stefano, Gatto, Roberto, Tete, Stefano, . . . Marzo, Giuseppe. (2012). Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 88.
- Nakagawa, Kiyotaka, Fujimoto, Kenshiro, & Miyazawa, Teruo. (1996). β -Carotene as a high-potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1299(1), 110-116.
- Omenn, Gilbert S., Goodman, Gary E., Thornquist, Mark D., Balmes, John, Cullen, Mark R., Glass, Andrew, . . . Hammar, Samuel. (1996). Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1150-1155.
- Paiva, Sergio A. R., & Russell, Robert M. (1999). β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 426-433.
- Palozza, Paola, Serini, Simona, Di Nicuolo, Fiorella, Piccioni, Elisabetta, & Calviello, Gabriella. (2003). Prooxidant effects of [beta]-carotene in cultured cells. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(6), 353-362.

- Phan-Thi, Hanh, & Waché, Yves. (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*(0), 58-63.
- Rodriguez-Amaya, Delia B. (2001). Some physicochemical properties of carotenoids. In Delia B. Rodriguez-Amaya (Ed.), *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington DC: ILSI PRESS International Life Sciences Institute. (Reprinted from: ILSI Press).
- Sarkar, A., Bishayee, A., & Chatterjee, M. (1995). Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. *Cancer biochemistry biophysics*, *15*(2), 111-125.
- Schieber, Andreas, & Carle, Reinhold. (2005). Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, *16*, 416-422.
- Siriamornpun, Sirithon, Kaisoon, Onanong, & Meeso, Naret. (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of Functional Foods*, *4*(4), 757-766.
- Sommerburg, Olaf, Langhans, Claus-Dieter, Arnhold, Jürgen, Leichsenring, Michael, Salerno, Costantino, Crifò, Carlo, . . . Siems, Werner G. (2003). β -Carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid—a model for neutrophil-derived degradation. *Free Radical Biology and Medicine*, *35*(11), 1480-1490.
- Waché, Yves, Bosser-DeRatuld, Aurélie, Lhuguenot, Jean-Claude, & Belin, Jean-Marc. (2003). Effect of *cis/trans* Isomerism of β -Carotene on the Ratios of Volatile Compounds Produced during Oxidative Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(7), 1984-1987.
- Weedon, B.C.L. (1971). Stereochemistry. In O. Isler (Ed.), *Carotenoids* (pp. 267-323). Stuttgart: Birkhäuser Verlag Basel.
- Yeh, Shu-Lan, & Hu, Miao-Lin. (2000). Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *11*(11–12), 548-554.
- Young, Andrew J., & Lowe, Gordon M. (2001). Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *385*(1), 20-27.
- Zhang, Peng, & Omaye, Stanley T. (2001). β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *12*(1), 38-45.

Tables
Table 1. Identification data for β -carotene isomers separated by DAD-HPLC^a, compared with data from the literature (in parentheses)

β -Carotene isomers	Retention time (min)	<i>Cis</i> peak λ (nm)	Main peak λ (nm)	%A _B /AII ^b	%III/II ^c
<i>all-trans</i>	22.8 (19.2)	--	452 (451.4)	5 (5)	25
<i>15-cis</i>	21.0 (16.8)	339 (338.7)	444 (443.8)	43 (41)	6

^aHPLC mobile phase of MTBE-Acetonitrile-Methanol (50:15:35, v/v/v). C30 column (C30, 5 μ m, 4.6 x 150 mm, Dionex, ThermoScientific) was employed to separate β -carotene isomers at 10 °C.

Corresponds to ^bcis ratio and ^cfine structure ratio.

Table 2. Evolution during heating of the area percentage of each β -carotene isomer in total area of gac β -carotene (BCG), synthetic β -carotene (BCS) and conventionally extracted β -carotene (BCC) followed by DAD-HPLC

β -Carotene isomers	Area percentage in total area of β -carotenes (%)					
	Heat-treatment time (min)					
	0	30	60	120	180	240
BCG						
<i>all-trans</i>	99.7 \pm 6.1	81.2 \pm 1.4	76.4 \pm 2.1	75.5 \pm 1.7	75.6 \pm 3.7	75.6 \pm 4.2
<i>15-cis</i>	0.3 \pm 0.1	18.8 \pm 6.3	23.6 \pm 5.5	24.5 \pm 1.4	24.4 \pm 2.1	24.4 \pm 2.5
x-carotenoids	nd	nd	nd	nd	nd	nd
BCS						
<i>all-trans</i>	98.3 \pm 4.7	81.2 \pm 4.3	77.0 \pm 5.1	76.2 \pm 11.0	75.8 \pm 10.9	76.0 \pm 10.5
<i>15-cis</i>	1.0 \pm 1.1	18.0 \pm 5.1	22.2 \pm 3.4	23.1 \pm 2.5	23.4 \pm 2.1	23.0 \pm 1.5
x-carotenoids	0.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.5	0.8 \pm 0.6	0.7 \pm 0.4	0.8 \pm 0.6	1.0 \pm 0.9
BCC						
<i>all-trans</i>	96.8 \pm 1.3	81.4 \pm 0.5	76.5	76.4 \pm 2.5	76.9 \pm 6.2	76.6 \pm 6.0
<i>15-cis</i>	nd	15.4 \pm 4.2	20.3	20.4 \pm 4.3	19.4 \pm 1.0	16.8 \pm 2.7
x-carotenoids	3.3 \pm 0.6	3.2 \pm 0.9	3.1	3.2 \pm 1.4	3.6 \pm 1.9	6.6 \pm 1.3

nd: non determined

Figures

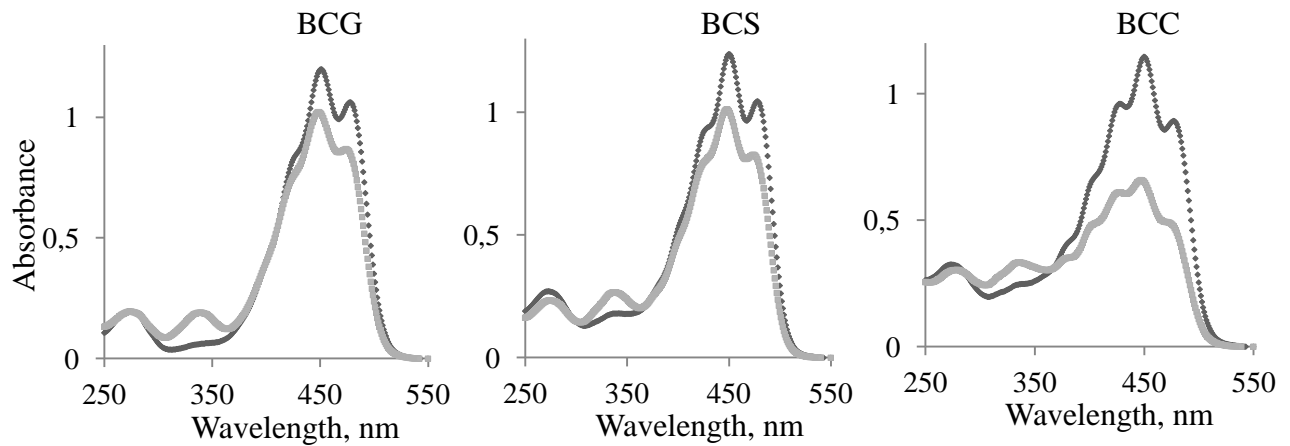


Figure 1. UV-Vis absorption spectra of gac β -carotene (BCG), synthetic β -carotene (BCS) and conventionally extracted β -carotene (BCC) in hexane in the range of 250-550 nm before (\blacklozenge) and after (\blacksquare) heating at 80 °C for 240 min.

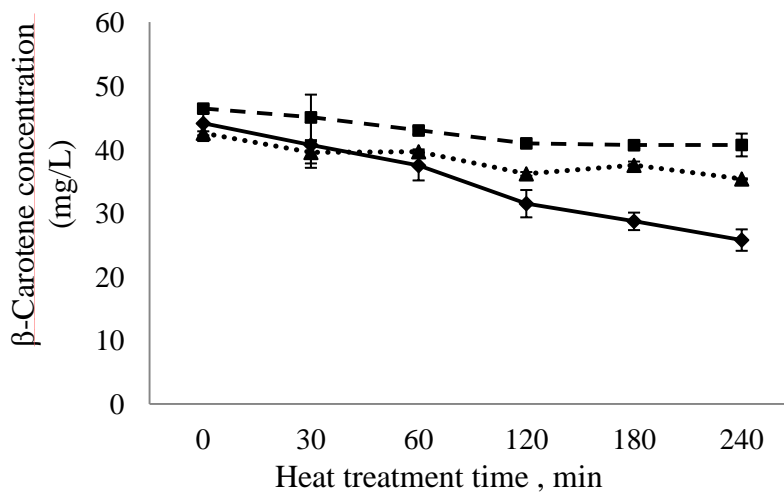


Figure 2. Concentration changes of gac β -carotene (BCG) (\blacksquare dashed line), synthetic β -carotene (BCS) (\blacktriangle dotted line) and conventionally extracted β -carotene (BCC) (\blacklozenge full line) as a function of heating time at 80 °C in hexane, calculated with $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$ at $\lambda_{\text{max}} 450$ nm (according to the Beer-Lambert law)

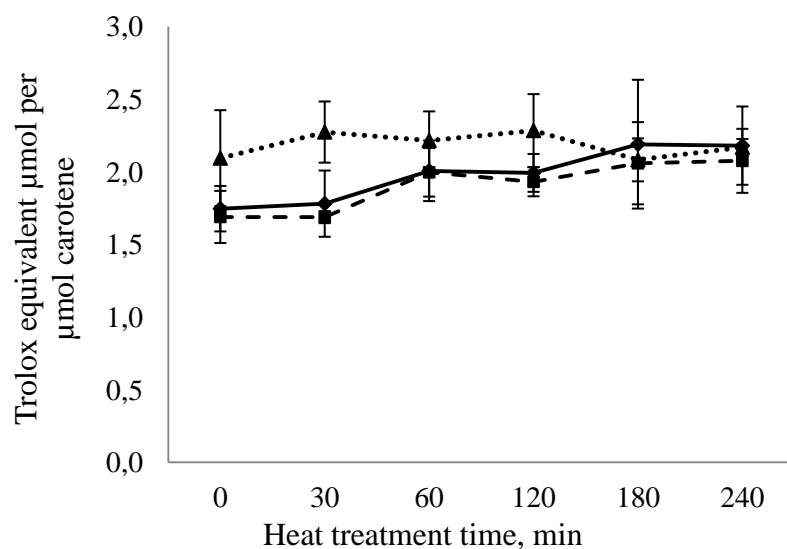


Figure 3. Total antioxidant activity evolution of gac β -carotene (BCG) (■ dashed line), synthetic β -carotene (BCS) (▲ dotted line) and conventionally extracted β -carotene (BCC) (◆ full line) on ABTS⁺ radical cation discoloring as a function of heating time at 80 °C in hexane, in Trolox equivalent. The reaction was incubated with β -carotene (1.25 mg/L in methanol) in the dark at 30 °C for 6 min

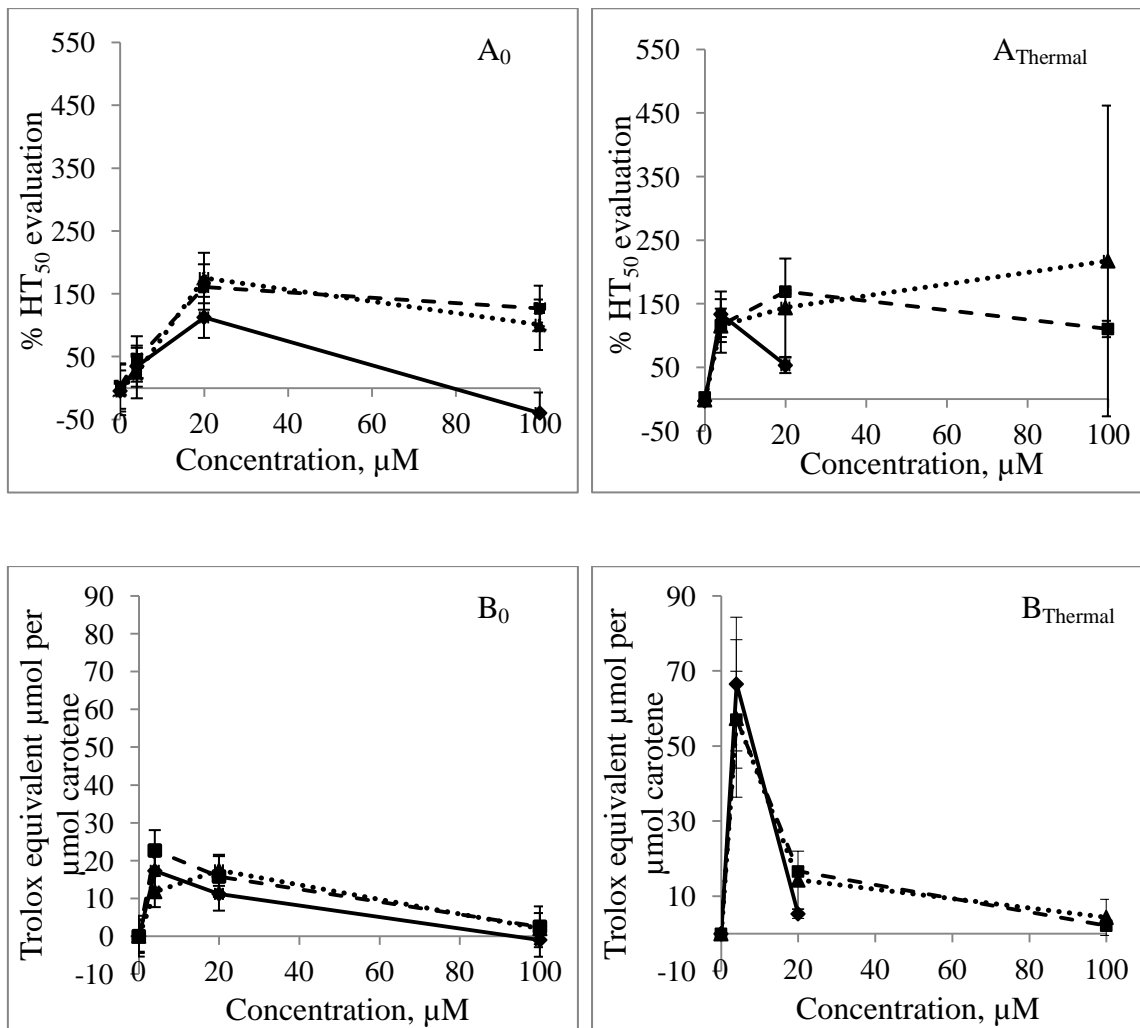


Figure 4. Total antioxidant activity evolution of gac β -carotene (BCG) (■ dashed line), synthetic β -carotene (BCS) (▲ dotted line) and conventionally extracted β -carotene (BCC) (◆ full line) before and after heating at 80 °C for 240 min in hexane on BH-F cell resistance as function of their concentration, in comparison with the increase rate of RBC's half-hemolysis time (A_0 , $A_{Thermal}$) and with Trolox equivalent (B_0 , $B_{Thermal}$). BH-F cells submitted to free radical thermal decomposition of AAPH were incubated with β -carotene (4, 20 and 100 μ M) in 5% DMSO in PBS tampon at 37 °C for 3 hrs; values: means \pm SD (n = 5)

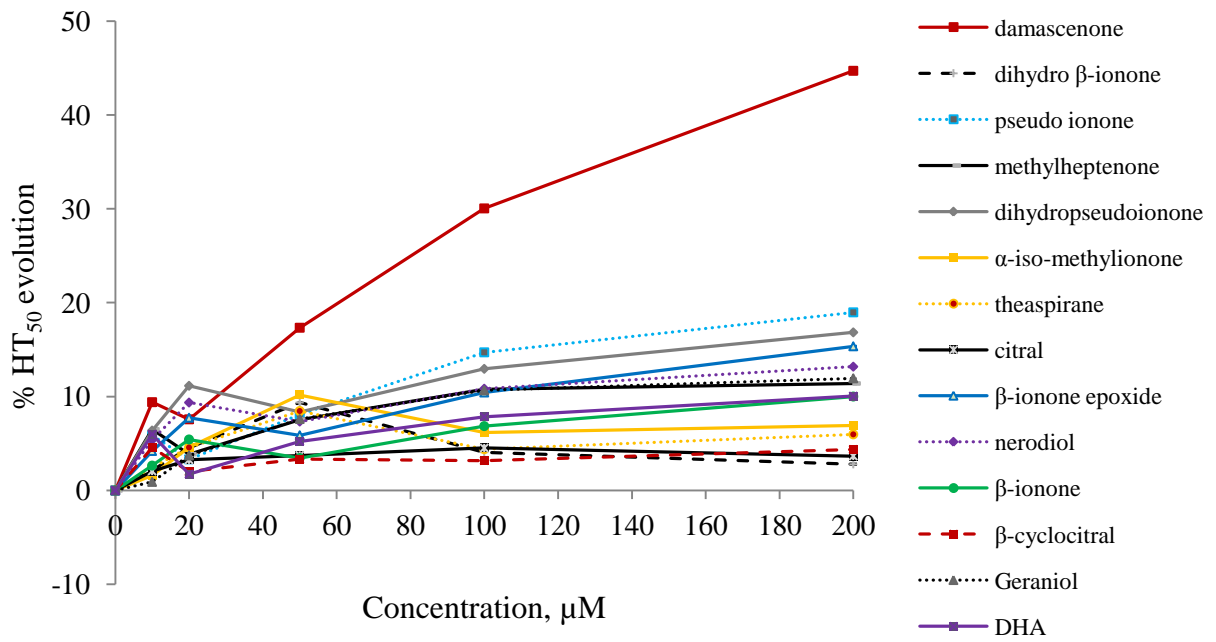


Figure 5. Antioxidant activity evolution of oxidation products of β -carotene as a function of concentration on RBC resistance in comparison with the increase rate of RBC's half-hemolysis time. BH-F cells submitted to free radical thermal decomposition of AAPH were incubated with volatile products of carotenoid degradation (10-200 μ M) in ethanol 0.44% in PBS tampon at 37 °C for 3 hrs.

3.4.3 Huile de palme (CPO) : source naturelle d'isomères de β -carotène

Connue comme une source de β -carotène naturelle, l'huile de palme a fait l'objet de nombreuses études sur l'extraction et la stabilité de ce pigment (Baharin et al., 2001; Latip et al., 2001; Fauzi et al., 2011). Le β -carotène de la CPO est extrait avec l'huile de la pulpe des fruits du palmier par pression à chaud après plusieurs traitements thermiques pour blanchir les fruits et les déstructurer, ce qui constitue des traitements destructifs du β -carotène. Dans notre étude, nous nous sommes également intéressés à la qualité et à l'activité du β -carotène de CPO comme autre exemple de source de β -carotène.

3.4.3.1 Caractérisation et stabilité du β -carotène de CPO

La CPO a été diluée directement dans l'hexane pour une analyse spectroscopique. La plupart des acides gras saturés (surtout l'acide palmitique) a été éliminée par une centrifugation de CPO congelée à -20°C dans l'hexane. Le spectre de la CPO a été comparé avec celui du β -carotène de synthèse (93 % de β -carotène *all-trans*). La figure 29 montre que l'huile est riche en β -carotène *cis*, avec deux pics majeurs aux longueurs d'onde (λ_{max}) à 445 nm et 472 nm et un pic *cis* à 335 nm. Par rapport au β -carotène de synthèse, le spectre du β -carotène de CPO est décalé vers la gauche de 5 nm. L'augmentation de l'absorbance à longueur d'onde de 250 à 300 nm peut être causée par la présence d'huile ou d'autres produits oxydés des caroténoïdes (Cao-Hoang et al., 2011).

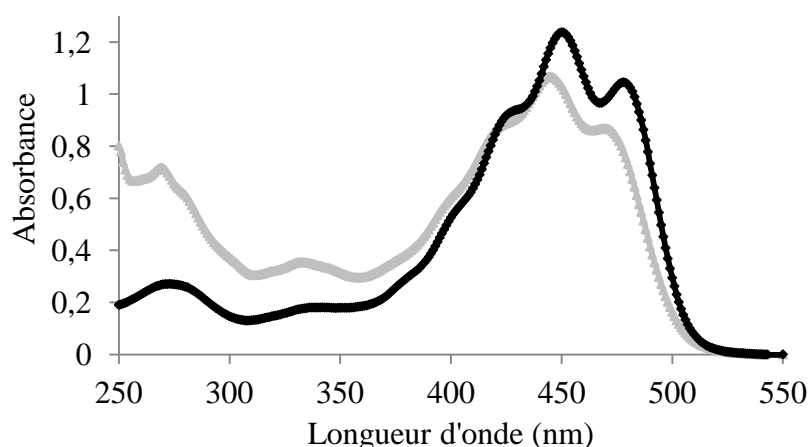


Figure 29 : Absorbance spectrale du β -carotène de CPO dans l'hexane (en gris) en comparaison avec le lycopenne *all-trans* naturel de Sigma-Aldrich (en noir)

Le spectre global ci-dessus présente un mélange de plusieurs *cis*-isomères du β -carotène avec certains autres caroténoïdes de CPO. Son analyse HPLC-DAD avec le même protocole décrit dans l'article 3.4.2 nous permet de les identifier. Nous avons trouvé dans

la CPO une majorité de β -carotène *all-trans*, une présence importante d' α -carotène *all-trans*, 3 autres isomères du β -carotène (*9-cis*, *13-cis* et *15-cis*) et une petite quantité de caroténoïdes non identifiés (appelé X) (tableau 19 et figure 30).

Tableau 19 : Données d'identification des isomères des caroténoïdes de CPO, analysés par HPLC-DAD^a

Isomères	Temps de rétention (min)	Longueur d'onde (nm)			% A _B /A _{II}	% III/II
β -Carotène <i>all-trans</i>	22.81	(425)	452	478		25
β -Carotène <i>9-cis</i>	23.05	340	448	474	11	21
β -Carotène <i>13-cis</i>	20.25	332	438	464	18	39
β -Carotène <i>15-cis</i>	21.03	339	444	470	43	6
α -Carotène <i>all-trans</i>	21.85	423	446	473		55

^a Phase mobile d'HPLC : MTBE-ACN-MeOH (50:15:35, v/v/v)

Pour étudier la stabilité du β -carotène de CPO, un traitement thermique à 80°C pendant 240 min a été réalisé. Un volume de 6 mL de CPO diluée dans l'hexane pour une concentration d'environ de 40 mg/L de β -carotène a été chauffé dans des tubes en Pyrex de 14 mL avec des bouchons résistants au solvant. La figure 30 nous montre la répartition des isomères du β -carotène et des autres caroténoïdes de CPO après différentes durées de traitement. Après 240 min de chauffage, il y avait une diminution de 10 % de β -carotène *all-trans* et de 13 % d' α -carotène *all-trans* de la CPO. Le pourcentage de β -carotène *15-cis* a légèrement augmenté pendant que le *9-cis* et le *13-cis* ont légèrement diminué après traitement thermique. Par ailleurs, la proportion de caroténoïdes X a fortement augmenté de 5 % au départ à 14 % après 240 min de traitement. Nous supposons qu'une partie des caroténoïdes X est constituée de *cis*-isomères d' α -carotène que l'on n'a pas encore identifiés car il y avait une perte d' α -carotène *all-trans* pendant le chauffage. Une autre possibilité est que le β -carotène *all-trans* ait été *cis*-isomérisé et les *cis*-isomères du β -carotène existants auraient été dégradés en produits oxydés non identifiés.

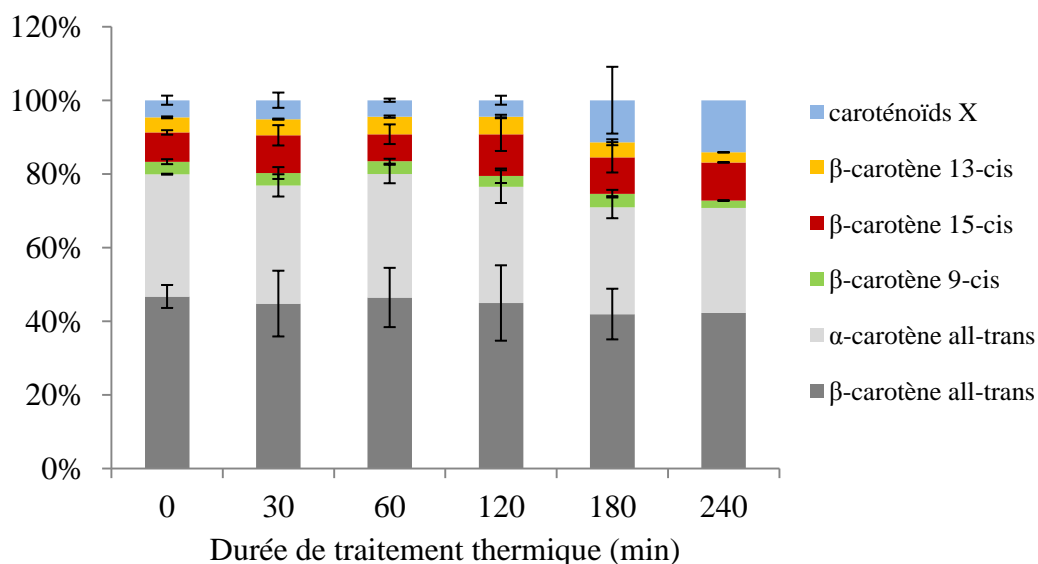


Figure 30 : Evolution de la composition en *cis*-isomères des caroténoïdes de CPO durant le traitement thermique à 80°C (0-240 min), dans l'hexane

3.4.3.2 Activité antioxydante du β-carotène de CPO

Les propriétés antioxydantes des solutions de β-carotène de CPO avant et après le traitement thermique ont ensuite été appréciées. La concentration testée a été calculée d'après le β-carotène sans prendre en compte la présence d'autres caroténoïdes. Les résultats du test TEAC sont présentés en μmole Trolox équivalents à une μmole de β-carotène. La figure 31 montre l'évaluation des propriétés antioxydantes du β-carotène de CPO en fonction des durées de chauffage. Les résultats obtenus montrent que le traitement thermique n'a pas changé l'activité antioxydante de ces solutions qui varie entre 3 et 3,5 TE. Par rapport au β-carotène de synthèse, cette dernière valeur est plus élevée d'une μmole TE. Comme expliqué plus haut (du tableau 19), le β-carotène de la CPO est mélangé avec de l'α-carotène *all-trans* qui peut être plus antioxydant que le β-carotène (Böhm et al., 2001). De plus, la CPO est extraite de fruits de palmes qui sont riches en vitamine E (Goh et al., 1985). La présence d'un autre antioxydant comme la vitamine E peut augmenter la capacité antioxydante totale de la solution des caroténoïdes.

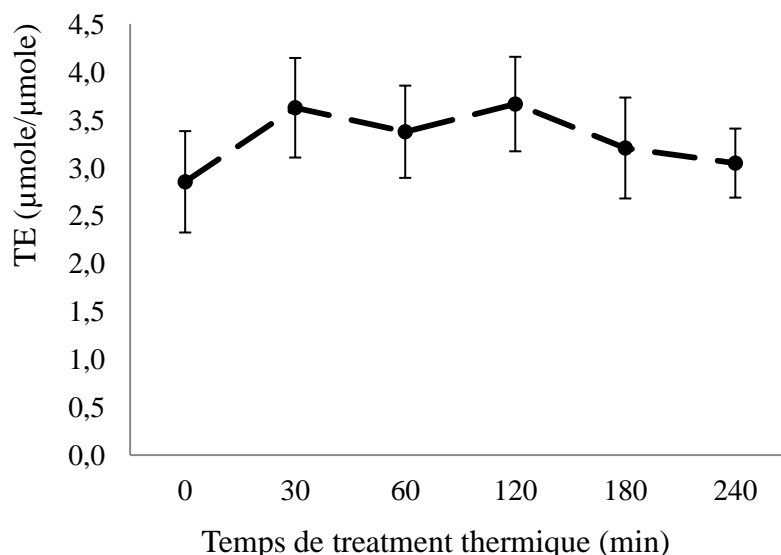


Figure 31 : Evolution de l'activité antioxydante du β -carotène de CPO durant le traitement thermique à 80°C (0-240 min) dans l'hexane, par le test TEAC

L'impact antioxydant du β -carotène de CPO sur les cellules sanguines a également été étudié aux concentrations de 4, 20 et 100 μ M. L'hexane a été évaporé sous un flux d'azote à 25°C pour récupérer l'huile réduite des acides gras saturés et riche en β -carotène. Les autres étapes de la préparation de la solution ont été suivies comme écrit dans l'article 3.4.2. La figure 32 illustre l'activité de CPO sur l'hémolyse du sang par les valeurs d'absorbance. On n'y trouve aucune évolution de la capacité antioxydante des caroténoïdes de l'huile en fonction du chauffage. En revanche, par rapport à l'hémolyse du sang témoin qui se déroule après 60 à 80 min, la présence de cette source de β -carotène provoque une hémolyse immédiate. Cela signifie que la présence de CPO a présenté un effet toxique sur les cellules sanguines. Il est probable que la toxicité provienne des lipides peroxydés de CPO ou des produits oxydés de caroténoïdes non identifiés. Les concentrations évaluées dans ce test biologique sont beaucoup plus élevées que celle du test chimique précédent, en conséquence la concentration des substances oxydantes, provenant de la dégradation de l'huile ou des caroténoïdes, est également augmentée. En outre, l'effet négatif de CPO peut provenir de sa forte activité antioxydante qui a été prouvée dans le test TEAC. Dans ce cas, les antioxydants à forte puissance pourraient également devenir prooxydants à haute concentration, d'après l'étude sur le lycopène dans la partie 3.3.3.

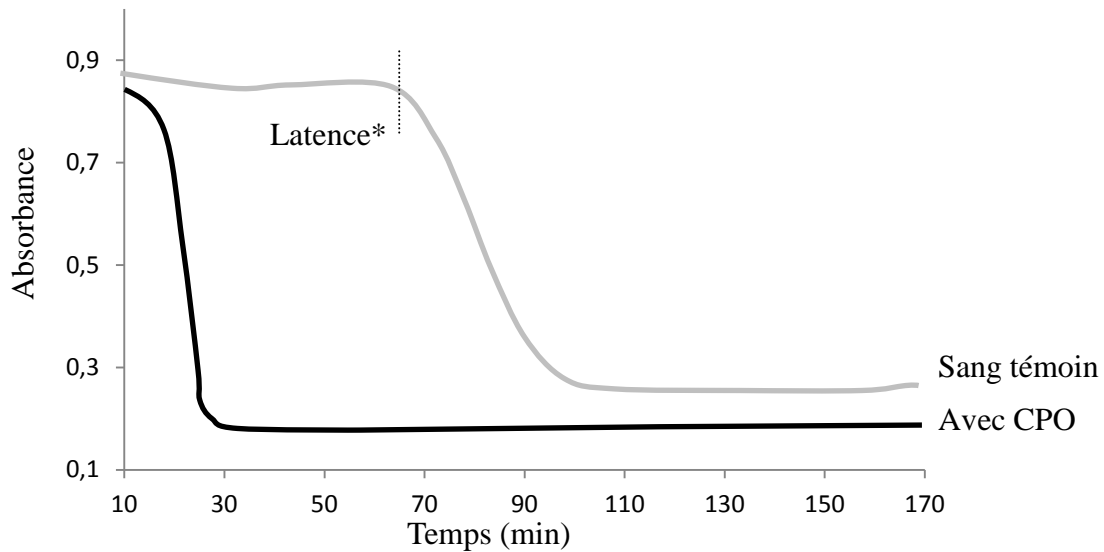


Figure 32 : Illustration de la cinétique d'hémolyse par la mesure d'absorbance du sang avec CPO (en noir) en comparaison avec le sang témoin (en gris) (*temps de latence : temps avant le début de l'hémolyse)

3.4.4 Conclusion

L'objectif de cette dernière partie était de comparer la qualité, la stabilité et la bioactivité du β -carotène pur, extrait de l'arille de gac avec les autres sources naturelles et de synthèse. Les résultats permettent d'établir que notre β -carotène (BCG) présente les propriétés similaires au β -carotène commercial de synthèse (BCS). On peut en tirer la conclusion que le BCG est pur et de qualité all-*trans*-isomère. En outre, l'origine du β -carotène, concernant sa source naturelle ou de synthèse, son procédé d'extraction et sa pureté, peut déterminer sa stabilité et bioactivité.

Pendant le traitement thermique, la 15-*cis*-isomérisation a été le changement principal chez les β -carotènes. Par ailleurs, une dégradation significative a été observée chez le β -carotène extrait conventionnellement (BCC), ce fait est le signe de l'apparition de produits oxydants qui pourraient provoquer l'activité prooxydante de cette dernière source sur l'hémolyse du sang. De la même façon, le β -carotène de l'huile de palme ne présente aucune activité de protection des cellules sanguines contre les radicaux libres. La concentration du β -carotène est un facteur important pour qu'il montre ses propriétés antioxydantes. A plus de 4 μM , la capacité antioxydante du β -carotène peut être perturbée.

DISCUSSION GENERALE

Dans cette étude, le lycopène et le β -carotène de l'arille de gac, extraits et fractionnés par notre nouveau procédé, ont été étudiés vis-à-vis de leur stabilité, leur capacité antioxydante et leur bioactivité. Ces analyses permettent de comprendre les propriétés chimiques et biologiques de chaque caroténoïde concerné. Les résultats obtenus sont intéressants pour une discussion sur les implications technologiques et nutritionnelles de l'extraction et des procédés utilisés.

Les stéréo-mutations du lycopène et du β -carotène ont été observées lors du traitement thermique dans l'hexane. Le choix des températures appliquées dépend de la stabilité de chaque caroténoïde. L'isomérisation du β -carotène n'est pas observée à 50°C, le β -carotène est en effet plus stable que le lycopène. A ces températures, les caroténoïdes extraits de gac ne sont pas encore dégradés.

Lors de l'isomérisation, les caroténoïdes symétriques (comme le lycopène et le β -carotène) donnent des 15-, 13- et 9-mono-*cis*-isomères dont l'ordre d'apparition dépend de la stabilité des doubles liaisons carbonées. L'effet thermique commence normalement à attaquer les doubles liaisons impliquant les plus petits obstacles stériques, par exemple les doubles liaisons entre les carbonés primaires portant des atomes d'hydrogène (Weedon 1971). La figure 33 montre qu'au niveau du carbone C15 des caroténoïdes étudiés, la double liaison possède quatre hydrogènes adjacents qui font moins obstacle à l'isomérisation que la présence d'un groupe méthyle. C'est pourquoi le 15-*cis*-isomère est le premier isomère identifié pendant la stéréo-mutation thermique du lycopène et du β -carotène. Pourtant, le 15-*cis*-caroténoïde atteint rapidement une proportion stable dans le mélange pendant le traitement. Cette valeur à l'équilibre des isomères du mélange dépend de la sensibilité des caroténoïdes à la température et de la durée du traitement. Pour le lycopène, le pourcentage du 15-*cis*-isomère ne dépasse pas 1 % à 50°C et 2 % à 80°C tandis que celui du β -carotène 15-*cis* se stabilise à 24 % du mélange après 60 min de chauffage à 80°C. Après l'équilibre du premier isomère (15-*cis*), le site d'isomérisation s'éloigne excentriquement vers les doubles liaisons (13- et 9-*cis*) entourées par un plus grand nombre d'obstacles stériques que celle du carbone C-15. Ce phénomène a bien été observé pendant l'isomérisation du lycopène dans cette étude. Le lycopène 13-*cis* qui apparaît à partir du traitement à 50°C atteint progressivement son pourcentage stable dans le mélange après 240 min. Ce processus se déroule plus rapidement à 80°C et cet isomère représente 22 % du mélange, pourcentage d'équilibre, après 60 min. Après la stabilisation

de la quantité de 13-*cis*-isomère dans le mélange, la chaleur fait ensuite apparaître le 9-*cis*-isomère. Pendant les traitements thermiques appliqués dans le cadre de notre étude, les caroténoïdes all-*trans* restent toujours les stéréo-isomères prédominants du mélange. L'isomérisation du β -carotène s'arrête à l'apparition du 15-*cis*-isomère tandis que le chauffage provoque progressivement une 15-, 13- et 9-*cis*-isomérisation du lycopène.

Cependant, la plupart des *cis*-isomères des caroténoïdes présentent une labilité thermique. La stabilité thermique des *cis*-isomères dépend de leur conformation stérique qui peut être caractérisées par la barrière de rotation des groupes intervenant dans la double liaison (Guo et al., 2008). En se basant sur celle-ci, l'interaction entre les groupes -CH₃ et -H rend les 7- et 11-*cis*-isomères plus facilement déstabilisés que les autres isomères (Chasse et al., 2001). D'après cette dernière étude, leur énergie relative calculée est en effet la plus élevée des isomères du lycopène. Sur le squelette de carbone du lycopène all-*trans*, acyclique et symétrique, les 7- et 11-*cis*-isomères devraient être les premiers produits de l'isomérisation, toutefois ils n'ont pas été identifiés dans notre étude.

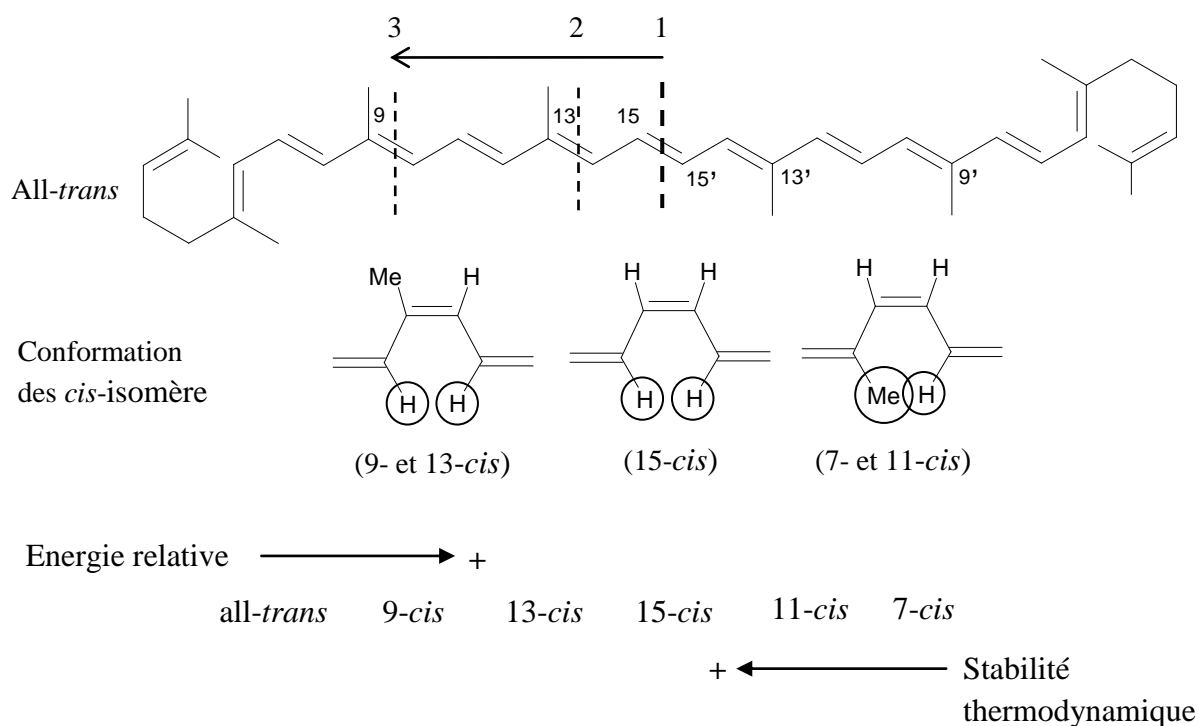
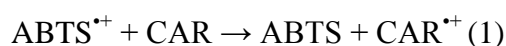


Figure 33 : Description du chemin de l'isomérisation des caroténoïdes symétriques en relation avec la conformation et la stabilité thermodynamique de leurs stéréo-isomères (adapté de Chasse et al. (2001))

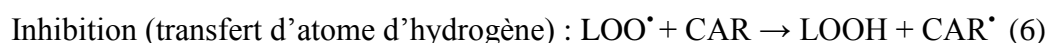
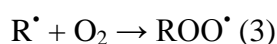
Par ailleurs, la structure chimique des caroténoïdes présente une relation avec leurs propriétés antioxydantes. La comparaison entre le lycopène et le β -carotène montre qu'ils possèdent tous les deux 11 doubles liaisons conjuguées mais se différencient par leurs deux

extrémités. Le β -carotène, de structure bi-cyclique, est moins antioxydant que le lycopène à cause des obstacles stériques situés aux deux bouts de sa chaîne. L'interaction de coplanéité entre le groupe méthyle au niveau du carbone C-5 du cycle et l'atome d'hydrogène se trouvant à C-8 de la chaîne du β -carotène fait tourner les deux cycles à l'extrémité, y compris les doubles liaisons C-5,6 et C-5',6', de sorte qu'ils se retrouvent hors du plan de la chaîne. C'est pourquoi la contribution des doubles liaisons cycliques à la capacité antioxydante du β -carotène devient moins efficace (Miller et al., 1996). La différence de l'activité antioxydante de deux caroténoïdes extraits de l'arille de gac a aussi été démontrée dans notre étude par deux tests, chimique et biologique. Les résultats montrent que le lycopène possède une capacité antioxydante 1,4 fois (test TEAC) et 3 fois (test KRL) plus forte que celle du β -carotène.

Dans le test TEAC, la réaction antioxydante est simplement un transfert d'électron des caroténoïdes vers les radicaux cationiques $ABTS^{++}$ dans le méthanol pour neutraliser ces radicaux libres en ABTS (1).



Cependant, en présence du composé d'azote AAPH dans les cellules sanguines, l'effet antioxydant des caroténoïdes est la neutralisation des substances radicalaires dû à l'attaque des radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}), produits de la décomposition thermique d'AAPH, sur le substrat biologique. Comme l'AAPH est un initiateur aqueux des radicaux, la collision des antioxydants hydrophobes, comme les caroténoïdes, avec cette source est faible. C'est pourquoi dans le plasma, l'inhibition de l'effet des radicaux libres des caroténoïdes ne peut se passer que dans les lieux hydrophobes du système biologique, en suivant les étapes suivantes (R_2N_2 : composé d'azote, AAPH ; LH : substrat biologique, ex : lipide insaturé ; CAR : caroténoïde) (Huang et al., 2005).



Dans des conditions réactionnelles différentes, les caroténoïdes réagissent différemment. Il est probable qu'ils soient plus actifs dans l'inhibition des radicaux peroxydes, par le transfert d'atome d'hydrogène, que dans la neutralisation des radicaux

cationiques ABTS^{•+}. La différence d'activité des caroténoïdes avec les radicaux libres produits dans deux milieux différents est plus clairement démontrée lors de l'isomérisation thermique. Comme les *cis*-isomères des caroténoïdes sont plus courts que les structures *all-trans*, ils deviennent plus solubles et plus actifs que les *all-trans*. Dans le milieu solvant organique, les caroténoïdes sont solubles et sont donc toujours accessibles aux radicaux libres. Ainsi, le changement de la proportion entre *all-trans* et *cis*-isomères ne présente pas une différence significative sur la solubilité et l'activité globale des caroténoïdes. Par contre, l'augmentation des *cis*-isomères dans le milieu biologique, où les *all-trans* isomères se trouvent plutôt en cristaux, améliore nettement le contact des caroténoïdes avec les oxydants. C'est pourquoi après traitement thermique, le mélange des isomères des caroténoïdes devient significativement plus antioxydant pendant la protection des cellules sanguines. Cette différence n'est pas clairement détectée dans le test TEAC sauf lors de l'apparition du lycopène 9-*cis*. Dans ce dernier cas, le 9-*cis*-isomère est significativement plus soluble et plus actif que les autres isomères du lycopène.

Dans le milieu biologique, l'activité antioxydante des caroténoïdes dépend de plusieurs facteurs provenant de la composition du milieu. Le sang est composé de cellules sanguines en suspension dans le plasma. Le rôle des globules rouges, est d'assurer le transport de l'oxygène et du gaz carbonique entre les alvéoles pulmonaires et les tissus, par conséquent ils sont une source d'oxydants complexes provoqués par l'oxygène et par son métabolisme. La bioactivité des caroténoïdes pour la protection des globules rouges contre l'hémolyse dépend de leur accessibilité aux sources différentes d'oxydants cellulaires. Nos résultats montrent que les caroténoïdes extraits de l'arille de gac ont augmenté le temps de vie des cellules sanguines à basse concentration, mais cette bioactivité ne croît pas lors de l'augmentation de leur concentration et peut diminuer au point de devenir prooxydante pour des caroténoïdes naturels provenant d'une autre source. Ces observations restent sans explication précise car l'interaction entre les antioxydants cellulaires, les oxydants et les antioxydants ajoutés n'est pas encore bien caractérisée.

D'une part, les caroténoïdes neutralisent une partie des radicaux des substrats biologiques provoqués par la présence des radicaux oxydant dans le milieu extérieur des cellules. D'autre part, comme les caroténoïdes sont hydrophobes, ils migrent dans la membrane plasmique des cellules par voie passive. Ils se localisent ensuite au milieu des groupes d'acyle de la bicouche de phospholipide ou proche des lipoprotéines (Cao-Hoang et al., 2010). La structure membranaire des cellules sanguines est naturellement protégée par plusieurs antioxydants cellulaires telles que la superoxyde dismutase (SOD), la catalase

(CAT) et la glutathion peroxydase (GPx). Ce système antioxydant protège les cellules contre l'attaque des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) comme l'anion superoxyde ($\cdot\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à l'extérieur et à l'intérieur de la membrane. La présence de caroténoïdes au milieu de la membrane assure l'inhibition de la formation des hydroperoxydes des phosphatidylcholines (PCOOH) et des hydroperoxydes de phosphatidylethanolamine (PEOOH) de la bicouche membranaire (Nakagawa et al., 1996).

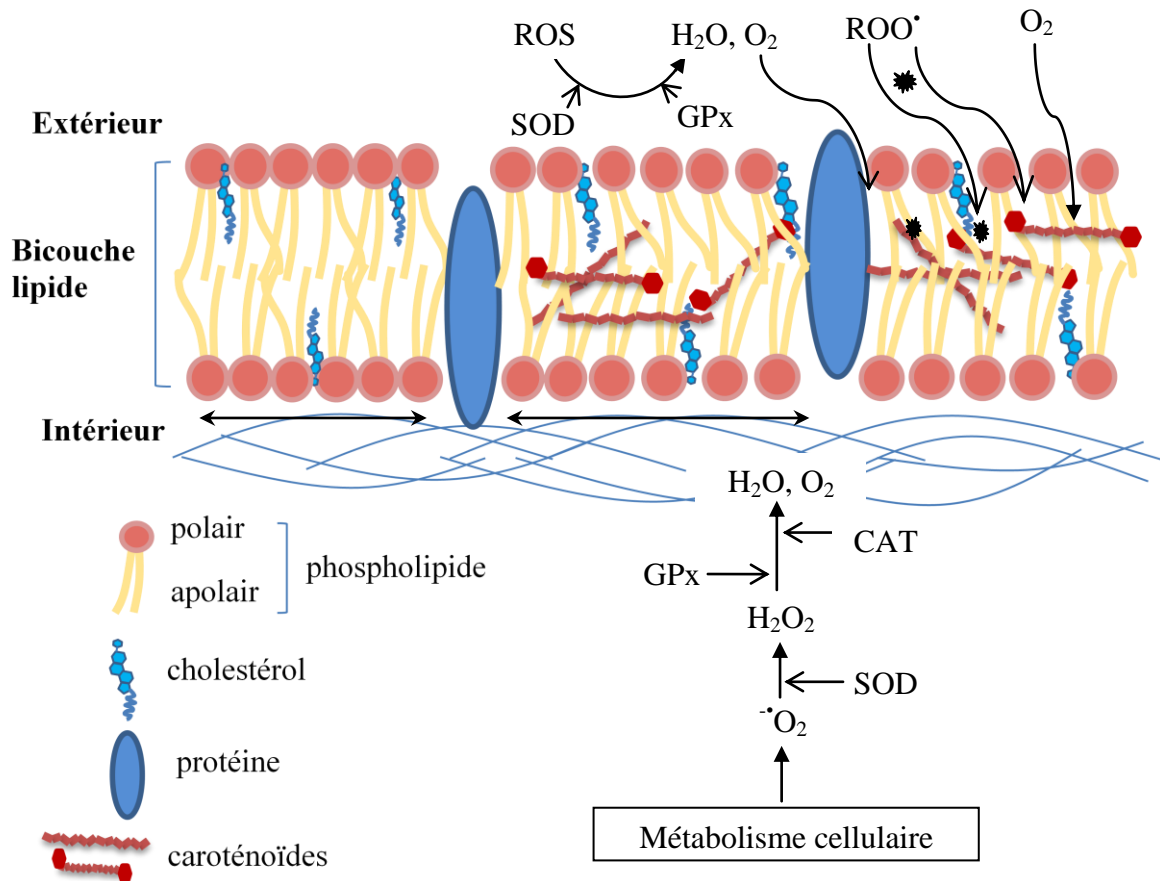


Figure 34 : Localisation des caroténoïdes dans la bicouche de phospholipides et système antioxydant et oxydant au niveau de la membrane polaire et apolaire

Comme illustré figure 34, la membrane cellulaire se compose particulièrement des cholestérols qui contribuent à sa stabilité et au maintien de sa structure en s'intercalant entre les phospholipides. En effet, ils régulent la fluidité membranaire et donc diminuent la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles. Les caroténoïdes se trouvent perpendiculaires aux chaînes hydrophobes des phospholipides et des cholestérols. A forte concentration, les caroténoïdes se rassemblent et cristallisent, par conséquent, ils provoquent une perturbation de la fonction de la membrane. Dans ce cas, la membrane perd sa fluidité naturelle et devient plus perméable aux ROS aqueux (Lowe et al., 1999).

Au niveau de la membrane, malgré une forte concentration, les caroténoïdes agrégés ne peuvent pas réagir rapidement avec tous les radicaux libres en présence. Leur agrégation peut également expliquer le plateau d'activité antioxydante du β -carotène de l'extrait de gac sur les cellules sanguines à haute concentration dans cette étude. C'est pourquoi, les radicaux peroxydes très réactifs exercent leur effet sur la peroxydation des acides gras polyinsaturés en traversant la membrane phospholipidiques (Chen et al., 2009). La formation élevée de peroxydes cytotoxiques produit, en chaîne, les nouveaux radicaux libres qui vont entraîner les phénomènes inflammatoires et la mort cellulaire (Kennedy et al., 1992).

Par ailleurs, l'augmentation de la fluidité membranaire favorise le transport d'oxygène à la membrane (Buchwald et al., 2000). Dans le sang, la pression partielle d'oxygène (pO_2) lors de la saturation dans les globules rouges est d'environ 160 mmHg (Buchwald et al., 2000). L'augmentation de la concentration d'oxygène accélérerait la vitesse de peroxydation des lipides causée par les radicaux peroxydes et provoquerait l'auto-oxydation des caroténoïdes (Kennedy et al., 1992; Józwik et al., 1997). En effet, les caroténoïdes sont antioxydants quand il y a la formation de produits d'oxydation capables de piéger les ROS, alors qu'ils deviennent prooxydants à cause de leurs radicaux peroxydes formés à la haute pO_2 (figure 35).

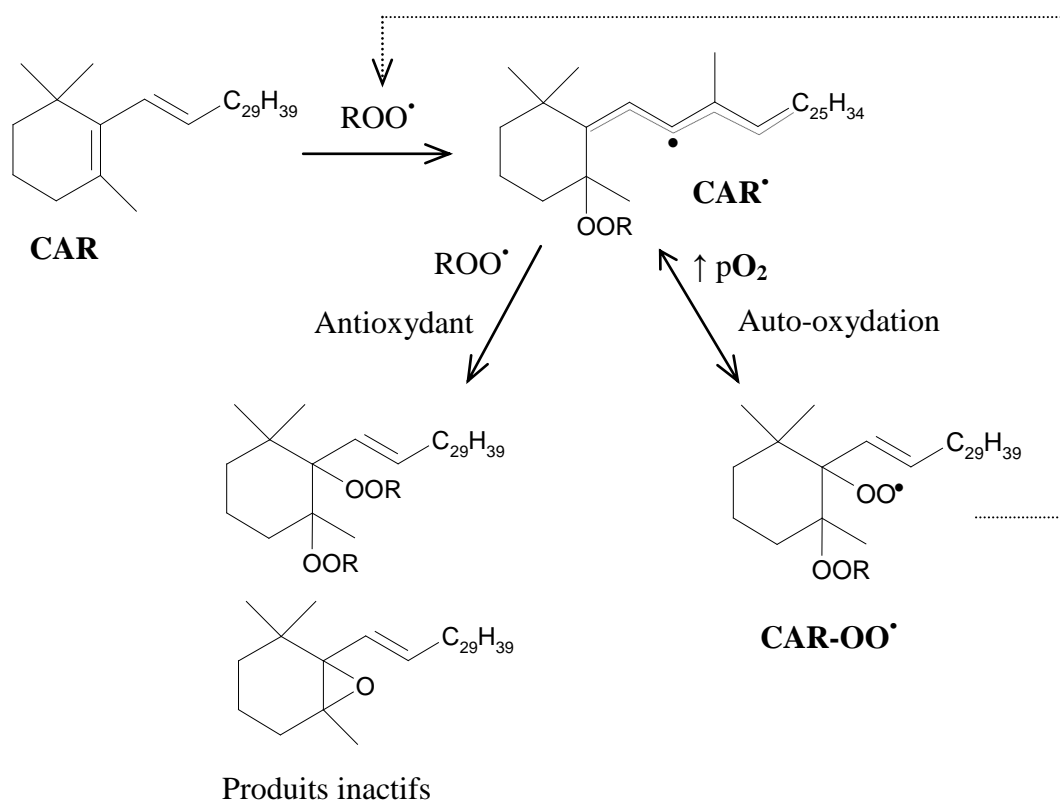


Figure 35 : Localisation des caroténoïdes dans la bicouche de phospholipides et système antioxydant et oxydant au niveau de la membrane polaire et apolaire (Kennedy et al., 1992)

De toutes ces réactions, les radicaux libres se multiplient rapidement dans la membrane plasmique des cellules sanguines. Leur attaque se propageant sur des phospholipides par la peroxydation entraîne une destruction de la structure de la membrane cellulaire. De la même façon, les caroténoïdes extraits de l'arille de gac présentent un effet antioxydant fort à basse concentration mais deviennent prooxydants lors de l'augmentation de concentration. Ces résultats correspondent aux études de Susan et al. (1997). D'ailleurs, plus les caroténoïdes sont sensibles aux radicaux libres, plus ils réagissent rapidement et deviennent prooxydants à forte concentration.

Dans notre étude, la bioactivité de plusieurs sources de caroténoïdes a été étudiée. Le lycopène extrait de l'arille de gac est plus antioxydant que le β -carotène extrait de la même source. Il peut protéger mieux les cellules sanguines résistantes à l'hémolyse que le β -carotène même à une plus basse concentration. Cependant, il devient plus facilement prooxydant lors de l'augmentation de concentration, surtout avec la présence du lycopène 9-*cis* produit par le traitement thermique et qui est l'isomère le plus antioxydant. La comparaison de l'activité antioxydante des β -carotènes provenant de différentes sources montre également que la qualité des caroténoïdes est un facteur important pour leur

bioactivité. Les β -carotènes de pureté différente ne manifestent pas de la même façon la capacité de décoloration de l'ABTS⁺ et l'activité antioxydante sur les globules rouges (figure 36).

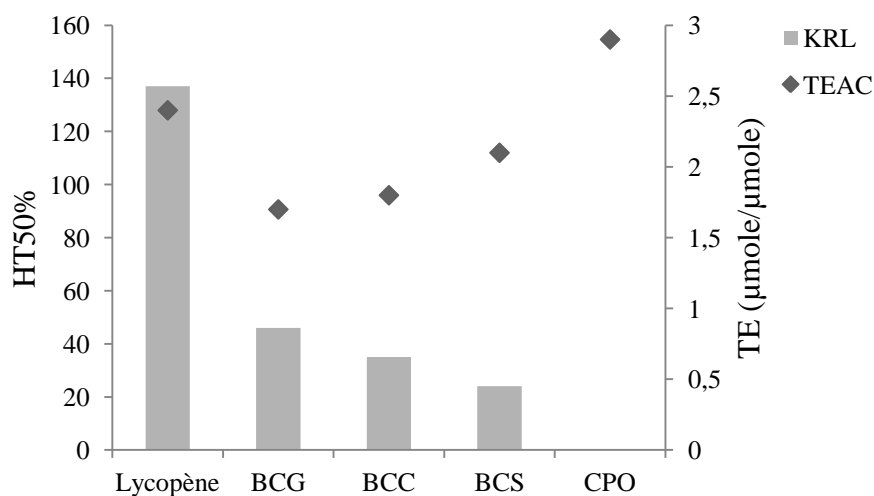


Figure 36 : Comparaison de la capacité antioxydante (losanges) et la bioactivité antioxydante (histogrammes) du lycopène et des β -carotènes de différentes sources, sans traitement thermique. BCG : β -carotène naturel extrait de l'arille de gac, BCC : β -carotène naturel extrait conventionnellement, BCS : β -carotène de synthèse et CPO : β -carotène dans l'huile de palme.

Dans le test chimique, la CPO est la plus antioxydante probablement grâce à la présence d'un autre composé comme l' α -carotène qui est plus antioxydant que le β -carotène. Par contre, elle devient toxique pour les cellules sanguines même à faible concentration. Il apparaît que le procédé d'extraction de la CPO a provoqué l'oxydation des lipides dont les produits comme l'hexanal, le 2,4-décadienal, le propanal sont prooxydants (El-Magoli et al., 1980; Aubourg 2001).

Lors de la comparaison des autres β -carotènes, le synthétique BCS est plus antioxydant que les naturels BCG et BCC par le test TEAC, mais il devient moins bioactif que les naturels à basse concentration (4 μ M) dans le système biologique. Pourtant, ces différences ne sont pas significatives. A la concentration plus élevée, le BCG et le BCS possèdent la même bioactivité tandis que le BCC, dans lequel les caroténoïdes oxydés à longue chaîne ont été détectés, devient prooxydant. Le procédé d'extraction conventionnel qui comprend un fort traitement thermique ou oxydant est défavorable pour la qualité et l'activité antioxydante du β -carotène extrait.

Ainsi, les différences de bioactivité des caroténoïdes dépendent de leur qualité, qui est liée à leur source, à leur procédé d'extraction et à la présence d'autres composés dans le mélange. Ces observations sont intéressantes pour les implications techniques et nutritionnelles concernant l'extraction et l'utilisation des caroténoïdes. Le traitement thermique est souvent appliqué pour déstructurer les tissus végétaux et augmenter le rendement d'extraction des composés naturels. Pourtant, il donne également un double effet sur la bioactivité des composés sensibles comme les caroténoïdes : (i) La *trans-cis*-isomérisation permet une augmentation de la solubilité, de l'absorption et de la bioactivité des caroténoïdes ; (ii) Leur dégradation en produits oxydés à courte ou à longue chaîne fait perdre leur propriété antioxydante, voire les rend prooxydants. Le contrôle de ce traitement permet d'éviter la deuxième face nuisible sur les caroténoïdes.

Au niveau de la formulation et de l'utilisation des caroténoïdes *all-trans*, un léger traitement thermique qui provoque une isomérisation peut faciliter leur dispersion dans le milieu aqueux et aussi leur absorption pendant l'alimentation. En effet, les *cis*-isomères de caroténoïdes qui se trouvent dans plusieurs produits alimentaires portent une meilleure valeur nutritionnelle parce qu'ils sont plus bioactifs et plus antioxydants que les *all-trans in vitro* et *in vivo* (Boileau et al., 1999; Holloway et al., 2000; Dewanto et al., 2002; Graziani et al., 2003; Schieber et al., 2005). Pour disperser les caroténoïdes, les lipides sont parfois utilisés. Pour la préparation de cette phase, il faut s'assurer que les lipides ne sont pas peroxydés avant la formulation avec les caroténoïdes. Une mauvaise qualité des lipides dans le produit peut empêcher l'activité antioxydante des caroténoïdes et même les rendre prooxydants.

Pour les caroténoïdes différents, les paramètres du traitement thermique doivent être différents de sorte que l'isomérisation soit contrôlée spécifiquement pour produire les isomères appréciés. Des résultats de notre étude, il est intéressant que ce soit le lycopène sous forme de 9-*cis*-isomère qui ait une meilleure capacité antioxydante et que, pour le β -carotène, ce soit le 15-*cis*-isomère, celui qui favorise son action potentielle de vitamine A.

En nutrition, la concentration des caroténoïdes dans le plasma sanguin est aussi importante pour leur activité fonctionnelle. D'une part, après l'alimentation, ils doivent être suffisamment absorbés dans le sang pour pouvoir manifester leurs propriétés nutritionnelles. D'autre part, la consommation régulière des caroténoïdes doit être faite avec une quantité convenable pour que leur concentration sanguine absorbée soit inoffensive pour les cellules sanguines. L'effet prooxydant de la concentration est plus

important dans le cas du lycopène que dans celui du β -carotène, dont l'activité antioxydante a tendance à rester stable lors de l'augmentation de concentration.

En conclusion, les résultats obtenus dans cette étude, qui ont été discutés théoriquement sur la stéréo-isomérisation thermique des caroténoïdes et son lien avec leurs propriétés antioxydantes, permettent de reconstituer les mécanismes de leur effet antioxydant et prooxydant sur la résistance des globules rouges sanguins contre l'hémolyse. La qualité des caroténoïdes qui est dépendante de leur source et de leur procédé d'extraction a une forte relation avec leur activité fonctionnelle en fonction de la concentration. Il est proposé de contrôler ces paramètres importants pour les caroténoïdes naturels avant de les utiliser dans les aliments fonctionnels.

CONCLUSION GENERALE

Le lycopène et le β -carotène sont des composés intéressants pour les aliments fonctionnels parce qu'ils sont des antioxydants puissants et une source de provitamine A. L'arille de *Momordica cochinchinensis* (gac) utilisé dans le cadre de cette thèse est de la variété gluante, très riche en lycopène et β -carotène mais très pâteux et huileux. L'étude préliminaire sur l'extraction et la stabilisation de ces caroténoïdes à l'origine de ce travail de thèse a montré que dans le mélange de l'extrait, le lycopène était plus instable que le β -carotène. Pour mieux comprendre leur stabilité et l'action antioxydante par des études approfondies, le lycopène et le β -carotène ont été séparés des tissus et de l'huile de gac par un procédé d'extraction et de fractionnement.

D'abord, la technique d'extraction développée a permis d'extraire jusqu'à l'épuisement les caroténoïdes de l'arille de gac. La clé de ce procédé est l'utilisation du sable fin comme assistant à l'agitation de la purée d'arille de gac. Le volume de solvant consommé a été réduit grâce à un recyclage lors de l'élimination de l'extrait et le récupérant par évaporation-condensation, en effet 95 % du volume d'hexane utilisé pendant tout le procédé a été récupéré pour la réutilisation.

L'étape de fractionnement, du lycopène *all-trans* et du β -carotène *all-trans* de l'huile, est tout à fait innovante. Elle est une méthode douce, simple et propre pour la séparation de ces caroténoïdes à haute pureté et qualité. Les analyses des spectres par spectrométrie UV-visible et DAD-HPLC ont montré que les caroténoïdes obtenus sont au moins de 95 % d'isomère *all-trans*. De 100 g d'arille frais, nous avons fractionné 145 mg de lycopène *all-trans*, 20 mg de β -carotène *all-trans* et 14 mg d'huile de gac riche en caroténoïdes. La présence des *cis*-isomères dans l'extrait a été négligeable.

En bref, le point fort de notre procédé d'extraction et de fractionnement du lycopène et du β -carotène de l'arille de gac est d'utiliser un moyen d'assistance doux mais efficace pour obtenir le lycopène et le β -carotène naturels propres et de bonne qualité.

L'étude approfondie, sur la stabilité et l'activité antioxydante des caroténoïdes obtenus, a permis d'apporter de nouvelles données sur leur isomérisation thermique. De plus, elle permet de mieux comprendre des facteurs agissant sur les propriétés antioxydantes ou prooxydantes et sur la protection des cellules sanguines contre l'hémolyse.

Le lycopène est plus rapidement isomérisé pendant le traitement thermique que le β -carotène. Les 15- et 13-*cis*-isomères du lycopène ont été détectés dès le traitement à 50°C

et le 9-*cis*-isomère à 80°C, alors que dans le cas du β -carotène, seule la 15-*cis*-isomérisation a été observée après 240 minutes du traitement à 80°C. L'isomérisation de ces caroténoïdes symétriques commence toujours par la double liaison au centre de la chaîne carbonée puis, dans des conditions de traitement plus drastique, le site s'éloigne vers les côtés de la molécule. L'ordre d'apparition des *cis*-isomères a donc été montré : 15-*cis* \rightarrow 13-*cis* \rightarrow 9-*cis*. Après le traitement, les caroténoïdes all-*trans* restent toujours les isomères prédominants du mélange et la répartition à l'équilibre des autres isomères dépend de la stabilité du caroténoïde en fonction de la température et de la durée du traitement. Contrairement à ce qu'on observe dans les huiles sur le marché, l'arille de gac peut être considéré comme une source naturelle de lycopène et de β -carotène relativement stables car aucune dégradation de ces caroténoïdes n'a été observée pendant le traitement thermique.

Les résultats de cette étude ont également montré que l'isomérisation avait augmenté la propriété antioxydante et la bioactivité des caroténoïdes grâce à la meilleure solubilité de leurs *cis*-isomères par rapport à leur équivalent all-*trans*. Dans le test TEAC, la 9-*cis*-isomérisation du lycopène a provoqué une augmentation de la capacité antioxydante du mélange de lycopène, de 2,4 à 3,7 μmol de Trolox équivalent. L'évolution des ratios, de *cis* (% A_{α}/A_{II}) et de structure fine (% III/II), calculés en se basant sur le spectre UV-visible global du lycopène est représentative des évolutions de ses *cis*-isomérisations. Cette analyse peut ainsi constituer une méthode simple pour évaluer qualitativement l'isomérisation et sa relation avec la capacité antioxydante des caroténoïdes.

Le lycopène et le β -carotène de l'arille de gac ont été beaucoup plus actifs que le Trolox, un analogue hydrosoluble de vitamine E, sur la résistance des cellules sanguines contre l'hémolyse. Leur activité a pu être jusqu'à 134 fois plus importante pour le lycopène et 70 fois pour le β -carotène que celle du Trolox.

Nos observations sur les cellules sanguines ont également montré que les caroténoïdes extraits peuvent présenter un effet antioxydant ou prooxydant, en relation avec la concentration utilisée. En comparant avec d'autres sources de β -carotène, il a été montré que la différence de bioactivité des caroténoïdes dépend de leur qualité et de leur origine, ce qui concerne leur source et leur procédé d'extraction. Un léger traitement thermique pendant le procédé de formulation peut augmenter leur capacité antioxydante, alors que les traitements plus longs peuvent les dégrader et les rendre prooxydants à forte concentration. Les résultats de cette étude suggèrent que les caroténoïdes ne devraient pas

subir des chauffages à très haute température ou pendant des temps longs et qu'ils devraient être à des concentrations inférieures ou égales à 4 μM dans le plasma pour assurer une bonne efficacité antioxydante.

Pour expliquer l'activité antioxydante ou prooxydante des caroténoïdes sur la résistance des cellules sanguines contre l'hémolyse, certains facteurs ont été discutés :

- l'accessibilité des caroténoïdes aux sources différentes des oxydants cellulaires
- la concentration des caroténoïdes testés
- la localisation des caroténoïdes dans la membrane plasmique des cellules sanguines
- l'auto-oxydation des caroténoïdes et la présence de leurs produits oxydés à longue chaîne

D'un point de vue applicatif, le traitement thermique appliqué dans ce travail est intéressant pour contrôler les produits riches en caroténoïdes fonctionnels. En effet, un chauffage à 80°C est suffisant pour avoir le lycopène 9-*cis* qui est l'isomère le plus antioxydant et pour obtenir un mélange de β -carotène 15-*cis*, ce qui le meilleur isomère pour la génération de vitamine A.

PERSPECTIVES

6.1 PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Les travaux de cette thèse suscitent des questions sur certains points pour l'utilisation de notre procédé dans l'industrie agroalimentaire :

- L'extraction et le fractionnement du lycopène et du β -carotène du gac pourraient-ils être fait avec un autre solvant plus écologique que l'hexane ? D'après la recherche bibliographique, le seul agro-solvant « vert » pouvant être utilisé en substitution à l'hexane pour ces composés est un terpène, le d-limonène. Pourtant, la production de ce solvant est encore limitée et son prix reste encore très élevé. Un autre inconvénient des terpènes est qu'ils sont difficiles à évaporer à basse température, sous pression réduite car leur température d'ébullition est relativement élevée.

- Le procédé sera-t-il répétable à l'échelle pilote ? La disponibilité d'équipements industriels et de quantité de matières premières sont indispensables pour cette étude. Les paramètres pour une production à grande échelle devront être mis au point à nouveaux. Nous sommes en train de chercher une plateforme d'extraction adéquate pour ces essais.

- Comment faire pour utiliser ces substances extraites en industrie agroalimentaire et cosmétique ? Le lycopène et le β -carotène extraits et fractionnés doivent être stables non seulement à l'état purifié mais aussi quand ils seront dans les matrices des produits sur le marché. Ils pourraient être formulés avec une forte concentration d' α -tocophérol (vitamine E) ou d'acide ascorbique (vitamine C) dans les phases huileuses ou aqueuses sous les conditions alimentaires et cosmétiques. La protection antioxydante par ces vitamines a été prouvée (Zhang et al., 2001) et j'ai pu moi-même le vérifier lors d'essais de formulation (résultats non montrés), donc leur présence pourrait permettre de conserver ces caroténoïdes pendant le stockage.

Par ailleurs, la protection du β -carotène par le lycopène dans le mélange (Cao-Hoang et al., 2011) sera étudiée plus avant pour une application de stabilisation du β -carotène. Cela permettrait d'avoir un produit de provitamine A et un colorant alimentaire naturels et stables.

Parallèlement, ils pourraient être encapsulés dans des particules pouvant permettre la vectorisation, par exemple dans des cellules microbiennes. La figure 37 montre que ces derniers matériaux qui se nourrissent par les substances grasses et peuvent induire les corps lipidiques dans leur cytoplasme sont capable de faire entrer les molécules lipophiles à l'intérieur.

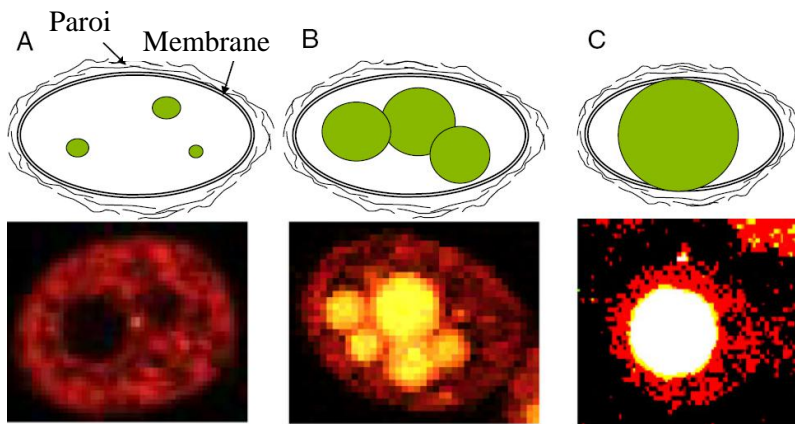


Figure 37 : Induction des corps lipidiques dans les levures. Les cellules schématisées au dessus sans (A), avec (B) corps lipidiques (50 % lipides en masse) et après l'encapsulation (C) par la levure *Y. lipolytica* sont présentés en dessous colorée au Rouge Nil par les micrographies (Pham-Hoang et al., 2013).

D'un point de vue nutritionnel et applicatif sur les résultats de cette thèse, certaines études sont proposées :

- Pour utiliser les caroténoïdes extraits et fractionnés de l'arille de gac comme composé santé, leur propriété fonctionnelle devrait être testée *in vivo*. L'absorption de ces molécules dans le corps humain ou animal devrait être contrôlée et optimisée car elles doivent être à une concentration suffisante dans le sang pour manifester leur activité antioxydante. L'utilisation des caroténoïdes encapsulés avec libération contrôlable pourrait être une solution pour réduire leur perte à cause de la dégradation dans le système digestif avant d'être absorbé au niveau de l'intestin (figure 38).

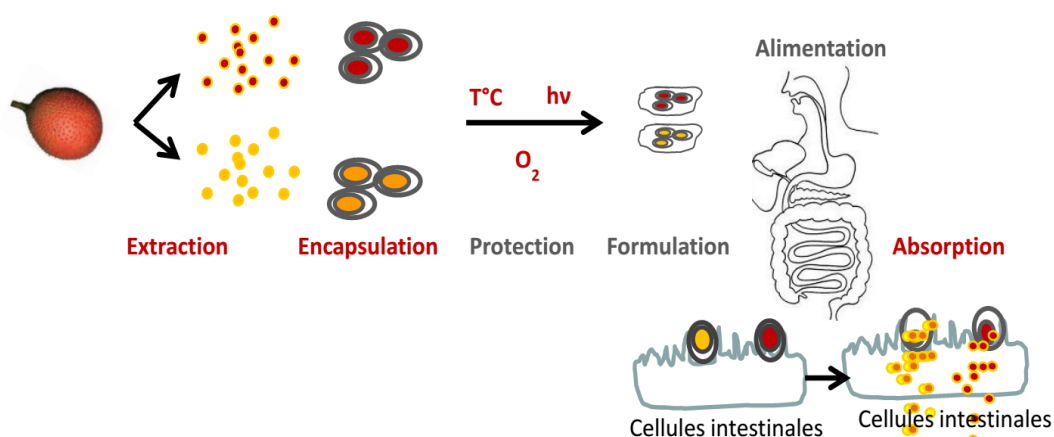


Figure 38 : Utilisation du lycopène et du β -carotène extraits de l'arille de gac comme composé santé

- L'étude complémentaire sur la dégradation du lycopène et du β -carotène pourrait permettre la production de certains arômes naturels. Les produits volatiles produits par la dégradation enzymatique et thermique de ces caroténoïdes ont été identifiés dans notre travail et certaines autres études (tableau 20). Ils sont les substances aromatiques intéressantes qui se trouvent dans les fruits mûrs, les fleurs et certaines épices. Les traitements différents des caroténoïdes pourraient produire des arômes différents. Les facteurs sur lesquels nous pourrions jouer pour la production de fractions riches en arômes appréciés sont la durée du traitement, la température, la présence d'oxygène et le milieu d'oxydation (aqueux ou huileux).

Tableau 20 : Substances aromatiques principales identifiées pendant la dégradation enzymatique et thermique du β -carotène et du lycopène (Crouzet et al., 2002; Waché et al., 2003; Cao-Hoang et al., 2011)

Type	Substances	Description d'odeur	Dégradation du β -carotène	Dégradation du lycopène
<i>Aldéhyde</i>	Géranial	rose, citron, citronnelle	x	
	Géranyl acétone	rose magnolia		x
	Néral	rose, citron, citronnelle	x	x
<i>Cétone</i>	β -Cyclocitral	tabac	x	
	β -Ionone	cèdre, framboise	x	
	5,6-Epoxy- β -ionone	fruit sucré, fleur	x	
	Dihydroactinidiolide	thé	x	x
	Pseudoionone	palsamique	x	
	4-Oxo- β -ionone	fruit sucré	x	
	Méthyle heptenone	citron, citronnelle		x
	Acétonylacétone	sucré		x
	Allyl acétone	fleur, sucré		x
	Méthyle heptadienone	bois, cannelle		x

- La formulation des molécules pures extraites de gac en mélange avec plusieurs oligo-éléments pourrait être étudiée. La combinaison de plusieurs caroténoïdes ou avec d'autres composés actifs serait intéressant pour l'efficacité de ces molécules comme

compléments santé *in vivo* (Kiokias et al., 2003) et pour voir si un effet synergique se dégage de l'utilisation de plusieurs nutriments.

6.2 VALORISATION DES RESULTATS

Les résultats présentés dans cette thèse sur l'extraction fractionnée de caroténoïdes de l'arille de gac présentent une opportunité économique car actuellement, (i) aucune entreprise ne produit des caroténoïdes séparés du gac et (ii) les caroténoïdes que nous produisons sont de très bonne qualité et possèdent une bonne bioactivité. Après tous les contacts que nous avons eus avec des entreprises travaillant sur ce fruit, nous avons voulu, avec Yves Waché, valoriser industriellement ces résultats et nous avons travaillé sur un projet de création d'une start-up dans ce but. L'objectif de cette entreprise est de produire des composés bioactifs et des ingrédients alimentaires en contrôlant leur activité jusqu'au produit fini. Cela signifie que nous nous intéressons également à la formulation et à l'encapsulation de ces composés à partir de différents procédés dont un original d'encapsulation dans des cellules de levures sur lequel j'avais travaillé avant ma thèse.

Ce projet appelé Natencaps, est incubé à l'incubateur Prémice de Bourgogne et nous avons obtenu en 2013 le prix en catégorie Emergence du concours de création d'entreprise innovante du Ministère de la recherche et de la BPI/Oséo ainsi que le prix régional 2012 CréAcc de l'ordre des experts comptables.

Notre projet est renforcé par une étude de marché, financée par le prix Emergence, que nous réalisons à la fois en Europe et au Vietnam car nous souhaitons aussi nous positionner sur le secteur émergent des produits naturels de qualité en Asie du Sud Est. Grâce à cette étude, nous cherchons aussi à créer un réseau de partenaires et de clients potentiels en France et au Vietnam. Le marché visé est celui des ingrédients alimentaires et cosmétiques naturels, sous forme d'extraits concentrés ou de molécules formulées. Une autre activité de cette future société comprend notamment un service aux entreprises consistant à proposer des procédés ou des matériaux d'encapsulation ou de stabilisation de substances végétales bioactives. Le but est également de fournir les molécules actives naturelles préservant leurs qualités fonctionnelles et nutritionnelles pour les aliments et les produits cosmétiques.

Si Natencaps sera d'abord créée en France en proposant surtout de l'encapsulation à façon, nous essayons de commencer immédiatement après la production de caroténoïdes puis de polyphénols à partir de plantes tropicales au Vietnam. C'est pour cela qu'en parallèle avec la fin de ma thèse, j'ai encadré des stagiaires pour mettre au point des

procédés d'extraction de plusieurs pigments à partir de différentes plantes tropicales. Et avec le reste de l'équipe, nous travaillons à stabiliser ces composés bioactifs ou colorants naturels jusque dans des produits alimentaires. Personnellement, je travaille également à l'industrialisation du procédé développé dans ma thèse sur lequel le brevet Extragac sera déposé et protégé en France, en Asie et en Australie. Ce brevet interviendra sur la production des caroténoïdes au Vietnam, prévue en 2017 (figure 39). De plus, je suis à la recherche de partenaires pour pouvoir créer un atelier au Vietnam avec accès aux matières premières, valorisation des sous-produits et distribution des produits finaux.

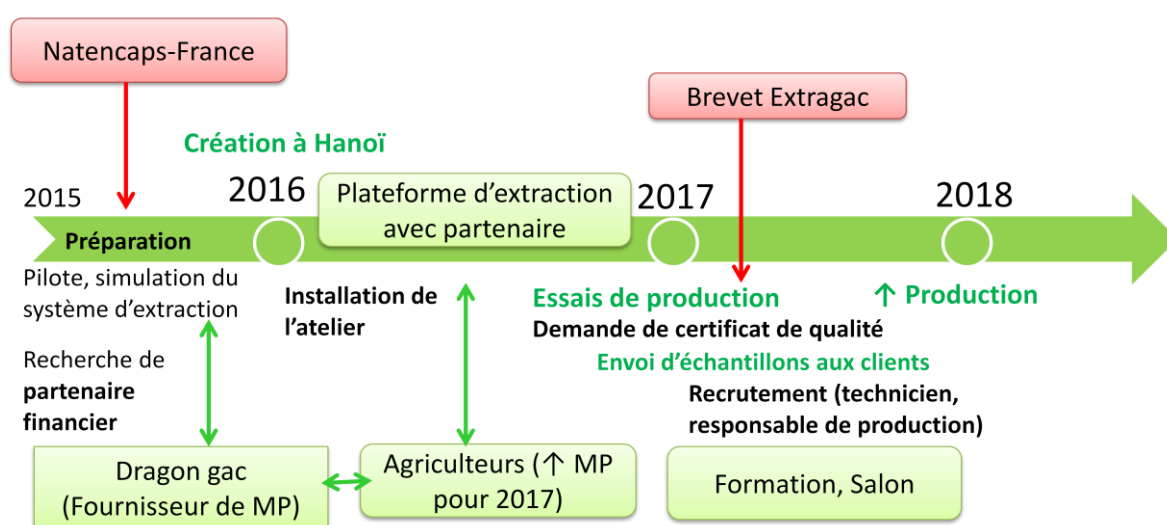


Figure 39 : Valorisation du procédé d'extraction fractionné du lycopène et du β -carotène de l'arille de gac (brevet Extragac) pour le projet start-up Natencaps

Notre équipe est actuellement composée par deux docteurs-ingénieurs, une ingénieur-doctorante et une ingénieur-doctorante double compétences (JCE et master MEA). Le programme de travail fait intervenir des partenariats avec les entreprises privées, les laboratoires publics et les centres de transfert.

Natencaps travaille en étroite collaboration avec le pôle de compétitivité régional Vitagora, avec la filiale de transfert de l'Université de Bourgogne et avec des start-up régionales et des entreprises Vietnamiennes. Nous travaillons également sur les tendances concernant les molécules actives et à ce titre, nous intervenons dans l'organisation de la conférence de consensus sur le thème des molécules actives qui aura lieu à Dijon en 2015.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Hamid, M. et Moustafa, N.** (2014). Amelioration of alloxan-induced diabetic keratopathy by beta-carotene. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **66**, 1, 49-59.
- Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A. et Avallone, S.** (2010). Kinetic study of β -Carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **112**, 349-361.
- Agostoni, C., Bresson, J.-L., Fairweather-Tait, S., Albert Flynn, I. G., Korhonen, H., Lagiou, P., Løvik, M., Marchelli, R., Martin, A., Moseley, B., et al.** (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to beta-carotene and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 19, 197, 1262, 1460), protection of the skin from UV-induced (including photo-oxidative) damage (ID 178, 197, 1263, 1461, 1968, 2320) and maintenance of the normal function of the immune system (ID 200, 1462) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *The EFSA Journal*, **9**, 4, 2021.
- Aguilar, F., Autrup, H., Barlow, S., Castle, L., Crebelli, R., Wolfgang, Dekant, Engel, K.-H., Gontard, N., Gott, D., et al.** (2008). Use of lycopene as a food colour. *The EFSA Journal*, **674**, 1-66.
- Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D. M., Gundert-Remy, U., König, J., Lambré, C., Leblanc, J.-C., et al.** (2012). Scientific Opinion on the re-evaluation of mixed carotenes (E 160a (i)) and beta-carotene (E 160a (ii)) as a food additive. *The EFSA Journal*, **10**, 3, 2593.
- Alija, A. J., Bresgen, N., Sommerburg, O., Siems, W. et Eckl, P. M.** (2004). Cytotoxic and genotoxic effects of β -carotene breakdown products on primary rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, **25**, 5, 827-831.
- Almeida, I. V., Düsman, E., Heck, M. C., Pamphile, J. A., Lopes, N. B., Tonin, L. T. D. et Vicentini, V. E. P.** (2013). Cytotoxic and mutagenic effects of iodine-131 and radioprotection of acerola (*Malpighia glabra* L.) and beta-carotene in vitro. *Genetics and Molecular Research*, **12**, 4, 6402-6413.
- Ambroise, M.** (2001). Apports nutritionnels conseillés pour la population française. Londres-Paris-New York, afssa CNERNA-CNRS 650.
- Amengual, J., Lobo, G. P., Golczak, M., Li, H. N. M., Klimova, T., Hoppel, C. L., Wyss, A., Palczewski, K. et von Lintig, J.** (2011). A mitochondrial enzyme degrades carotenoids and protects against oxidative stress. *The FASEB Journal*, **25**, 3, 948-959.
- Aoki, H., Kieu, N. T. M., Kuze, N., Tomisaka, K. et Chuyen., N. V.** (2002). Carotenoid Pigments in GAC Fruit (*Momordica cochinchinensis* SPRENG). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **66** 2479-2482.

- Aoki, K., Ito, Y., Sasaki, R., Ohtani, M., Hamajima, N. et Asano, A.** (1987). Smoking, alcohol drinking and serum carotenoids levels. *Japanese journal of cancer research*, **78**, 10, 1049-1056.
- Arora, A., Willhite, C. A. et Liebler, D. C.** (2001). Interactions of β -carotene and cigarette smoke in human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis*, **22**, 8, 1173-1178.
- Astorg, P., Gradelet, S., Bergès, R. et Suschetet, M.** (1997). Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. *Nutrition and Cancer*, **29**, 1, 60-68.
- Astray, G., Gonzalez-Barreiro, C., Mejuto, J. C., Rial-Otero, R. et Simal-Gandara, J.** (2009). A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, **23**, 1631-1640.
- Aubourg, S. P.** (2001). Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids in marine lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 4, 385-390.
- Ausich, R. L. et Sanders, D. J.** (1999). Process for the isolation and purification of lycopene crystals, Patent US 5858700 A.
- Ax, K., Mayer-Miebach, E., Link, B., Schuchmann, H. et Schubert, H.** (2003). Stability of Lycopene in Oil-in-Water Emulsions. *Engineering in Life Sciences*, **3**, 4, 199-201.
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N. et Omar, A. K. M.** (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, **117**, 4, 426-436.
- Baharin, B. S., Abdul Rahman, K., Abdul Karim, M. I., Oyaizu, T., Tanaka, K., Tanaka, Y. et Takagi, S.** (1998). Separation of palm carotene from crude palm oil by adsorption chromatography with a synthetic polymer adsorbent. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **75**, 3, 399-404.
- Baharin, B. S., Latip, R. A., Man, Y. B. C. et Rahman, R. A.** (2001). The Effect of Carotene Extraction System on Crude Palm Oil Quality, Carotene Composition, and Carotene Satability During Storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**, 8.
- Baker, D. L., Krol, E. S., Jacobsen, N. et Liebler, D. C.** (1999). Reactions of β -Carotene with Cigarette Smoke Oxidants. Identification of Carotenoid Oxidation Products and Evaluation of the Prooxidant/Antioxidant Effect. *Chemical Research in Toxicology*, **12**, 6, 535-543.
- Baloch, W. A., Khan, S. et Baloch, A. K.** (1997). Influence of chemical additives on the stability of dried tomato powder. *International Journal of Food Science & Technology*, **32**, 2, 117-120.
- Bartley, G. E. et Scolnik, P. A.** (1995). Plant Carotenoids: Pigments for Photoprotection, Visual Attraction, and Human Health. *The Plant Cell*, **7**, 1027-1038.
- Bast, A., Haenen, G., Berg, R. v. d. et Berg, H. v. d.** (1998). Antioxidant effects of carotenoids. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, **68**, 6, 399-403.

- Bendich, A. et Shapiro, S. S.** (1986). Effect of β -carotene and Canthaxanthin on the Immune Response of the Rat. *The Journal of Nutrition*, **116**, 2254-2262.
- Bernal, C., Martín-Pozuelo, G., Lozano, A. B., Sevilla, Á., García-Alonso, J., Canovas, M. et Periago, M. J.** (2013). Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **24**, 11, 1870-1881.
- Biesalski, H. K. et Tinz, J.** (2008). Nutritargeting. *Advances in Food and Nutrition Research*, **54**, 179-217.
- Böhm, V., Puspitasari-Nienaber, N. L., Ferruzzi, M. G. et Schwartz, S. J.** (2001). Trolox Equivalent Antioxidant Capacity of Different Geometrical Isomers of α -Carotene, β -Carotene, Lycopene, and Zeaxanthin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 1, 221-226.
- Boileau, A. C., Merchen, N. R., Wasson, K., Atkinson, C. A. et Erdman, J. W.** (1999). Cis-Lycopene Is More Bioavailable Than Trans-Lycopene In Vitro and In Vivo in Lymph-Cannulated Ferrets. *Journal of Nutrition and Metabolism*, **129**, 1176-1181.
- Bosser, A. et Belin, J. M.** (1994). Synthesis of β -Ionone in a Aldehyde/Xanthine Oxidase/ β -Carotene System Involving Free Radical Formation. *Biotechnologie Progress*, **10**, 129-133.
- Bouchard, M., Boudreau, N. et Auger, M.** (1996). Membrane fluidity response to odorants as seen by ^2H -NMR and infrared spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1282**, 2, 233-239.
- Bracci, R., Perrone, S. et Buonocore, G.** (2002). Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. *Acta Paediatrica Supplement*, **91**, 130-134.
- Breksa, A. P. et Manners, G. D.** (2006). Evaluation of the Antioxidant Capacity of Limonin, Nomilin, and Limonin Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 11, 3827-3831.
- Britton, G.** (1989). Carotenoid Biosynthesis — An Overview. Carotenoids. N. I. Krinsky, M. Mathews-Rothet R. Taylor, Springer US 167-184.
- Britton, G.** (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB Journal*, **9**, 1551-1558.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. et Pfander, H.** (2008). Special Molecules, Special Properties. Carotenoids. G. Britton, S. Liaaen-Jensenet H. Pfander. Basel-Boston-Berlin, Birkhäuser Verlag. **4**, 1-6.
- Brown, M. J., Ferruzzi, M. G., Nguyen, M. L., Cooper, D. A., Eldridge, A. L., Schwartz, S. J. et White, W. S.** (2004). Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **80**, 2, 396-403.

- Buchwald, H., O'Dea, T. J., Menchaca, H. J., Michalek, V. N. et Rohde, T. D.** (2000). Effect Of Plasma Cholesterol On Red Blood Cell Oxygen Transport. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **27**, 12, 951-955.
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E. et Kinneary, J. F.** (1996). The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. Whitehouse Station, NJ, Merck Research Laboratories Division of Merck & Co., Inc
- Burton, G. et Ingold, K.** (1984). β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224**, 4649, 569-573.
- Burton, G. W. et Ingold, K. U.** (1984). β -carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, **224**, 569-573.
- Cao-Hoang, L., Fougère, R. et 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. et Waché, Y.** (2011). Stability of carotenoid extracts of gac (*Momordica cochinchinensis*) towards cooxidation — Protective effect of lycopene on β -carotene. *Food Research International*, **44**, 2252-2257.
- Cao-Hoang, L. et Waché, Y.** (2009). Carotene dispersion in liquid media In: beta-Carotene, Dietary Sources, Cancer, and Cognition. *Hauppauge: Novapublishers*.
- Cao-Hoang, L. et Waché, Y.** (2010). Factors governing the dispersion of highly apolar compounds in polar environment: case of β -carotene. *Nanotechnology Research Journal*, **3**, 1-2, 35-50.
- Carail, M. et Caris-Veyrat, C.** (2006). Carotenoid oxidation products: From villain to saviour?*. *Pure and Applied Chemistry*, **78**, 1493-1503.
- Caris-Veyrat, C., Schmid, A., Carail, M. et Böhm, V.** (2003). Cleavage Products of Lycopene Produced by in Vitro Oxidations: Characterization and Mechanisms of Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 25, 7318-7325.
- Carnat, A. P., Carnat, A., Fraisse, D. et Lamaison, J. L.** (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, **72**, 5, 301-305.
- Caspar-Bauguil, S., Maestre, N., Segafredo, C., Galinier, A., Garcia, J., Prost, M., Périquet, B., Pénicaud, L., Salvayre, R. et Casteilla, L.** (2009). Evaluation of whole antioxidant defenses of human mononuclear cells by a new in vitro biological test: Lack of correlation between erythrocyte and mononuclear cell resistance to oxidative stress. *Clinical Biochemistry*, **42**, 6, 510-514.
- Chasse, G. A., Mak, M. L., Deretey, E., Farkas, I., Torday, L. L., Papp, J. G., Sarma, D. S. R., Agarwal, A., Chakravarthi, S., Agarwal, S., et al.** (2001). An ab initio computational

study on selected lycopene isomers. *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **571**, 1–3, 27-37.

- Chemat, F., Tomao, V. et Viot, M.** (2008). Ultrasound-Assisted Extraction in Food Analysis. Handbook of Food Analysis Instruments, CRC Press.
- Chen, B. H. et Huang, J. H.** (1998). Degradation and isomerization of chlorophyll a and β -carotene as affected by various heating and illumination treatments. *Food Chemistry*, **62**, 3, 299-307.
- Chen, B. H., Peng, H. Y. et Chen, H. E.** (1995). Changes of Carotenoids, Color, and Vitamin A Contents during Processing of Carrot Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 7, 1912-1918.
- Chen, Y. et Deuster, P.** (2009). Comparison of quercetin and dihydroquercetin: Antioxidant-independent actions on erythrocyte and platelet membrane. *Chemico-Biological Interactions*, **182**, 1, 7-12.
- Chipman, K.** (1991). "n-Hexane" Environmental health criteria 122 Work Health Organization. Accessed July, 2014, de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc122.htm#PartNumber:1>.
- Clagett-Dame, M. et DeLuca, H. F.** (2002). The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual Review of Nutrition*, **22**, 1, 347-381.
- Clinton, S. K., Emenhiser, C., Schwartz, S. J., Bostwick, D. G., Williams, A. W., Moore, B. J., Erdman, J. W. et Jr** (1996). *cis-trans* Lycopene Isomers, Carotenoids, and Retinol in the Human Prostate. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **5**, 823-833.
- Colle, I., Lemmens, L., Tolesa, G. N., Van Buggenhout, S., De Vleeschouwer, K., Van Loey, A. M. et Hendrickx, M. E.** (2010). Lycopene Degradation and Isomerization Kinetics during Thermal Processing of an Olive Oil/Tomato Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 24, 12784-12789.
- Crouzet, J., Kanasawud, P. et Sakko, M.** (2002). Thermal Generation of Carotenoid-Derived Compounds. Carotenoid-Derived Aroma Compounds. P. Winterhalteret R. L. Rouseff. Washington, DC, The American Chemical Society 115-129.
- Dan, C., Zhi-Rong, C. et Hao-Ran, L.** (2008). Qualitative Analysis of β -carotene Isomers. *Food Science*, **29**, 4, 50-53.
- Dauqan, E. M. A., Sani, H. A., Abdullah, A. et Kasim, Z. M.** (2011). Fatty Acids Composition of Four Different Vegetable Oils (Red Palm Olein, Palm Olein, Corn Oil and Coconut Oil) by Gas Chromatography *2nd International Conference on Chemistry and Chemical Engineering*, **14**, 31-34.
- de Carvalho, L. M. J., Gomes, P. B., Godoy, R. L. d. O., Pacheco, S., do Monte, P. H. F., de Carvalho, J. L. V., Nutti, M. R., Neves, A. C. L., Vieira, A. C. R. A. et Ramos, S. R. R.** (2012). Total carotenoid content, α -carotene and β -carotene, of landrace pumpkins

- (Cucurbita moschata Duch): A preliminary study. *Food Research International*, **47**, 2, 337-340.
- DeFilippis, A., Blaha, M. et Jacobson, T.** (2010). Omega-3 Fatty Acids for Cardiovascular Disease Prevention. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, **12**, 4, 365-380.
- Delmas-Beauvieux, M. C., C.Combe, Penchant, E., Carbonneau, M. A., Dubourg, L., Précigout, V. d., Aparicio, M. et Clerc, M.** (1995). Evaluation of Red Blood Cell Lipoperoxidation in Hemodialysed Patients during Erythropoietin Therapy Supplemented or Not with Iron. *Nephron*, **69**, 404-410.
- Deming, D. M., Teixeira, S. R. et Erdman, J. W.** (2002). All-trans β -Carotene Appears to Be More Bioavailable than 9-cis or 13-cis β -Carotene in Gerbils Given Single Oral Doses of Each Isomer. *The Journal of Nutrition*, **132**, 9, 2700-2708.
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K. et Liu, R. H.** (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 10, 3010-3014.
- Durand, G., Polidori, A., Salles, J. P., Prost, M., Durand, P. et Pucci, B.** (2003). Synthesis and antioxidant efficiency of a new amphiphilic spin-trap derived from PBN and lipoic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 16, 2673-2676.
- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G. et Young, A. J.** (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **430**, 1, 37-48.
- El-Magoli, S. B., Karel, M. et Yong, S.** (1980). Acceleration of lipid oxidation by volatile products of hydroperoxide decomposition. *Journal of Food Biochemistry*, **3**, 2-3, 111-124.
- Erdman Jr, J. W., Ford, N. A. et Lindshield, B. L.** (2009). Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **483**, 2, 229-235.
- Eroglu, A., Hruszkewycz, D. P., dela Sena, C., Narayanasamy, S., Riedl, K. M., Kopec, R. E., Schwartz, S. J., Curley, R. W. et Harrison, E. H.** (2012). Naturally Occurring Eccentric Cleavage Products of Provitamin A β -Carotene Function as Antagonists of Retinoic Acid Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 19, 15886-15895.
- EurekaSanté** (2014). "Caroténoïde". Accès le 27 août, 2014, de <http://www.eurekasante.fr/parapharmacie/complements-alimentaires/carotenoide.html>.
- Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C. et Ishida, B. K.** (2008). In Vitro Micellarization and Intestinal Cell Uptake of *cis* Isomers of Lycopene Exceed Those of All-*trans* Lycopene. *Journal of Nutrition*, **138**, 482-486.
- Fakourelis, N., Lee, E. C. et Min, D. B.** (1987). Effects of Chlorophyll and β -Carotene on the Oxidation Stability of Olive Oil. *Journal of Food Science*, **52**, 1, 234-235.

- Fatimah, A. M. Z., Norazian, M. H. et Rashidi, O.** (2012). Identification of carotenoid composition in selected 'ulam' or traditional vegetables in Malaysia. *International Food Research Journal*, **19**, 2, 527-530.
- Fattore, E. et Fanelli, R.** (2013). Palm oil and palmitic acid: a review on cardiovascular effects and carcinogenicity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **64**, 5, 648-659.
- Fauzi, N. A. M. et Sarmidi, M. R.** (2011). Extraction of Heat Treated Palm Oil and Their Stability on β -carotene During Storage. *Journal of Science and Technology*, 45-54.
- Ferrari, D., Aldini, A. et Cuccolini, S.** (2013). Carotenoid extraction from plant material, Patent US20130085309 A1.
- Forman, M. R., Beecher, G. R., Lanza, E., Reichman, M. E., Graubard, B. I., Campbell, W. S., Marr, T., Yong, L. C., Judd, J. T. et Taylor, P. R.** (1995). Effect of alcohol consumption on plasma carotenoid concentrations in premenopausal women: a controlled dietary study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 1, 131-135.
- Giovanelli, G. et Paradiso, A.** (2002). Stability of Dried and Intermediate Moisture Tomato Pulp during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 25, 7277-7281.
- Gloria, N. F., Soares, N., Brand, C., Oliveira, F. L., Borojevic, R. et Teodoro, A. J.** (2014). Lycopene and Beta-carotene Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer Research*, **34**, 3, 1377-1386.
- Goh, S. H., Choo, Y. M. et Ong, S. H.** (1985). Minor constituents of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **62**, 2, 237-240.
- Goula, A. M. et Adamopoulos, K. G.** (2005). Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. *LWT - Food Science and Technology*, **38**, 5, 479-487.
- Graziani, G., Pernice, R., Lanzuise, S., Vitaglione, P., Anese, M. et Fogliano, V.** (2003). Effect of peeling and heating on carotenoid content and antioxidant activity of tomato and tomato-virgin olive oil systems. *European Food Research and Technology*, **216**, 116-121.
- Guichard, F. et Bui, D. S.** (1941). La matiere colorante du fruit du *Momordica cochinchinnensis* spreng. *Annales de l'ecole Superieure de Medecine et de Pharmacie de l'Indochine*, **5**, 141-142.
- Guo, W.-H., Tu, C.-Y. et Hu, C.-H.** (2008). Cis-Trans Isomerizations of β -Carotene and Lycopene: A Theoretical Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, **112**, 38, 12158-12167.
- Gupta, S. S. et Ghosh, M.** (2013). In Vitro Antioxidative Evaluation of α - and β -Carotene, Isolated from Crude Palm Oil. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2013**, 10.
- Hackett, M. M., Lee, J. H., Francis, D. et Schwartz, S. J.** (2004). Thermal Stability and Isomerization of Lycopene in Tomato Oleoresins from Different Varieties. *Journal of Food Science*, **69**, 7, 536-541.

- Hadley, C. W., Clinton, S. K. et Schwartz, S. J.** (2003). The Consumption of Processed Tomato Products Enhances Plasma Lycopene Concentrations in Association with a Reduced Lipoprotein Sensitivity to Oxidative Damage. *The Journal of Nutrition*, **133**, 3, 727-732.
- Haigh, W. G.** (1994). High purity beta-carotene, Patent US 5310554 A.
- Hama, I., Hara, N., Tanaka, Y. et Nakamura, M.** (1993). Méthode de purification d'un concentré contenant du carotène, Patent EP 0242148 B1.
- Han, X.-X., Zhang, M., Ma, A.-G., Ge, S., Shi, X.-X., Sun, Y.-Y., Wang, Q.-Z. et Liang, H.** (2011). Antioxidant micronutrient supplementation increases erythrocyte membrane fluidity in adults from a rural Chinese community. *British Journal of Nutrition*, **106**, 11, 1676-1682.
- Handa, S. S.** (2008). An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. S. S. Handa, S. P. S. Khanuja, G. Longoet D. D. Rakesh. Trieste, Italy, United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology 21-52.
- Heller, L.** (2009). "US leads in lycopene launches". Accès le 27 août, 2014, de <http://www.nutraingredients-usa.com>.
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., Manson, J. E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N. R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J. M., Ridker, P. M., et al.** (1996). Lack of Effect of Long-Term Supplementation with Beta Carotene on the Incidence of Malignant Neoplasms and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, **334**, 18, 1145-1149.
- Ho, C. C., de Moura, F. F., Kim, S.-H. et Clifford, A. J.** (2007). Excentral cleavage of beta-carotene in vivo in a healthy man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **85**(3), 770-777.
- Holloway, D., Yang, M., Paganga, G., Rice-Evans, C. A. et Bramley, P. M.** (2000). Isomerization of dietary lycopene during assimilation and transport in plasma. *Free Radical Research*, **32**, 1 93-102.
- Huang, D., Ou, B. et Prior, R. L.** (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 6, 1841-1856.
- Hultén, K., Van Kappel, A., Winkvist, A., Kaaks, R., Hallmans, G., Lenner, P. et Riboli, E.** (2001). Carotenoids, alpha-tocopherols, and retinol in plasma and breast cancer risk in northern Sweden. *Cancer Causes & Control*, **12**, 6, 529-537.
- Hunter, R. F. et Krakenberger, R. M.** (1946). Palm-oil carotenoids 5. Examination of 'Sese' palm oils. *Biochemical Journal*, **40**, 4, 492-493.
- Iftikhar, S., Lietz, H., Mobarhan, S. et Frommel, T. O.** (1996). In vitro β -carotene toxicity for human colon cancer cells. *Nutrition and Cancer*, **25**, 3, 221-230.
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M. et Martínez-Navarrete, N.** (2013). Jam processing and storage effects on β -carotene and flavonoids content in grapefruit. *Journal of Functional Foods*, **5**, 2, 736-744.

- Ilic, D., Forbes, K. M. et Hased, C.** (2011). Lycopene for the prevention of prostate cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11.
- Ishida, B. K., Chapman, M. H. et Randhava, S. S.** (2009). Extraction of carotenoids from plant material, Patent US7572468 B1.
- Ishida, B. K., Ma, J. et Chan, B.** (2001). A Simple, Rapid Method for HPLC Analysis of Lycopene Isomers. *Phytochemical Analysis*, 12, 194–198.
- Ishida, B. k., Turner, C., Chapman, M. H. et McKeon, T. A.** (2004). Fatty Acid and Carotenoid Composition of Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 274-279.
- Ito, Y., Sasaki, R., Minohara, M., Otani, M. et Aoki, K.** (1987). Quantitation of serum carotenoid concentrations in healthy inhabitants by high-performance liquid chromatography. *Clinica Chimica Acta*, 169, 2-3, 197-207.
- Järvinen, R.** (1995). Carotenoids, retinoids, tocopherols and tocotrienols in the diet; the Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *International journal for vitamin and nutrition research*, 65, 1, 24-30.
- Jiao, J., Gai, Q.-Y., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Luo, M., Wang, W. et Zhao, C.-J.** (2013). Microwave-assisted ionic liquids pretreatment followed by hydro-distillation for the efficient extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of its antioxidant efficacy in sunflower oil storage. *Journal of Food Engineering*, 117, 4, 477-485.
- Jomová, K., Lawson, M. et Gařa, L.** (2012). Prooxidant effect of lycopene on triglyceride oxidation. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 1, 942-948.
- Jóźwik, M., Jóźwik, M., Jóźwik, M., Szczypka, M., Gajewska, J. et Laskowska-Klita, T.** (1997). Antioxidant defence of red blood cells and plasma in stored human blood. *Clinica Chimica Acta*, 267, 2, 129-142.
- Kanasawud, P. et Crouzet, J. C.** (1990). Mechanism of formation of volatile compounds by thermal degradation of carotenoids in aqueous medium. 2. Lycopene degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 5, 1238-1242.
- Kaufmann, B. et Christen, P.** (2002). Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13, 2, 105-113.
- Kelkel, M., Schumacher, M., Dicato, M. et Diederich, M.** (2011). Antioxidant and anti-proliferative properties of lycopene. *Free Radical Research*, 45, 8, 925-940.
- Kennedy, T. A. et Liebler, D. C.** (1992). Peroxyl radical scavenging by beta-carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 7, 4658-4663.
- Kha, T. C.** (2010). Effects of different drying processes on the physicochemical and antioxidant properties of gac fruit powder. Newcastle, Australia, The University of Newcastle.

- Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Parks, S. E. et Stathopoulos, C.** (2013). Gac Fruit: Nutrient and Phytochemical Composition, and Options for Processing. *Food Reviews International*, **29**, 92-106.
- Kha, T. C., Nguyen, M. H., Roach, P. D. et Stathopoulos, C. E.** (2013). Effects of Gac aril microwave processing conditions on oil extraction efficiency, and β -carotene and lycopene contents. *Journal of Food Engineering*, **117**, 4, 486-491.
- Khachik, F.** (2006). Process for purification and crystallization of palm oil carotenoids, Patent 7119238 B2.
- Khan, M., Anjum, F., Sohaib, M. et Sameen, A.** (2013). Tackling metabolic syndrome by functional foods. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, **14**, 3, 287-297.
- Kidmose, U.** (2001). Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L) genotypes after deep frozen storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 9, 918-923.
- Kim, D. J., Takasuka, N., Nishino, H. et Tsuda, H.** (2000). Chemoprevention of lung cancer by lycopene. *BioFactors*, **13**, 1, 95-102.
- Kim, J. Y., Paik, J. K., Kim, O. Y., Park, H. W., Lee, J. H., Jang, Y. et Lee, J. H.** (2011). Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Atherosclerosis*, **215**, 1, 189-195.
- Kiokias, S. et Gordon, M. H.** (2003). Dietary supplementation with a natural carotenoid mixture decreases oxidative stress. *European Journal of Clinical Nutrition*, **57**, 9, 1135-1140.
- Kleinjans, J. C. S., van Herwijnen, M. H. M., van Maanen, J. M. S., Maas, L. M., de Kok, T. M. C. M., Moonen, H. J. J. et Briedé, J. J.** (2004). In vitro investigations into the interaction of β -carotene with DNA: evidence for the role of carbon-centered free radicals. *Carcinogenesis*, **25**, 7, 1249-1256.
- Knockaert, G., Pulisery, S. K., Colle, I., Van Buggenhout, S., Hendrickx, M. et Loey, A. V.** (2012). Lycopene degradation, isomerization and in vitro bioaccessibility in high pressure homogenized tomato puree containing oil: Effect of additional thermal and high pressure processing. *Food Chemistry*, **135**, 3, 1290-1297.
- Köhn, S., Kolbe, H., Korger, M., Köpsel, C., Mayer, B., Auweter, H., Lüddecke, E., Bettermann, H. et Martin, H.-D.** (2008). Aggregation and Interface Behaviour of Carotenoids. Carotenoids. G. Britton, S. Liaaen-Jensen et H. Pfander, Birkhäuser Basel. **4**, 53-98.
- Konwarh, R., Pramanik, S., Kalita, D., Mahanta, C. L. et Karak, N.** (2012). Ultrasonication – A complementary ‘green chemistry’ tool to biocatalysis: A laboratory-scale study of lycopene extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, **19**, 2, 292-299.
- Krinsky, N. I.** (1993). Actions of Carotenoids in Biological Systems. *Annual Review of Nutrition*, **13**, 1, 561-587.

- Kris-Etherton, P., Griel, A., Psota, T., Gebauer, S., Zhang, J. et Etherton, T.** (2005). Dietary stearic acid and risk of cardiovascular disease: Intake, sources, digestion, and absorption. *Lipids*, **40**, 12, 1193-1200.
- Kubola, J., Meeso, N. et Siriamornpun, S.** (2013). Lycopene and beta carotene concentration in aril oil of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng) as influenced by aril-drying process and solvents extraction. *Food Research International*, **50**, 2, 664-669.
- Kubola, J. et Siriamornpun, S.** (2011). Phytochemicals and antioxidant activity of different fruit fractions (peel, pulp, aril and seed) of Thai gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng). *Food Chemistry*, **127**, 3, 1138-1145.
- Kucuk, O., Sarkar, F. H., Djuric, Z., Sakr, W., Pollak, M. N., Khachik, F., Banerjee, M., Bertram, J. S. et Wood, D. P.** (2002). Effects of Lycopene Supplementation in Patients with Localized Prostate Cancer. *Experimental Biology and Medicine*, **227**, 10, 881-885.
- Kuhnen, S., Lemos, P. M. M., Campestrini, L. H., Ogliari, J. B., Dias, P. F. et Maraschin, M.** (2009). Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. *Journal of Functional Foods*, **1**, 3, 284-290.
- Kuhnlein, H. V.** (2004). Karat, Pulque, and Gac: Three Shining Stars in the Traditional Food Galaxy. *Nutrition Reviews*, **62**, 11, 439-442.
- Kuki, M., Koyama, Y. et Nagae, H.** (1991). Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis and 15-cis isomers of .beta.-carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via the T1 state. *The Journal of Physical Chemistry*, **95**, 19, 7171-7180.
- Latip, R. A., Baharin, B. S., Che Man, Y. B. et Rahman, R. A.** (2001). Effect of adsorption and solvent extraction process on the percentage of carotene extracted from crude palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **78**, 1, 83-87.
- Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R. et Ventura, H. O.** (2009). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, **54**, 7, 585-594.
- Lavy, A., Amotz, A. B. et Aviram, M.** (1993). Preferential Inhibition of LDL Oxidation by the all-trans Isomer of β -carotène in Comparison with 9-cis β -carotène. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, **31**, 83-90.
- Le Grusse, J. et B, W.** (1993). Les vitamines, données biochimiques, nutritionnelles et cliniques. Neuilly sur Seine, CEIV - Produits Roche
- Lee, M. T. et Chen, B. H.** (2002). Stability of lycopene during heating and illumination in a model system. *Food Chemistry*, **78**, 4, 425-432.
- Lesgards, J.-F., Durand, P., Lassarre, M., Stocker, P., Lesgards, G., Lanteaume, A., Prost, M. et Lehucher-Michel, M.-P.** (2002). Assessment of Lifestyle Effects on the Overall

Antioxidant Capacity of Healthy Subjects. *Environmental Health Perspectives*, **110**, 479-487.

- Levin, G. et Mokady, S.** (1994). Antioxidant activity of 9-cis compared to all-trans β -carotene in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, **17**, 1, 77-82.
- Levy, Y., Zaltzberg, H., Ben-Amotz, A., Kanter, Y. et Aviram, M.** (1999). β -Carotene affects antioxidant status in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pathophysiology*, **6**, 3, 157-161.
- Lin, W.-T., Huang, C.-C., Lin, T.-J., Chen, J.-R., Shieh, M.-J., Peng, H.-C., Yang, S.-C. et Huang, C.-Y.** (2009). Effects of β -carotene on antioxidant status in rats with chronic alcohol consumption. *Cell Biochemistry and Function*, **27**, 6, 344-350.
- Liu, C., Wang, R., Pan, H., Ding, Q. et Lu, F.** (2013). Effect of lycopene on oxidative stress and behavioral deficits in rotenone induced model of Parkinson's disease. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, **29**, 4, 380-384.
- Liu, J., Ong, W., Román, E., Lynn, M. J. et Kaifer, A. E.** (2000). Cyclodextrin-Modified Gold Nanospheres. *Langmuir*, **16**, 7, 3000-3002.
- Lowe, G. M., Booth, L. A., Young, A. J. et Bilton, R. F.** (1999). Lycopene and β -carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. *Free Radical Research*, **30**, 2, 141-151.
- Machlin, L. J. et Bendich, A.** (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, **1**, 6, 441-445.
- Mailer, R.** (2006). Chemistry and quality of olive oil. *PRIMEFACT Profitable & Sustainable Primary Industries*, **227**, 1-4.
- Marchetti, E., Monaco, A., Procaccini, L., Mummolo, S., Gatto, R., Tete, S., Baldini, A., Tecco, S. et Marzo, G.** (2012). Periodontal disease: the influence of metabolic syndrome. *Nutrition & Metabolism*, **9**, 1, 88.
- Marsili, R. et Callahan, D.** (1993). Comparison of a Liquid Solvent Extraction Technique and Supercritical Fluid Extraction for the Determination of α - and β -Carotene in Vegetables. *Journal of Chromatographic Science*, **31**, 10, 422-428.
- Marx, M., Stuparic, M., Schieber, A. et Carle, R.** (2003). Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of β -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations. *Food Chemistry*, **83**, 4, 609-617.
- März, U.** (2011). The Global Market for Carotenoids. Food And Beverage. Wellesley, USA.
- Mayer-Miebach, E., Behsnilian, D., Regier, M. et Schuchmann, H. P.** (2005). Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential. *Food Research International*, **38**, 8-9, 1103-1108.

- Mech-Nowak, A., Świdorski, A., Kruczek, M., Łuczak, I. et Kostecka-Gugała, A.** (2012). Content of carotenoids in roots of seventeen cultivars of *Daucus carota* L. *Acta ABP Biochimica Polonica* **59**, 1, 139-141.
- Mercadante, A. Z., Steck, A. et Pfander, H.** (1998). Carotenoids from Guava (*Psidium guajava* L.): Isolation and Structure Elucidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 1, 145-151.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M. et Rice-Evans, C. A.** (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, **384**, 3, 240-242.
- Minguez-Mosquera, M. I., Hornero-Méndez, D. et Pérez-Galvez, A.** (2002). Carotenoids and Provitamin A in Functional Foods. Method of Analysis for Functional Foods and Nutraceuticals. W. J. Hurst, CRC Press LLC 101-153.
- Moraru, C. et Lee, T.-C.** (2005). Kinetic studies of lycopene isomerization in a tributyrin model system at gastric pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 23, 8997-9004.
- Mordi, R. C.** (1993). Mechanism of β -carotène degradation. *Biochemistry Journal*, **15**, 310-312.
- Mortensen, A. et Skibsted, L. H.** (1997). Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy. *FEBS Letters*, **417**, 3, 261-266.
- Mueller, L. et Boehm, V.** (2011). Antioxidant Activity of β -Carotene Compounds in Different *in Vitro* Assays. *Molecules*, **16**, 1055-1069.
- Müller, A., Pietsch, B., Faccin, N., Schierle, J. et Waysek, E. H.** (2008). Method for the Determination of Lycopene in Supplements and Raw Material by Reversed-Phase Liquid Chromatography: Single-Laboratory validation. *Journal of AOAC International*, **91**, 6, 1284-1297.
- Nakagawa, K., Fujimoto, K. et Miyazawa, T.** (1996). β -Carotene as a high-potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, **1299**, 1, 110-116.
- Nanou, K., Roukas, T. et Papadakis, E.** (2012). Improved production of carotenes from synthetic medium by *Blakeslea trispora* in a bubble column reactor. *Biochemical Engineering Journal*, **67**, 0, 203-207.
- Ngan, N. T. K., Hung, N. et Huynh, T. M.** (1993). Phong chong ung thu gan (Liver cancer prevention). *Y hoc Viet Nam*, **5**, 171, 81-88.
- Nguyen, M. L. et Schwartz, S. J.** (1998). Lycopene Stability During Food Processing. *Experimental Biology and Medicine*, **218**, 2, 101-105.
- Nhung, D. T. T., Bung, P. N., Ha, N. T. et Phong, T. K.** (2010). Changes in lycopene and beta carotene contents in aril and oil of gac fruit during storage. *Food Chemistry*, **121**, 2, 326-331.
- Norrish, A. E., Jackson, R. T., Sharpe, S. J. et Skeaff, C. M.** (2000). Prostate Cancer and Dietary Carotenoids. *American Journal of Epidemiology*, **151**, 2, 119-123.

- Oliveira, D. D. S., Lobato, A. L., Ribeiro, S. n. M. R., Santana, A. n. M. C., Chaves, J. B. c. P. et Pinheiro-Sant'Ana, H. M.** (2010). Carotenoids and Vitamin C during Handling and Distribution of Guava (*Psidium guajava* L.), Mango (*Mangifera indica* L.), and Papaya (*Carica papaya* L.) at Commercial Restaurants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 10, 6166-6172.
- Omenn, G. S., Doodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., et al.** (1996). Effects of a combination of β -carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The new england journal of medicine*.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., et al.** (1996). Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, **334**, 18, 1150-1155.
- Paiva, S. A. R. et Russell, R. M.** (1999). β -Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *Journal of the American College of Nutrition*, **18**, 5, 426-433.
- Palozza, P., Luberto, C., Calviello, G., Ricci, P. et Bartoli, G. M.** (1997). Antioxidant and Prooxidant Role of β -Carotene in Murine Normal and Tumor Thymocytes: Effects of Oxygen Partial Pressure. *Free Radical Biology and Medicine*, **22**, 6, 1065-1073.
- Palozza, P., Serini, S., Di Nicuolo, F., Piccioni, E. et Calviello, G.** (2003). Prooxidant effects of [beta]-carotene in cultured cells. *Molecular Aspects of Medicine*, **24**, 6, 353-362.
- Park, D.-K.** (1994). Antioxidant Activity of β -carotene Related Carotenoids of Peroxyl Radical Mediated Lipid Peroxidation. *Korean Biochemistry Journal*, **27**, 6, 479-483.
- Pasquet, V., Chérouvrier, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Bérard, J.-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P., et al.** (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, **46**, 1, 59-67.
- Peng, H.-C., Chen, Y.-L., Yang, S.-Y., Ho, P.-Y., Yang, S.-S., Hu, J.-T. et Yang, S.-C.** (2013). The antiapoptotic effects of different doses of β -carotene in chronic ethanol-fed rats. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, **2**, 3, 132-141.
- Peram, V., Iftikhar, S., Lietz, H., Mobarhan, S. et Frommel, T. O.** (1996). Cytotoxic effect of β -carotene in vitro is dependent on serum concentration and source. *Cancer Letters*, **106**, 1, 133-138.
- Perkins-Veazie, P.** (2007). Carotenoids in Watermelon and Mango. *Quality Management Fresh Cut Produce*, 259-264.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J. K., Pair, S. D. et Roberts, W.** (2001). Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **81**, 10, 983-987.

- Pham-Hoang, B., Romero-Guido, C., Phan-Thi, H. et Waché, Y.** (2013). Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**, 15, 6635-6645.
- Phan-Thi, H. et 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**, 0, 58-63.
- Pierce, J. P., Natarajan, L., Sun, S. et al, e.** (2006). Increases in Plasma Carotenoid Concentrations in Response to a Major Dietary Change in the Women's Healthy Eating and Living Study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, **15**, 1886-1892.
- Pinela, J., Barros, L., Carvalho, A. M. et Ferreira, I. C. F. R.** (2012). Nutritional composition and antioxidant activity of four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmer' varieties in Northeastern Portugal homegardens. *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 3-4, 829-834.
- Prost, M.** (1989). Utilisation de générateur de radicaux libres dans le domaine des dosages biologiques. France. **FR patent 2,642,526**.
- Puri, M., Sharma, D. et Barrow, C. J.** (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, **30**, 1, 37-44.
- Qiu, D., Chen, Z.-R. et Li, H.-R.** (2009). Effect of heating on solid β -carotene. *Food Chemistry*, **112**, 2, 344-349.
- Rao, A., Fleshner, N. et Agarwal, S.** (1999). Serum and tissue lycopene and biomarkers of oxidation in prostate cancer patients: a case-control study. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, **33**, 2, 159-164.
- Rao, A. V. et Shen, H.** (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*, **22**, 10, 1125-1131.
- Rodriguez-Amaya, D. B.** (2001). Some physicochemical properties of carotenoids. A guide to carotenoid analysis in foods. D. B. Rodriguez-Amaya. Washington DC, ILSI PRESS International Life Sciences Institute.
- Rodriguez-Amaya, D. B. et Kimura, M.** (2004). HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis, HarvestPlus Technical Monographs **2**,
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A. et 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.
- Rozzi, N. L., Singh, R. K., Vierling, R. A. et Watkins, B. A.** (2002). Supercritical Fluid Extraction of Lycopene from Tomato Processing Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 9, 2638-2643.
- Sadler, G., Davis, J. et Dezman, D.** (1990). Rapid Extraction of Lycopene and β -Carotene from Reconstituted Tomato Paste and Pink Grapefruit Homogenates. *Journal of Food Science*, **55**, 5, 1460-1461.

- Sarkar, A., Bishayee, A. et Chatterjee, M.** (1995). Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. *Cancer biochemistry biophysics*, **15**, 2, 111-125.
- Savova, M. et Saykova, I.** (2008). Etude de l'effet des champs électriques pulsés sur l'extraction solide-liquide à partir des matières premières végétales *Revue de génie industriel*, **2**, 33-40.
- Schieber, A. et Carle, R.** (2005). Occurrence of carotenoid *cis*-isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. *Trends in Food Science & Technology*, **16**, 416-422.
- Schierle, J., Bretzel, W., Bühler, I., Faccin, N., Hess, D., Steiner, K. et Schüep, W.** (1997). Content and isomeric ratio of lycopene in food and human blood plasma. *Food Chemistry*, **59**, 3, 459-465.
- Schneeman, B. O.** (2005). "Qualified Health Claims: Letter Regarding Tomatoes and Prostate Cancer (Lycopene Health Claim Coalition)". Accès le 27 août, 2014, de www.fda.gov.
- Sharma, A., Khare, S. K. et Gupta, M. N.** (2002). Enzyme-assisted aqueous extraction of peanut oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, **79**, 3, 215-218.
- Sharma, R., Moffatt, R. J., Singh, R. B. et Katz, J.** (2013). Chapter 1 - Omega-3 Fatty Acids in Prevention of Cardiovascular Disease in Humans: Intervention Trials, Healthy Heart Concept, Future Developments. Bioactive Food as Dietary Interventions for Cardiovascular Disease. San Diego, Academic Press 1-28.
- Shi, J.** (2000). Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, **20**, 4, 293-334.
- Shi, J., Le Maguer, M., Bryan, M. et Kakuda, Y.** (2003). Kinetics of lycopene degradation in tomato puree by heat and light irradiation. *Journal of Food Process Engineering*, **25**, 6, 485-498.
- Shi, J., Maguer, M. L., Kakuda, Y., Liptay, A. et Niekamp, F.** (1999). Lycopene degradation and isomerization in tomato dehydration. *Food Research International*, **32**, 1, 15-21.
- Siems, W., Sommerburg, O., Schild, L., Augustin, W., Langhans, C.-D. et Wiswedel, I.** (2002). Beta-carotene cleavage products induce oxidative stress in vitro by impairing mitochondrial respiration *The FASEB Journal*, **16**, 1289-1291.
- Simon, M. S., Djuric, Z., Dunn, B., Stephens, D., Lababidi, S. et Heilbrun, L. K.** (2000). An Evaluation of Plasma Antioxidant Levels and the Risk of Breast Cancer: A Pilot Case Control Study. *The Breast Journal*, **6**, 6, 388-395.
- Siriamornpun, S., Kaisoon, O. et Meeso, N.** (2012). Changes in colour, antioxidant activities and carotenoids (lycopene, β -carotene, lutein) of marigold flower (*Tagetes erecta* L.) resulting from different drying processes. *Journal of Functional Foods*, **4**, 4, 757-766.
- Soares, N. d. C. P., Teodoro, A. J., Oliveira, F. L., Santos, C. A. d. N., Takiya, C. M., Junior, O. S., Bianco, M., Junior, A. P., Nasciutti, L. E., Ferreira, L. B., et al.** (2013). Influence

of Lycopene on Cell Viability, Cell Cycle, and Apoptosis of Human Prostate Cancer and Benign Hyperplastic Cells. *Nutrition and Cancer*, **65**, 7, 1076-1085.

- Sommerburg, O., Langhans, C.-D., Arnhold, J., Leichsenring, M., Salerno, C., Crifò, C., Hoffmann, G. F., Debatin, K.-M. et Siems, W. G.** (2003). β -Carotene cleavage products after oxidation mediated by hypochlorous acid—a model for neutrophil-derived degradation. *Free Radical Biology and Medicine*, **35**, 11, 1480-1490.
- Stahl, W., Schwarz, W., Sundquist, A. R. et Sies, H.** (1992). *cis-trans* isomers of lycopene and [beta]-carotene in human serum and tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **294**, 1, 173-177.
- Stahl, W. et Sies, H.** (1992). Uptake of Lycopene and Its Geometrical Isomers Is Greater from Heat-Processed than from unprocessed Tomato Juice in Humans. *Journal of Nutrition*, **122**, 2161-2166.
- Stahl, W. et Sies, H.** (1996). Lycopene: A Biologically Important Carotenoid for Humans? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **336**, 1, 1-9.
- Susan, M. L. et Nora, M. O. B.** (1997). Modulation of paraquat toxicity by β -carotene at low oxygen partial pressure in chicken embryo fibroblasts. *British Journal of Nutrition*, **77**, 133-140.
- Takeoka, G. R., Dao, L., Flessa, S., Gillespie, D. M., Jewell, W. T., Huebner, B., Bertow, D. et Ebeler, S. E.** (2001). Processing Effects on Lycopene Content and Antioxidant Activity of Tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 8, 3713-3717.
- Tamai, H., Morinobu, T., Murata, T., Manago, M. et Mino, M.** (1995). 9-*cis* β -carotene in human plasma and blood cells after ingestion of β -carotene. *Lipids*, **30**, 6, 493-498.
- Tan, B. et David, N. S.** (1989). Qualitative Aspects of UV-Vis Spectrophotometry of β -Carotene and Lycopene. *Journal of Chemical Education* **66**, 258-260.
- Tang, F.-Y., Pai, M.-H. et Wang, X.-D.** (2011). Consumption of Lycopene Inhibits the Growth and Progression of Colon Cancer in a Mouse Xenograft Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 16, 9011-9021.
- Tran, T. H., Nguyen, M. H., Zabaras, D. et Vu, L. T. T.** (2008). Process development of Gac powder by using different enzymes and drying techniques. *Journal of Food Engineering*, **85**, 3, 359-365.
- Tran, T. L. H. et Raymundo, L. C.** (1999). Biosynthesis of carotenoids in bittermelon at high temperature. *Phytochemistry*, **52**, 2, 275-280.
- Trejo-Solís, C., Pedraza-Chaverri, J., Torres-Ramos, M., Jiménez-Farfán, D., Salgado, A. C., Serrano-García, N., Osorio-Rico, L. et Sotelo, J.** (2013). Multiple Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Lycopene in Cancer Inhibition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-17.

- Tsuchihashi, H., Kigoshi, M., Iwatsuki, M. et Niki, E.** (1995). Action of β -Carotene as an Antioxidant against Lipid Peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **323**, 1, 137-147.
- Turfboer, H. et BV, S. I. C.** (1997). Solvents in the food industry - assisting the extraction of substances from natural products. *The European Food & Drink Review*, 27-30.
- Unlue, N. Z., Bohna, T., Francisa, D. M., Nagarajaa, H. N., Clinton, S. K. et Schwartz, S. J.** (2007). Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, **98**, 01, 140-146.
- Uppala, P. T., Dissmore, T., Lau, B. H. S., Andacht, T. et Rajaram, S.** (2013). Selective Inhibition of Cell Proliferation by Lycopene in MCF-7 Breast Cancer Cells In vitro: A Proteomic Analysis. *Phytotherapy Research*, **27**, 4, 595-601.
- USDA** (2012). Technical Evaluation Report: Lycopene Handling. ICF International for the USDA National Organic Program, U.S Department Agriculture: 1-19.
- Valacchi, G., Pecorelli, A., Mencarelli, M., Maioli, E. et Davis, P.** (2009). Beta-carotene prevents ozone-induced proinflammatory markers in murine skin. *Toxicology and Industrial Health*, **25**, 4-5, 241-247.
- van-het-Hof, K. H., West, C. E., Weststrate, J. A. et Hautvast, J. G. A. J.** (2000). Dietary Factors That Affect the Bioavailability of Carotenoids. *The Journal of Nutrition*, **130**(3), 503-506.
- van Breemen, R. B., Sharifi, R., Viana, M., Pajkovic, N., Zhu, D., Yuan, L., Yang, Y., Bowen, P. E. et Stacewicz-Sapuntzakis, M.** (2011). Antioxidant Effects of Lycopene in African American Men with Prostate Cancer or Benign Prostate Hyperplasia: A Randomized, Controlled Trial. *Cancer Prevention Research*, **4**, 5, 711-718.
- van Poppel, G. et Goldbohm, R. A.** (1995). Epidemiologic evidence for beta-carotene and cancer prevention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **62**, 6, 1393S-1402S.
- Vassiliou, A.** (2009). Authorising the placing on the market of lycopene as novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. C(2009) 3149. T. C. o. t. E. Communities. Brussels, Official Journal of the European Union. **2009/362/EC**.
- Vetter, W., Englert, G., Rigassi, N. et Schwieter, U.** (1971). Carotenoids. IV Spectroscopic Methods. *Birkhäuser Verlag Basel*, 189-266.
- Vian, M. A., Chemat, F., Prat, L. et Gourdon, C.** (2011). Eco-extraction: contexte et innovation. Eco-extraction du vegetal. Procédés innovants et solvants alternatifs F. Chemat. Dunod, Paris, Dunod. **Série Chimie**.
- von Doering, W., Sotiriou-Leventis, C. et Roth, W. R.** (1995). Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans- β -carotene: kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry,

- and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans- β -carotene. *Journal of the American Chemical Society*, **117**, 10, 2747-2757.
- Vuong, L.** (2000). Underutilized beta-carotene-rich crops of Vietnam. *Food and Nutrition Bulletin*, **21**, 2, 173-181.
- Vuong, L. T.** (2004). *Momordica cochinchinensis* (Spreng.) β -carotene and method. *United States Patent*, US 6,770,585 B2.
- Vuong, L. T., Dueker, S. R. et Murphy, S. P.** (2002). Plasma β -carotene and retinol concentrations of children increase after a 30-d supplementation with the fruit *Momordica cochinchinensis* (gac). *The American Journal of Clinical Nutrition*, **75**, 872-879.
- Vuong, L. T., Franke, A. A., Custer, L. J. et Murphy, S. P.** (2006). *Momordica cochinchinensis* Spreng. (gac) fruit carotenoids reevaluated. *Journal of Food Composition and Analysis*, **19**, 664-668.
- Waché, Y., Bosser-DeRatuld, A., Lhuguenot, J.-C. et Belin, J.-M.** (2003). Effect of *cis/trans* Isomerism of β -Carotene on the Ratios of Volatile Compounds Produced during Oxidative Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7, 1984-1987.
- Wang, L. et Weller, C. L.** (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, **17**, 6, 300-312.
- Wang, X.-D. et Russell, R. M.** (1999). Procarcinogenic and Anticarcinogenic Effects of β -Carotene. *Nutrition Reviews*, **57**, 9, 263-272.
- Weedon, B. C. L.** (1971). Stereochemistry. Carotenoids. O. Isler. Stuttgart, Birkhäuser Verlag Basel 267-323.
- Wei, P. C., May, C. Y., Ngan, M. A. et Hock, C. C.** (2005). Supercritical Fluid Extraction of Palm Carotenoids. *American Journal of Environmental Sciences*, **1**, 4, 264-269.
- Werman, M. J., Ben-Amotz, A. et Mokady, S.** (1999). Availability and antiperoxidative effects of β -carotene from *Dunaliella bardawil* in alcohol-drinking rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **10**, 8, 449-454.
- Xianquan, S., Shi, J., Kakuda, Y. et Yueming, J.** (2005). Stability of Lycopene During Food Processing and Storage. *Journal of Medecine and Food*, **8**, 4, 413-422.
- Xinli, L. I. et Jiuhong, X. U.** (2014). Meta-analysis of the association between dietary lycopene intake and ovarian cancer risk in postmenopausal women. *Scientific Reports*, **4**.
- Yahia, E. M. et Ornelas-Paz, J. d. J.** (2009). Chemistry, Stability, and Biological Actions of Carotenoids. Fruit and Vegetable Phytochemicals. L. A. d. I. Rosa, E. Alvarez-Parrilla et G. A. González-Aguilar, Wiley-Blackwell 177-222.
- Yeh, S.-L. et Hu, M.-L.** (2000). Antioxidant and pro-oxidant effects of lycopene in comparison with β -carotene on oxidant-induced damage in Hs68 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **11**, 11-12, 548-554.

- Yeh, S. L., Hu, M. L. et Huang, C. S.** (2005). Lycopene enhances UVA–induced DNA damage and expression of heme oxygenase–1 in cultured mouse embryo fibroblasts. *European Journal of Nutrition*, **44**, 6, 365-370.
- Yonar, M. E.** (2013). Protective effect of lycopene on oxidative stress and antioxidant status in *Cyprinus carpio* during cypermethrin exposure. *Environmental Toxicology*, **28**, 11, 609-616.
- Young, A. J. et Lowe, G. M.** (2001). Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385**, 1, 20-27.
- Zanoni, B., Peri, C., Nani, R. et Lavelli, V.** (1998). Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. *Food Research International*, **31**, 5, 395-401.
- Zhang, P. et Omaye, S. T.** (2001). β -Carotene: interactions with α -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **12**, 1, 38-45.
- Zumbrunn, A., Uebelhart, P. et Eugster, C. H.** (1985). HPLC von Carotinen mit ψ -Endgruppen und (Z)-Konfiguration an terminalen konjugierten Doppelbindungen; Isolierung von (5Z)-Lycopin aus Tomaten. *Helvetica Chimica Acta*, **68**, 6, 1540-1542.

ANNEXES

ANNEXE 1. FICHES SUR LES CAROTENOIDES DE SYNTHÈSE

Fiche de spécification du β -carotène de Sigma-Aldrich

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

Email USA: techserv@sial.com

Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:

β -Carotene Type I, synthetic, $\geq 93\%$ (UV), powder

Product Number:

C9750

CAS Number:

7235-40-7

MDL:

MFCD00001556

Formula:

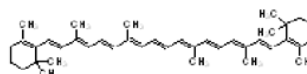
C₄₀H₅₆

Formula Weight:

536.87 g/mol

Storage Temperature:

-20 °C



TEST	Specification
Appearance (Color)	Red to Very Dark Red-Brown
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Dark Red to Dark Red-Brown
Solubility (Turbidity) 1 mg + 1 mL, CHCl ₃	Clear
Purity by UVVS (Based on E1% = 2280 for Lambda Maximum of 478 nm to 479 nm in Hexane)	92.5- 101.0 %
Purity by UVVS (Based on E1% = 2590 for Lambda Maximum of 450 nm to 451 nm in Hexane)	92.5- 101.0 %

Remarks:

Specification Date : 03/07/2011

Fiche de spécification du lycopène Sigma-Aldrich

SIGMA-ALDRICH[®]

sigma-aldr

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103,

Website: www.sigmaaldrich

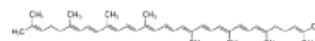
Email USA: techserv@sial

Outside USA: eurtechserv@sial

Product Specification

Product Name:
Lycopene - $\geq 90\%$, from tomato

Product Number: **L9879**
CAS Number: 502-65-8
MDL: MFCD00017350
Formula: C₄₀H₅₆
Formula Weight: 536.87 g/mol
Storage Temperature: -70 °C



TEST

Specification

Appearance (Color)	Red to Very Dark Red and Red-Brown and Very Dark Red-Brown
Appearance (Form)	Powder
Solubility (Color)	Orange to Red
Solubility (Turbidity)	Clear
1 mg/mL, CHCl ₃	
UV-Vis Spectrum	$\geq 90\%$
based on E _{1%} = 3450 at 472 nm in hexane	
Purity (HPLC)	$\geq 90\%$

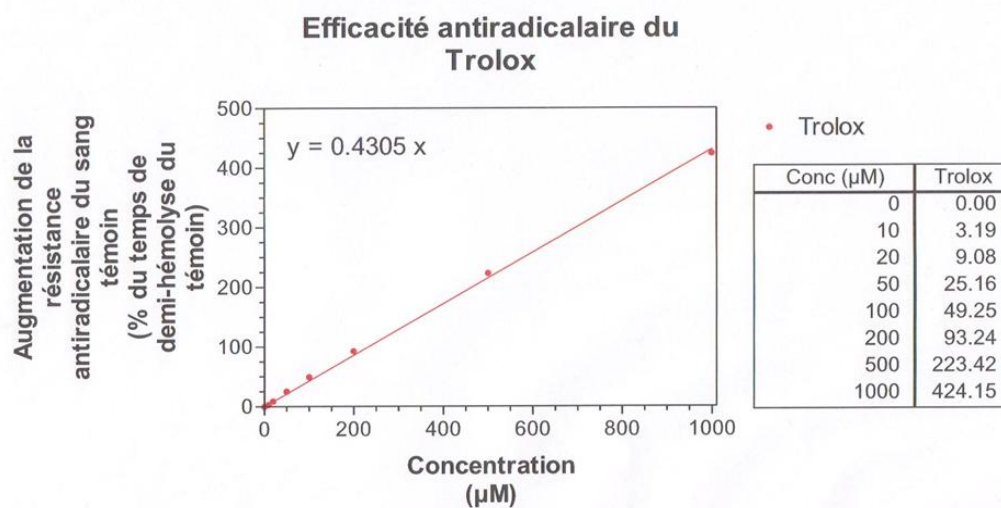
Specification: PRD.1.ZQ5.10000028541

ANNEXE 2. TEST KRL DE LA SOCIETE KIRIAL INTERNATIONAL

Données du test KRL sur les caroténoïdes

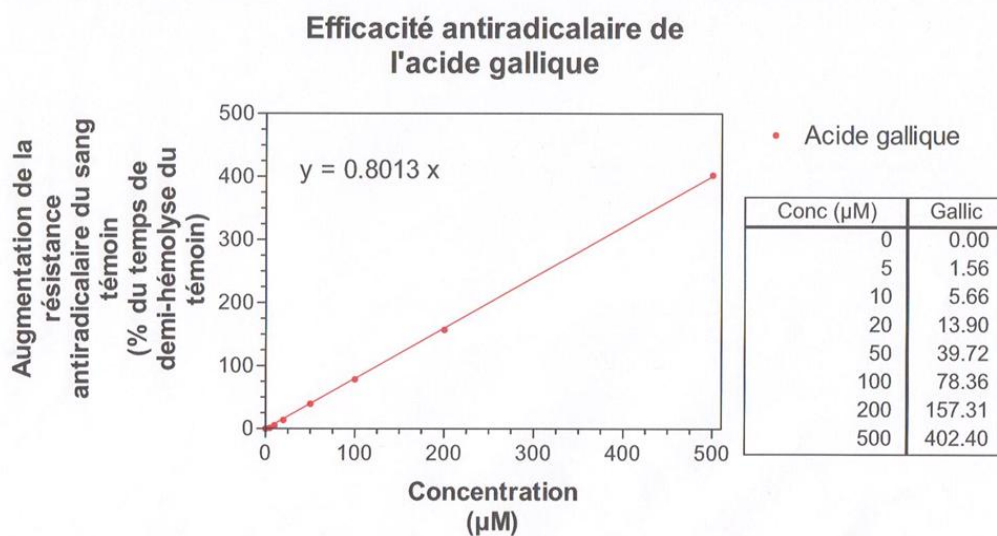
Courbes des standards :

ANNEXE : EFFICACITE ANTIRADICALAIRE DU STANDARD, TROLOX (Analogue de la vitamine E)



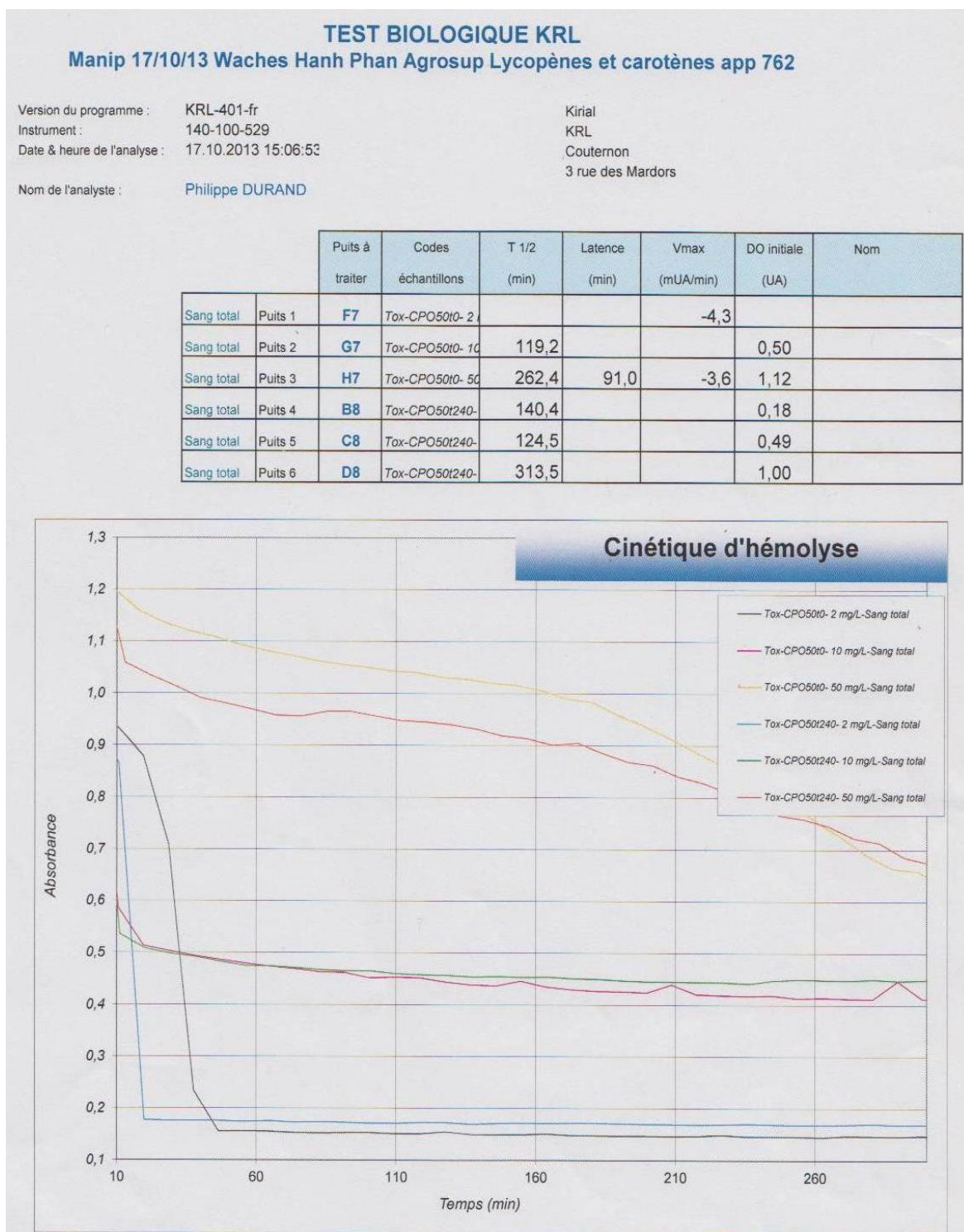
TEST KRL – Kirial International

ANNEXE : EFFICACITE ANTIRADICALAIRE DU STANDARD, ACIDE GALLIQUE (Acide phénolique)

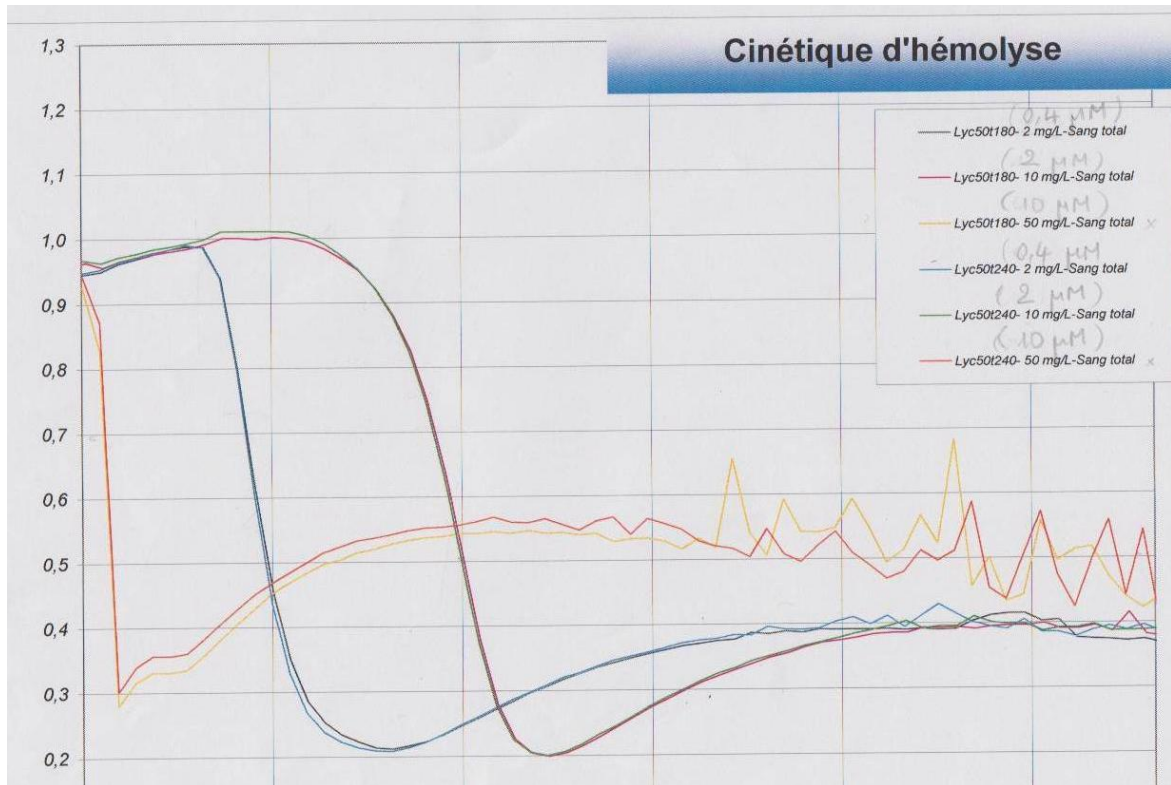


TEST KRL – Kirial International

Test de toxicité du β -carotène de l'huile de palme :

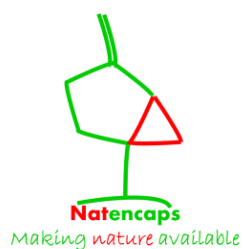


Cinétique d'hémolyse de lycopène :



ANNEXE 3. LE PROJET NATENCAPS

Projet Natencaps



Financier : Bourgogne pbifrance, Prémice



Bourgogne
Conseil régional



Prix obtenus :

2012 Prix CréAcc de l'ordre des experts comptables de Bourgogne en création
« Entreprise innovante »

2013 Prix du concours national de la création d'entreprises innovantes (MESR/Oséo) en
catégorie Emergence

2013 Finaliste du concours Génopole

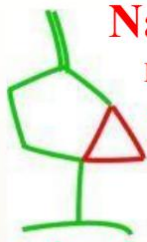


Oséo 2013



Créacc 2012

Prospectus de Natencaps



Natencaps

Producer of plant extracts as health supplements and natural ingredients
Assisting your innovations for the use of plant extracts and for the valorization of your products as natural and healthy products

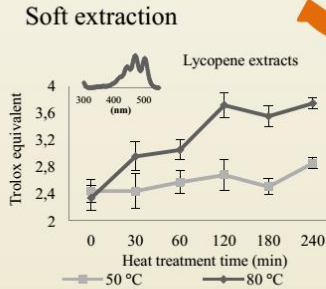
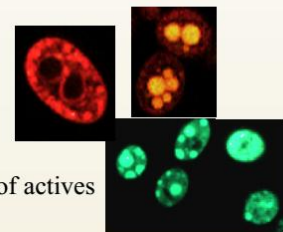
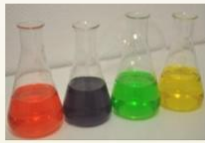
Making Nature Available

Contact: Yves Waché, chez laboratoire PAM
 1 Esplanade Erasme, 21000 Dijon France
 Mail: yves.wache@natencaps.com
 Tél: +33 3 80 77 23 94
www.natencaps.com

Activity :

Production of pigments and plant extracts
Soft technologies for extraction and fractionation

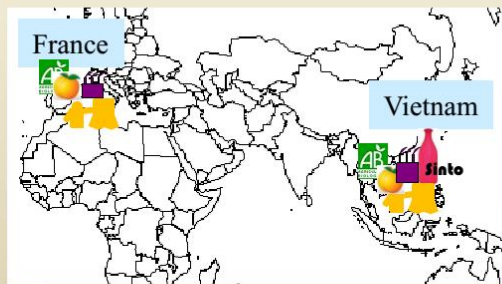
Tailored-made production & encapsulation
Technology of bioencapsulation in cells



Applications
 Extracts of tropical fruits
 Health supplements
 Natural or label-free coloring
Beverages
Pastries
Desserts
Cosmetics

Achievements

- Taste masking and encapsulation of actives for a dairy product with health allegation
- Stabilization of fruit colors for baking
- Formulation & processing of fruit juice with high nutritional value
- Development of fruit spirits and liqueur



Awards:



- technical support
- raw materials
- production
- sale

Our partners:



Certificat de la formation « Parcours Prémice Création Management –PPCM 2013 »



ANNEXE 4. LISTE DES TRAVAUX

Publications:

1. **Phan-Thi H**, Waché Y., 2014. Isomerization and increase in the antioxidant properties of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (gac) by moderate heat treatment. UV-vis spectra as a marker. *Food Chem.* 156, 58-63.
2. Do T T L, Vu N T, **Phan-Thi H**, Cao-Hoang L, Ta T M N, Waché Y. and Nguyen T H T, 2013. Traditional fermented sausage "Nem Chua" as a source of yeast biocatalysts efficient for the production of the aroma compound γ -decalactone. *Int J Food Sci Technol* 2014, 49, 1099–1105.
3. Bao Ngoc Pham-Hoang, Cynthia Romero-Guido, **Hanh Phan-Thi**, Yves Waché, 2013. Encapsulation in a natural, preformed, multi-component and complex capsule: yeast cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97,6635–6645.
4. Cao-Hoang L, **Phan-Thi H**, Osorio Puentes FJ, Waché Y., 2011. Stability of Carotenoid Extracts of gac (*Momordica cochinchinensis*) Towards Cooxidation – Protective effect of lycopene on β -carotene. *Food Res Int.* 44, 2252-2257.
5. Ta T.M.N., Cao-Hoang L., Romero-Guido C., Lourdin M., **Phan T.H.**, Goudot S., Maréchal P.A., Waché Y., 2012. A shift to 50°C provokes death in distinct ways for glucose and oleate-grown cells of *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol* 93(5), 2125-2134.
6. Ta T.M.N., Cao-Hoang L., **Phan-Thi H.**, Tran H.D., Souffou N., Gresti J., Maréchal P.A., Cavin J.F., Waché Y., 2010. New insights into the effect of medium chain length lactones on yeast membranes. Importance of the culture medium. *Appl Microbiol Biotechnol* 87, 1089-1099.
7. **Phan-Thi H.**, Cao-Hoang L., Nguyen T.H.T., Waché Y., 2011. Phase distribution of γ -decalactone produced by lactone-degrading or non-degrading yeast strains. Proceedings of the 3rd Regional Conference in Biotechnology Hanoi “Towards the Biotechnology Industry in the Region” *J. Sci. Technol.*, Vietnamese Academy of Science and Technology. ISSN: 0866 708X.

Présentations orales et affichées à des rencontres scientifiques:

1. **Phan-Thi H.**, Cao-Hoang L., Waché Y. Markers of the quality of carotenoids in food. EuroFoodChem Conference 05-2013, Istanbul, Turkey (Communication oral).
2. **Phan-Thi H.**, Cao-Hoang L., Waché Y. Heat effect on isomerization of lycopene from *Momordica cochinchinensis* (Gac). EuroFoodChem Conference 05-2013, Istanbul, Turkey (Poster).
3. **Phan-Thi H.**, Cao-Hoang L., Waché Y. Heat Effect on Isomerization of Lycopene from *Momordica cochinchinensis* (Gac). *Forum des Jeunes Recherches 2013, Dijon.* (Poster).
4. **Phan-Thi Hanh**, Hiep Do-Van, Waché Yves. *Momordica cochinchinensis* (Gac)-The new Asian treasure for health on its way to market. *Colloque Vitagora 03-2013, Dijon.* (Poster).

5. **Phan-Thi H.**, Cao-Hoang L., Durand P., Prost M., Waché Y. Etude de la capacité antioxydante d'extraits de caroténoïdes végétaux et de leurs produits de dégradation par des tests cellulaire et chimique. Forum des Jeunes Recherches 06-2011, Dijon. (Communication oral)
6. Cao-Hoang L., **Phan-Thi H.**, Waché Y. A la recherche du modèle végétal de caroténoïde antioxydant. *Colloque Vitagora 09-2011, Dijon.* (Poster)
7. Cao-Hoang L., Osorio Puentes F. J., **Phan-Thi H.**, Waché Y., 2011. Stability of Carotenoid Extracts of *Cucurbita maxima* Towards Enzymatic Cooxidation and Aroma Compound Generation. ICBFS Bali Indonésia. (Poster)