

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA-BEJAIA  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (SNV)  
Département de Biologie Physico-Chimique  
Laboratoire de Biochimie Appliquée



# THÈSE

Présentée par  
**DAHDOUH Amel**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR EN SCIENCES**

Filière : Biologie  
Option : Ingénierie Biochimique et Biotechnologie

Thème

Valorisation de protéines enzymatiques végétales et immobilisation sur support organique (PLA) : cas des peroxydases du navet blanc (*Brassica rapa L.*)

Soutenue le : **23 Septembre 2021**

Devant le Jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>	<i>Structure de Rattachement</i>	<i>Qualité</i>
<b>Mme ZEBBOUDJ Aicha</b>	Professeur	Université de Bejaia	Présidente
<b>M. KATI Djamel Edine</b>	Professeur	Université de Bejaia	Directeur de thèse
<b>Mme SENHADJI Ounissa</b>	Professeur	Université de Bejaia	Examinatrice
<b>M. IDOUI Tayeb</b>	Professeur	Université de Jijel	Examinateur
<b>Mme AMROUCHE Widad</b>	MCA	Université de Sétif	Examinatrice
<b>M. AIT SAADA Djamel</b>	MCA	Université de Mostaganem	Examinateur
<b>M. REZGUI Farouk</b>	Professeur	Université de Bejaia	Invité

**Année Universitaire 2020/2021**

## Remerciements

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé, la patience et le courage afin d'achever de mener ce travail à terme.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de thèse le professeur **KATI Djamel Edine**, pour la thématique proposée, les conseils pertinents qu'il m'a prodigués et sa disponibilité malgré ses autres obligations. Je le remercie aussi pour son soutien tout au long de la réalisation de ce travail et surtout pour la confiance qu'il m'a faite. J'ai eu la chance d'avoir un très bon guide qui m'a permis de profiter de son savoir et son professionnalisme.

Je remercie de même le Professeur **ZEBBOUDJ Aicha** pour m'avoir accueilli et ouvert les portes du laboratoire de Biochimie Appliquée et d'avoir mis à ma disposition les moyens matériels que j'ai utilisés au cours de la réalisation de ce travail.

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury :

Au professeur **ZEBBOUDJ Aicha** pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury et d'évaluer ce travail.

Au Professeur **SENHADJI Ounissa**, Professeur **AMROUCHE Widad**, Professeur **AIT SAADA Djamel** et au Professeur **IDOUI Tayeb**, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Vos suggestions, évaluations et visions seront d'un apport certain à l'amélioration du travail réalisé et aux perspectives envisagées.

Mes vifs remerciements s'adressent également au Professeur **REZGUI Farouk** (Laboratoire des Matériaux Organiques, Université de Béjaïa), pour son accueil dans son laboratoire et d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour réaliser les travaux de recherche relatifs à l'encapsulation des extraits.

Je voudrais également témoigner ma profonde reconnaissance aux :

Professeur **BOUCHERBA Nawel** et Docteur **BACHIR BEY Mostapha**, pour leur disponibilité, leur aide précieuse, leurs conseils pertinents et leurs encouragements, je vous remercie également pour les bons moments que nous avons partagés ensemble ;

Je remercie tous les membres du laboratoire de biochimie appliquée.

Un grand merci à mon mari **AKSAS Ali** pour sa présence continue, son aide précieuse, sa patience, ses conseils judicieux et ses encouragements.

Je ne remercierai jamais assez **mes parents, mes frères et sœurs**, qui m'ont toujours aidé, encouragé et soutenu dans les moments difficiles.

Enfin, je remercie tous ceux et celles qui ont contribué d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

## Liste des abréviations

**ABTS** : sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique  
**BBD** : Box-Behnken Design  
**BHT** : hydroxytoluène butylé  
**BSA**: Bovin Serum Albumin  
**DCM** : dichlorométhane  
**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**ERO** : Espèce réactives de l'oxygène  
**FTIR** : spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier  
**GPx**: glutathione peroxydase  
**GR**: glutathion reductase  
**GSH**: glutathion  
**HR** : haute résolution  
**HRP** : peroxydase de raifort  
**MEB** : microscopie électronique à balayage  
**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>** : radical superoxyde  
**OH**: radical hydroxyle  
**pH** : potentiel d'hydrogène  
**PhO** : phénol oxydase  
**PLA** : acide poly lactique  
**POD** : peroxydases végétales  
**PVA** : alcool polyvinylique  
**PVPP** :polyvinylpolypyrrolidone  
**ROS** : espèces réactives de l'oxygène  
**RSM** : la méthodologie de réponse de surface  
**Rt** : temps de rétention  
**RZ** : valeur Reinheitszahl  
**SDS-PAGE** : électrophorèse sur gel de polyacrylamide-dodécyl sulfate de sodium  
**SOD** : superoxydedismutase  
**TCA** : acide trichloracétique  
**TRP** : peroxydase des racines de navet  
**UFC** : unité formant colonie  
**TPTZ**: 2,4,6-Tri(2-pyridyl)-s-triazine  
**DTNB** : 5,5-dithio-bis-(acide 2-nitrobenzoïque)  
**NEM** : N-Ethylmaleimide

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Variétés de navet.....	5
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique de la classification des peroxydases.....	13
<b>Figure 3.</b> Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes .....	14
<b>Figure 4.</b> Représentation tridimensionnelle de la structure de la peroxydase de raifort ....	15
<b>Figure 5.</b> Résidus d'acides aminés clés dans la région de liaison à l'hème de HRP-C.....	16
<b>Figure 6.</b> Réactions catalysées par la peroxydase .....	17
<b>Figure 7.</b> Représentation schématique des différents rôles des peroxydases végétales ....	18
<b>Figure 8.</b> Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie .....	25
<b>Figure 9.</b> Processus enzymatique catalysé par Xanthine oxydase.....	26
<b>Figure 10.</b> NADPH oxydase catalyse le transfert d'électrons du NADPH vers des anions superoxydes.....	27
<b>Figure 11.</b> Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.....	29
<b>Figure 12.</b> Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire .....	30
<b>Figure 13.</b> Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés <sup>2</sup> .....	31
<b>Figure 14.</b> Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques .....	32
<b>Figure 15.</b> Mécanisme enzymatique de la SOD .....	33
<b>Figure 16.</b> Mécanisme enzymatique de la CAT .....	33
<b>Figure 17.</b> Mécanisme enzymatique de la GPx <sup>3</sup> .....	34
<b>Figure 18.</b> Différents groupes de composés phénoliques dans les plantes <sup>3</sup> .....	35
<b>Figure 19.</b> Structure de certains acides phénoliques .....	36
<b>Figure 20.</b> Exemples des flavonoïdes.....	37
<b>Figure 21.</b> Squelette des lignanes .....	38
<b>Figure 22.</b> Exemples de lignanes.....	38
<b>Figure 23.</b> Structure des précurseurs des deux classes de tanins hydrolysables et les tanins condensés .....	39
<b>Figure 24.</b> Structure de la vitamine E (ou $\alpha$ -tocophérol).....	40
<b>Figure 25.</b> Cycle de la vitamine E et de la vitamine C .....	41

<b>Figure 26.</b> Structure d'un liposome .....	44
<b>Figure 27.</b> Structures d'une capsule (A) et d'une microsphère (B).....	45
<b>Figure 28.</b> Images MEB de microcapsules (a) et de microsphères (b).....	45
<b>Figure 29.</b> Schéma du procédé d'encapsulation par précipitation/évaporation.....	50
<b>Figure 30.</b> Etapes de la digestion gastro-intestinale in vitro d'extrait enzymatique de navet .....	77
<b>Figure 31.</b> Influence du pH sur l'activité des peroxydases du navet.....	81
<b>Figure 32.</b> Influence de la température sur l'activité des peroxydases du navet .....	82
<b>Figure 33.</b> Influence de la concentration de NaCl sur l'activité des peroxydases du navet .....	83
<b>Figure 34.</b> Présentations de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs du pH et de la température (a), du pH et de la concentration de NaCl (b), et de la température et de la concentration de NaCl (c) sur l'activité de la peroxydase .....	86
<b>Figure 35.</b> Précipitation au sulfate d'ammonium de la peroxydase du navet ( <i>Brassica rapa.L</i> ) .....	88
<b>Figure 36.</b> Purification de l'enzyme TRP à partir de racines de navet blanc d'Algérie <i>Brassica rapa</i> , variété <i>rapa</i> .....	90
<b>Figure 37.</b> Profils d'électrophorèse et HPLC de TRP de racines de navet blanc d'Algérie <i>Brassica rapa</i> , variété <i>rapa</i> . (A) SDS-PAGE 12% d'enzyme TRP.....	92
<b>Figure 38.</b> Spectre FT-IR de peroxydase de navet.....	94
<b>Figure 39.</b> Evaluation du pH et de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme TRP purifiée à partir de racines de navet algérien <i>Brassica rapa</i> , variété <i>rapa</i> .....	97
<b>Figure 40.</b> Evaluation de la température sur l'activité et la stabilité de l'enzyme TRP purifiée à partir de racines de navet algérien <i>Brassica rapa</i> , variété <i>rapa</i> .....	98
<b>Figure 41.</b> Effet du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques (A), en flavonoïdes (B) et en tannins condensées (C) d'extrait du navet blanc .....	101
<b>Figure 42.</b> Effet du solvant d'extraction sur l'activité anti-radicalaire de DPPH (A) et l'activité anti-radicalaire de ABTS (B) sur l'extrait du navet blanc .....	104
<b>Figure 43.</b> Effet du solvant d'extraction sur le pouvoir chélateur l'extrait du navet blanc .	105
<b>Figure 44.</b> Effet du solvant d'extraction sur pouvoir réduction l'extrait de navet blanc.....	106
<b>Figure 45.</b> Effet du solvant d'extraction sur l'inhibition du radical Hydroxyle OH sur l'extrait de navet blanc.....	107
<b>Figure 46.</b> Potentiels antioxydants de TRP des racines de navet blanc ( <i>Brassica rapa.L</i> )	112

<b>Figure 47.</b> Présentations de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs de la concentration de PVA et de la concentration de PLA (a), de la concentration de PVA et de la concentration de peroxydase (b), et de la concentration de PLA et de la concentration de peroxydase (c) sur l'efficacité d'encapsulation .....	116
<b>Figure 48.</b> Images de microscopie électronique en conserve (SEM) de microparticules de PLA chargées d'extraits de protéines de peroxydase de navet.....	118
<b>Figure 49.</b> Distribution de la taille des particules.....	119
<b>Figure 50.</b> Spectres IR de transformée de Fourier de polyacide lactique (PLA), extrait de protéine peroxydase de navet et microcapsules PLA chargées avec extrait de protéine peroxydase de navet .....	120
<b>Figure 51.</b> Analyse thermogravimétrique du PLA pur et des microcapsules.....	121
<b>Figure 52.</b> Distribution granulométrique des particules .....	122
<b>Figure 53.</b> Activité spécifique de la peroxydase d'enzymes brutes et purifiées et d'enzymes encapsulées.....	123
<b>Figure 54.</b> Profils de libération enzymatique in vitro à pH 7,4 (A) et pH 2,5 (B) .....	125
<b>Figure 55.</b> Dégradation cinétique des activités POD d'extrait enzymatique encapsulé et non encapsulé pendant le stockage à différentes températures .....	127

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.</b> Teneur en énergie et en éléments nutritifs de 100 grammes de légumes Brassica comestibles .....	7
<b>Tableau II.</b> Classification des peroxydases par l'IUBMB .....	10
<b>Tableau III.</b> Exemples d'utilisation des polymères synthétiques comme matière enrobante en microencapsulation.....	46
<b>Tableau IV.</b> Classification des techniques d'encapsulation .....	49
<b>Tableau V.</b> Applications de la microencapsulation dans l'industrie .....	51
<b>Tableau VI.</b> Exemples sur l'encapsulation des enzymes.....	52
<b>Tableau VII.</b> Facteurs et niveaux pour la méthodologie de surface de réponse de la matrice de conception de Box-Behnken (en niveaux codés et non codés de trois variables), avec les valeurs de réponse expérimentales (observées) et prédites .....	61
<b>Tableau VIII.</b> Facteurs et niveaux pour la méthodologie RSM de la matrice de conception de Box-Behnken (en niveaux codés et non codés de trois variables), avec les valeurs de réponse expérimentales (observées) et prédites.....	72
<b>Tableau IX.</b> Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion .....	75
<b>Tableau X.</b> Concentrations recommandées d'électrolytes dans liquides simulés (LS, LG, LI), basé sur des données de la digestion humaines in vivo.....	76
<b>Tableau XI.</b> Caractéristiques physico-chimiques du navet blanc .....	80
<b>Tableau XII.</b> Coefficient de régression, erreur standard et résultats du test t de la surface de réponse pour l'activité de la peroxydase .....	84
<b>Tableau XIII.</b> ANOVA pour l'effet de la concentration de NaCl, du pH et de la température sur l'activité de la peroxydase.....	85
<b>Tableau XIV.</b> Etapes de purification de la peroxydase de navet ( <i>Brassica rapa.L</i> ).....	87
<b>Tableau XV.</b> Séquence N-terminale de TRP des racines de navet algérien avec celui des séquences d'autres POD.....	93
<b>Tableau XVI.</b> Effet d'une variété d'inhibiteurs et d'ions métalliques sur le TRP des racines de navet blanc d'Algérie utilisant le gaiacol comme substrat.....	95

<b>Tableau XVII.</b> Effet de certains ions métalliques divalents sur le TRP des racines de navet blanc algérien utilisant le gaiacol.....	96
<b>Tableau XVIII.</b> Paramètres cinétiques de TRP et HRP pour l'hydrolyse du gaiacol, du pyrogallol, du catéchol et de l'anisole comme substrats.....	99
<b>Tableau XIX.</b> Corrélation entre les teneurs en antioxydants et les activités antioxydantes .....	109
<b>Tableau XX.</b> Coefficient de régression, erreur standard et résultats du test t student de la surface de réponse pour l'efficacité de l'encapsulation.....	114
<b>Tableau XXI.</b> ANOVA pour l'effet de PVA, PLA, concentration d'extrait sur l'efficacité d'encapsulation .....	114
<b>Tableau XXII.</b> Activité enzymatique de peroxydase, activités antioxydantes (ABTS, FRAP, OH, PCH) et teneurs en protéines totaux avant et après la digestion gastro-intestinale <i>in vitro</i> .....	132
<b>Tableau XXIII.</b> Coefficients de corrélation entre activités antioxydantes (ABTS, FRAP, OH, PCH) et activité enzymatique de peroxydase, teneurs en protéines totaux .....	132

# **Table des matières**

## Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**Introduction ..... 1**

### Revue bibliographique

**I. Navet (*Brassica rapa.L*) ..... 4**

I.1. Généralités ..... 4

I.2. Description botanique..... 4

I.3. Origine et répartition géographique ..... 5

I.4. Taxonomie et nomenclature..... 5

I.5. Classification botanique..... 6

I.6. Composition du navet ..... 6

I.6.1. Composition chimique ..... 6

I.6.2. Composition phytochimique ..... 7

I.7. Effets thérapeutiques..... 8

**II. Peroxydases..... 8**

II.1. Nomenclature (EC)..... 8

II.2. Historique ..... 9

II.3. Définition..... 9

II.4. Sources et classification..... 9

II.4.1. Classification de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB) ..... 9

II.4.2. Classification de Welinder.....	10
II.5. Peroxydases végétales .....	13
II.5.1 Structure et site actif .....	14
II.5.2 Mécanisme catalytique .....	16
II.5.3. Rôles physiologiques des peroxydases végétales .....	17
II.5.4 Domaines d'applications des peroxydases végétales .....	21
<b>III. Antioxydants et activité antioxydante.....</b>	<b>24</b>
III.1 Radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène .....	24
III.2 Sources des radicaux libres .....	25
III.2.1 Sources endogènes .....	25
III.2.2 Source exogène des ERO .....	27
III.3 Stress oxydatif .....	28
III.4 Conséquences du stress oxydatif .....	28
III.5 Systèmes antioxydants .....	32
III.5.1 Antioxydants endogènes .....	32
III.5.2 Antioxydants exogènes .....	34
<b>IV. Microencapsulation .....</b>	<b>42</b>
IV.1. Définition .....	43
IV.2. Historique.....	43
IV.3. Types de microparticules .....	44
IV.4. Composés des microparticules.....	45
IV.4.1 Matière enrobante .....	46
IV.4.2. Molécules encapsulées.....	47

IV.4.3. Additifs.....	48
IV.5. Techniques d'encapsulation.....	48
IV.6. Domaines d'application de la microencapsulation.....	50
IV.7. Microencapsulation des enzymes.....	51
IV.8. Stabilité des protéines dans des systèmes polymériques particulières.....	52
IV.8.1. Stabilité des protéines durant la formation.....	53
IV.8.2. Stabilité des protéines durant la libération.....	53
IV.8.3. Stabilité des protéines durant le stockage.....	54

## **Matériel et méthodes**

<b>I. Matériel et produits chimiques.....</b>	<b>55</b>
<b>II. Caractérisation et optimisation des conditions réactionnelles de l'extrait du navet blanc.....</b>	<b>56</b>
II.1. Matériel végétal.....	56
II.2. Analyses physico-chimiques.....	56
II.2.1. Humidité.....	56
II.2.2. pH et acidité.....	57
II.2.3. Cendres.....	57
II.2.4. Brix.....	57
II.2.5. Sucres totaux.....	58
II.2.6. Protéines.....	58
<b>II.3. Optimisation des paramètres de dosage de l'activité enzymatique des peroxydases.....</b>	<b>58</b>
II.3.1. Préparation de l'extrait enzymatique.....	58
II.3.2. Effet du pH.....	58

II.3.3. Effet de la température .....	59
II.3.4. Effet de la force ionique .....	59
II.3.5. Détermination de l'activité peroxydase.....	59
II.3.6 Optimisation de l'activité enzymatique avec la méthodologie surface de réponse....	60
<b>II.4. Purification de l'extrait enzymatique du navet .....</b>	<b>62</b>
II.4.1. Préparation d'extrait brut .....	62
II.4.2. Fractionnement au sulfate d'ammonium.....	62
II.4.3. Chromatographie par filtration sur gel .....	62
II.4.4. Chromatographie d'échange d'anions .....	63
II.4.5. Concentration par ultrafiltration .....	63
II.4.6. Détermination de la concentration protéique.....	63
II.4.7. Méthodes analytiques .....	63
<b>II.5. Caractérisation spectrale et physico-chimique des peroxydases des racines du navet (TRP) purifié.....</b>	<b>64</b>
II.5.1. Test spectral .....	64
II.5.2. Analyse par spectroscopie FT-IR .....	64
II.5.3. Effet de la concentration de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	64
II.5.4. Effets de différents inhibiteurs et ions métalliques sur la stabilité de la peroxydase du navet .....	65
II.5.5. Effets de différents pH sur l'activité et la stabilité de la peroxydase du navet .....	65
II.5.6. Effets de différentes températures sur l'activité et la stabilité de la peroxydase du navet .....	65
II.5.7. Mesures cinétiques .....	65

<b>III. Activité antioxydante et la teneur en composés bioactifs .....</b>	<b>66</b>
III.1. Préparation d'extrait .....	66
III.2. Teneurs en composés bioactifs.....	66
III.2.1. Détermination du contenu phénolique total .....	66
III.2.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes .....	66
III.2.3. Détermination de la teneur totale en tanins condensés .....	67
<b>III.3. Evaluation de l'activité antioxydante .....</b>	<b>67</b>
III.3.1. Activité anti-radicalaire DPPH .....	67
III.3.2. Activité anti-radicalaire ABTS .....	68
III.3.3. Pouvoir réducteur .....	<b>68</b>
III.3.4. Pouvoir chélateur des ions ferreux .....	68
III.3.5. Activité anti-radicalaire OH .....	69
III.4. Analyse statistique .....	69
<b>IV. Microencapsulation d'extrait enzymatique de navet.....</b>	<b>70</b>
IV.1. Préparation de microcapsules par double émulsion .....	70
IV.2. Optimisation de taux de l'efficacité d'encapsulation des microcapsules d'extrait enzymatique du navet avec la méthodologie surface de réponse.....	70
IV.3. Caractérisation des microcapsules .....	72
IV.3.1. Calcul de l'efficacité d'encapsulation .....	72
IV.3.2. Analyse de la morphologie des microcapsules .....	72
IV.3.3. Analyse de la taille des particules .....	73
IV.3.4. Humidité des microcapsules .....	73

IV.3.5. Analyse thermogravimétrique .....	73
IV.3.6. Spectroscopie infrarouge de microcapsules .....	73
IV.4. Libération in vitro .....	73
IV.5. Stabilité des microcapsules pendant le stockage.....	74
IV.6. Digestion gastro-intestinale in vitro .....	75

## **Résultats et discussion**

<b>I. Caractérisation de l'extrait enzymatique du navet blanc et optimisation des conditions réactionnelles .....</b>	<b>78</b>
I.1 Paramètres physique-chimiques du navet blanc .....	78
I.1.1 Humidité .....	78
I.1.2 Brix .....	78
I.1.3 pH et acidité .....	78
I.1.4 Cendres .....	79
I.1.5 Sucres totaux .....	79
I.1.6 Protéines.....	80
I.2 Optimisation des paramètres de l'activité enzymatique des peroxydases du navet blanc .....	80
I.2.1 Méthodologie séquentielle .....	80
I.2.1.1 Effet du pH sur l'activité des peroxydases .....	80
I.2.1.2 Effet de La température sur l'activité des peroxydases .....	81
I.2.1.3 Effet de la concentration de NaCl sur l'activité des peroxydases.....	82
I.2.2 Méthodologie RMS utilisant la conception Box-Benhken .....	83
I.2.2.1 Analyse du modèle.....	83

I.2.2.2 Analyse de la surface de réponse .....	85
I.2.2.3 Optimisation de l'activité peroxydase et vérification du modèle prédictif.....	86
I.3 Purification et caractérisation des peroxydases d'extrait du navet blanc .....	87
I.3.1 Précipitation de l'extrait enzymatique avec sulfate d'ammonium.....	88
I.3.2 Chromatographie d'échange d'anions (AEC).....	89
I.3.3 Détermination des poids moléculaires et analyse zymographique de la peroxydase de navet (TRP) .....	91
I.3.4 Détermination de la séquence N-terminale de peroxydase du navet blanc.....	92
I.3.5 Analyse par spectroscopie infrarouge FTIR .....	93
I.3.6 Caractérisations biochimiques et spectrales de peroxydase du navet (TRP) purifiée	94

**II : Activité Antioxydante de l'extrait brut et des fractions enzymatiques du navet blanc**  
..... **99**

II.1 Teneurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins condensés de l'extrait brut du navet .....	100
II.2 Activités antioxydantes d'extrait brut du navet blanc .....	103
II.2.1. Activité anti-radicalaire DPPH et ABTS.....	103
II.2.2 Pouvoir chélateur du fer .....	105
II.2.3 Pouvoir réducteur .....	106
II.2.4 Inhibition de radical Hydroxyle OH .....	107
II.2.5. Corrélations entre les teneurs en antioxydants et les activités antioxydantes .....	108
II.3 Activité antioxydante des fractions enzymatiques du navet blanc .....	109
II.3.1 Activité Anti-radicalaire ABTS.....	109
II.3.2 Pouvoir chélateur du Fer.....	110
II.3.3 Pouvoir réducteur .....	110

II.3.4 Inhibition du radical hydroxyle OH .....	110
<b>III : Microcapsulation d'extrait enzymatique du navet blanc .....</b>	<b>112</b>
III.1. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation .....	113
III.1.1. Analyse du modèle .....	113
III.1.2. Analyse de surface de réponse .....	115
III.1.3. Validation du modèle .....	117
III.2 Caractérisation des microcapsules .....	117
III.2.1. Analyse de la morphologie des microcapsules, de la distribution granulométrique et de l'humidité.....	117
III.2.2. Analyse infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	119
III.2.3. Analyse gravimétrique thermique (TGA) .....	121
III.3. Activité spécifique des peroxydases avant et après encapsulation .....	121
III.4. Libération d'enzymes in vitro .....	123
III.5. Stabilité de l'extrait enzymatique libre et encapsulé pendant le stockage.....	125
III.6. Effet de la digestion in vitro sur le potentiel antioxydant d'extrait enzymatique du navet .....	127
III.6.1. Activité enzymatique et la teneur en protéines totaux .....	127
III.6.2. Activité antioxydante .....	128
III.6.2.1. Activité anti radicalaire ABTS .....	128
III.6.2.2. Pouvoir Chélateur des ions ferriques .....	129
III.6.2.3. Pouvoir réducteur .....	129
III.6.2.4. Activité antiradicalaire de radical OH.....	130
III.6.2.5. Corrélation entre les activités antioxydantes et la teneur en protéines totaux et l'activité enzymatique.....	130
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>133</b>

## **Références bibliographiques**

### **Annexe**

# **Introduction**

## **Introduction**

Le navet (*Brassica rapa*) dispose d'un grand potentiel de valorisation et d'une riche diversité dans le monde. Ses différentes parties végétales présentent des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses grâce aux activités antioxydantes et anti-radicalaire qu'elles renferment. Dans des études récentes, ses métabolites ont montré un fort potentiel anticancéreux (cancer des ovaires, du côlon, de la vessie, du poumon, de la prostate, du sein et de nombreux autres types de cancer) (Kapusta-Duch et al., 2012). Les parties de racines et de feuilles de plusieurs sous-espèces de navet sont principalement utilisées contre différents types de lignées cellulaires cancéreuses et ont montré de fortes activités inhibitrices de la carcinogénèse (Jan et al., 2018). Ce groupe de légumes contient des antioxydants bien connus, tels que les vitamines C, E, des caroténoïdes et des enzymes antioxydantes comme la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydase, que l'on trouve dans les légumes frais (Manchali et al., 2012 ; Singh et al., 2010). Le potentiel anticancéreux des espèces végétales de Brassica est directement lié à la présence de ces substances bioactives. Il minimise le stress oxydatif, induit une réponse immunitaire, réduit le risque de cancer et la malignité, inhibe la mutation et réduit également la prolifération des cellules cancéreuses (Boivin et al., 2009 ; Herr et al., 2010).

Les enzymes antioxydantes sont capables de stabiliser ou de désactiver les radicaux libres avant qu'ils n'attaquent les composants cellulaires. Ils agissent en réduisant l'énergie des radicaux libres grâce à des mécanismes d'oxydoréduction, provoquant ainsi leur stabilité. De plus, ils peuvent également interrompre la réaction d'oxydation en chaîne pour minimiser les dommages causés par les radicaux libres (Krishnamurthy et Wadhvani, 2012).

Une grande partie des molécules antioxydantes sont apportées à l'organisme par prise alimentaire et bien que la digestion soit considérée comme un processus vital pour la vie, car les nutriments libérés par les aliments ingérés sont utilisés par le corps comme source d'énergie pour le maintien et la croissance des cellules (Guerra et al., 2012), lors de la digestion, la biodisponibilité de nombreuses substances naturelles thérapeutiques et nutritionnelles peut être altérée.

Les enzymes antioxydants peuvent également subir les mêmes altérations et perdre leurs multiples effets positifs sur la santé humaine attribués à leurs propriétés antioxydantes. Ces effets dépendent fortement de leur biodisponibilité dans l'organisme. La bioaccessibilité et, par conséquent, la biodisponibilité des enzymes antioxydants dépendent de manière

significative de la structure et de la forme sous lesquelles elles sont introduites dans l'organisme. Par exemple à travers une matrice alimentaire complexe ou sous forme purifiés. D'autre part, les facteurs endogènes incluent la muqueuse gastrique, le temps du transit intestinal, la vitesse de la vidange gastrique, le métabolisme, ce qui influence considérablement leur bioaccessibilité dans l'organisme (Grundy et al., 2016), mais en raison de la complexité des mécanismes par lesquels les enzymes antioxydants agissent dans l'organisme, les processus de portage et de l'effet de l'environnement gastro-intestinal sur l'activité antioxydante enzymatique reste encore faiblement documenté. La digestion gastro-intestinale simulée est l'un des tests *in vitro* couramment utilisés pour l'évaluation préalable de la bioaccessibilité des enzymes antioxydantes et l'encapsulation est une méthode qui peut améliorer la bioaccessibilité et la biodisponibilité car elle assure l'enrobage du composant actif et sa distribution ciblée dans une partie spécifique du tube digestif et sa libération contrôlée (Dias et al., 2017).

Ainsi, il existe des solutions pratiques pour améliorer la biodisponibilité orale des protéines lipophiles et hydrophobes mal absorbés, en utilisant des polymères biodégradables et biocompatibles pour le traitement du cancer (Asghari et al., 2016). Les systèmes des microcapsules contrôlés par voie orale ont réussi à maintenir des taux plasmatiques adéquats et efficaces sur des périodes prolongées en contrôlant la libération de protéine après l'administration orale et réduisent les effets secondaires (Wang et al., 2013). L'immobilisation des enzymes dans une matrice insoluble possède plusieurs avantages par rapport aux enzymes libres, notamment la stabilité et protection de l'enzyme (Danial et Alkhalaf, 2020). Ces avantages ont rendues les enzymes immobilisées hautement utilisable dans une large gamme de biotechnologies en évolution (Spahn et Minteer, 2008).

Dans ce contexte, le travail de thèse que nous avons réalisé vise la valorisation des protéines enzymatiques extraites du navet, et nous nous sommes intéressés aux peroxydases, vu l'intérêt de ce type d'enzymes dans le développement de nouvelles applications (biotechnologiques, pharmaceutique, médical et agroalimentaire). Aussi, notre étude a pour but d'exploiter le potentiel antioxydant protecteur des POD au niveau intestinal (intestin grêle et colon) afin de prévenir et d'atténuer les processus inflammatoires et tumoraux provoqués par les ROS. Afin de parer au risque de dégradation des peroxydases au niveau gastrique, nous avons utilisé le procédé de la microencapsulation en double émulsion afin d'encapsuler les peroxydases dans des particules polymériques, en utilisant l'acide poly lactique (PLA). Ce polymère a été choisi

du fait de sa biodégradabilité, biocompatibilité et ne présente aucun risque sur les tissus gastro-intestinaux.

Ce travail est organisé en trois grandes parties :

- La première partie est une synthèse des données bibliographiques sur le navet, les peroxydases, l'activité antioxydante et la microencapsulation ;
- La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées pour l'analyse physico-chimique, l'optimisation de l'activité enzymatique des peroxydases, la purification et caractérisation des peroxydases, l'évaluation de l'activité antioxydante, l'optimisation des conditions de préparation et de caractérisation des microcapsules et la réalisation de la digestion gastro-intestinale des microcapsules.
- La troisième partie est consacrée aux résultats et à leurs discussions, répondant à :
  - ✓ la caractérisation physico-chimique du navet blanc (humidité, pH, acidité, Brix, cendres, teneurs en sucres et en protéines), et à l'optimisation des conditions de l'activité enzymatique optimale des peroxydases du navet, leur purification et caractérisation ;
  - ✓ l'évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait brut du navet et de celle des fractions enzymatiques des différentes étapes de purification ;
  - ✓ l'optimisation des conditions de préparation des microcapsules et à leur caractérisation, étude de la libération des protéines *in vitro*, stabilité des microcapsules pendant le stockage a différentes températures et enfin de l'effet de la digestion gastro-intestinale *in vitro* sur le potentiel antioxydant d'extraits enzymatiques encapsules et non encapsules.

# **Revue Bibliographique**

## **I. Navet (*Brassica rapa.L*)**

### **I.1. Généralités**

Le navet est une plante d'importance économique, il est cultivé dans le monde entier comme légume. Il appartient au genre *Brassica*, de la famille Brassicaceae. Le genre *Brassica* comprend de nombreuses cultures importantes (Sun Rifei, 2015). Les légumes *Brassica* ou crucifères sont le genre le plus important de la famille des Brassicacées et se composent de 37 espèces différentes (Figure 1) (Sanlier et Saban, 2018). Il est connu dans la médecine traditionnelle pour son utilisation dans la gastrite chronique, la constipation, la cholécystite et dans les maladies du foie. Les racines de navet ont longtemps été utilisées dans la médecine populaire et dans le traitement traditionnel du rhume (Beltagy, 2014).

### **I.2. Description botanique**

Le navet est une plante herbacée bisannuelle cultivée comme légume-racine l'année du semis, pour son hypocotyle tubérisé. La racine est renflée et charnue, très variable dans sa forme : cylindrique, conique, sphérique, piriforme, allongée ou aplatie, et dans sa couleur : jaune pâle, blanche, grise ou noire, bicolore rose-blanc. Elle est quelquefois plus ou moins sucrée, d'autres fois piquante et un peu âcre. La deuxième année de la plante émet une tige florale lisse ramifiée de 80 cm de haut environ. Les feuilles sont entières, oblongues, d'un vert franc et plus ou moins rudes au toucher, les fleurs sont jaunes, les fruits sont des siliques longues et minces, cylindriques, acuminées, contenant chacune de 15 à 25 petites graines sphériques rougeâtres, quelquefois presque noires (Cie et Vilmorin-Andrieux, 1883).

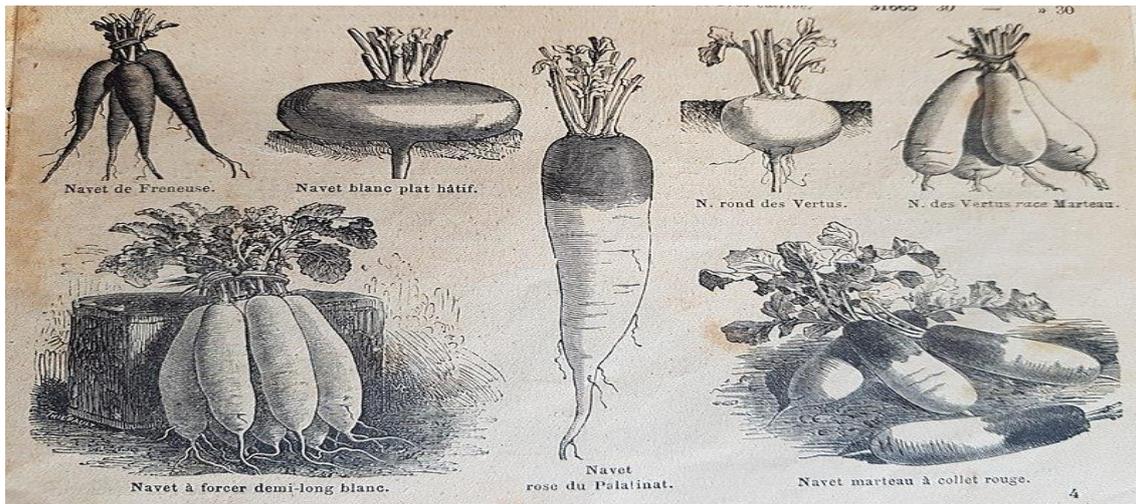


Figure 1. Variétés de navet (Cie et Vilmorin-Andrieux, 1883).

### I.3. Origine et répartition géographique

*Brassica rapa* est présent sur tous les continents, étant plus commun dans les zones tempérées et à des altitudes plus élevées dans les zones subtropicales (Acevedo- Rodríguez et Strong, 2012). Sur la base de recherches linguistiques et historiques, Ignatov et collaborateurs en 2008 suggèrent que *Brassica rapa* a été domestiqué pour la première fois dans la région de l'Asie centrale et occidentale, puis s'est répandu en Europe et en Asie de l'Est à la suite des migrations d'agriculteurs de la région d'Asie centrale et d'Asie mineure (Ignatov et al., (2008). Pour son origine, Dixon suggère que l'espèce est originaire de la région méditerranéenne (Dixon, 2006) et la recherche moléculaire et taxonomique de Guo et collaborateurs soutient la théorie selon laquelle la région méditerranéenne est le centre d'origine de *Brassica rapa*, avec des centres de diversité en Asie de l'Est et le long d'anciennes routes commerciales, et des migrations récentes vers le Nouveau Monde (Guo et al., 2014).

### I.4. Taxonomie et nomenclature

Les Brassicacées, connues sous le nom de famille de la moutarde, sont composées d'environ 3740 espèces appartenant à 325 genres (Koch et al., 2012). Il comprend de nombreuses espèces économiquement importantes, principalement du genre *Brassica*, certaines espèces étant parmi les plus anciennes plantes cultivées (Kiefer et al., 2014). *Brassica* est le plus grand genre de la famille, fournissant des huiles, des légumes et de fourrage (Koch et al., 2018).

*Brassica rapa* présente des niveaux élevés de variation morphologique, avec une longue histoire de reproduction et de sélection (Lou et al., 2007). Certains des morphotypes les plus courants en culture comprennent les graines oléagineuses : *B. rapa subsp. Oleifera* (colza), *B. rapa subsp. Dichotoma* (sarson brun ou toria) et *B. rapa subsp. Trilocularis*, (sarson jaune) ; les légumes-feuilles : *B. rapa subsp. Pekinensis* (chou chinois), *B. rapa subsp. Chinensis* (pakchoi) et *B. rapa subsp. Nipposinica* (mizuna) ; les légumes-racines : *Brassica rapa subsp. Rapa* (navet) (Guo et al., 2014).

### **I.5. Classification botanique**

Le navet est une plante bisannuelle (prenant deux ans pour terminer son cycle de vie) qui est le plus souvent cultivée comme annuelle. La classification scientifique de la plante est *Brassica rapa* ou *Brassica campestris*. *Brassica* est le mot latin pour chou, *rapa* signifie navet et *campestris* fait référence à des champs (Jessica Polidoro, 2008).

La classification botanique du navet est donnée comme suit :

**Règne :** Plantae.

**Domaine :** Eukaryota.

**Sous-embranchement :** Angiospermes

**Classe :** Magnoliopsida.

**Ordre :** Brassicales.

**Famille :** *Brassicaceae*.

**Sous-famille :** Brassicoideae.

**Genre :** *Brassica*.

**Espèce :** *Brassica rapa subsp. rapa*

### **I.6. Composition du navet**

#### **I.6.1. Composition chimique**

Les légumes *Brassica* ont une teneur élevée en vitamines et en minéraux. Les légumes *Brassica* sont riches en vitamines C et E et en caroténoïdes qui ont le potentiel de prévenir et de traiter les maladies malignes et dégénératives (Jahangir et al., 2009). De plus, les produits *Brassica* contiennent une grande quantité de folate qui réduit le risque de maladie vasculaire, de cancer et d'anomalie du tube neural, ils contiennent également un

taux élevé de potassium, un minéral important qui joue un rôle important dans différents processus métaboliques (Kim et Park, 2009).

La teneur en énergie et en éléments nutritifs de 100 grammes de certains légumes Brassica comestibles est indiquée dans le tableau I.

*Tableau I : Teneur en énergie et en éléments nutritifs de 100 grammes de légumes Brassica comestibles (Sanlier et Saban, 2018).*

	<b>Broccoli</b>	<b>Brussels sprouts</b>	<b>Cabbage</b>	<b>Cauliflower</b>	<b>Kale</b>	<b>Navet</b>	<b>Mustard Greens</b>
<b>Eau (g)</b>	89,3	86	92,18	92,07	84,04	91,87	90,7
<b>Energie (Kkal)</b>	34	43	25	25	49	28	27
<b>Protéine (g)</b>	2,82	3,38	1,28	1,92	4,28	1,17	2,86
<b>Lipides (g)</b>	0,37	0,3	0,1	0,28	0,93	0,13	0,42
<b>Glucide (g)</b>	6,64	8,95	5,8	4,97	8,75	6,43	4,67
<b>Fibre (g)</b>	2,6	3,8	2,5	2	3,6	1,8	3,2
<b>Sucre (g)</b>	1,7	2,2	3,2	1,91	2,26	3,8	1,32
<b>Minéraux</b>							
<b>Calcium (mg)</b>	47	42	40	22	150	30	115
<b>Fer (mg)</b>	0,73	1,4	0,47	0,42	1,47	0,3	1,64
<b>Magnesium (mg)</b>	21	23	12	15	47	11	32
<b>Phosphate (mg)</b>	66	69	26	44	92	27	58
<b>Potassium (mg)</b>	316	389	170	299	491	191	384
<b>Sodium (mg)</b>	33	25	18	30	38	67	20
<b>Zinc (mg)</b>	0,41	0,42	0,18	0,27	0,56	0,27	0,25
<b>Selenium (µg)</b>	2,5	1,6	0,3	0,6	0,9	0,7	0,9
<b>Vitamines</b>							
<b>C (mg)</b>	89,2	85	36,6	48,2	120	21	70
<b>Thiamine (mg)</b>	0,071	0,139	0,061	0,05	0,11	0,04	0,08
<b>Riboflavin (mg)</b>	0,117	0,09	0,04	0,06	0,13	0,03	0,11
<b>Niacin (mg)</b>	0,639	0,745	0,234	0,507	1	0,4	0,8
<b>B (mg)</b>	0,175	0,219	0,124	0,184	0,271	0,09	0,18
<b>Folate (µg)</b>	63	61	43	57	141	15	12
<b>A (IU)</b>	623	754	98	0	9990	0	3024
<b>E (mg)</b>	0,78	0,88	0,15	0,08	1,54	0,03	2,01
<b>K (µg)</b>	101,6	177	76	15,5	704,8	0,1	257,5

### **I.6.2. Composition phytochimique**

Les composants du légume Brassica dépendent de nombreux facteurs tels que la diversité, la période de récolte, les conditions de transformation et de cuisson et l'environnement dans lequel ils poussent (Taveira et al., 2009 ; Metz et al., 2014). Ce

groupe végétal contient des antioxydants bien connus tels que les vitamines C et E, des caroténoïdes et des enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydase, que l'on trouve dans les légumes frais (Sanlier et Saban, 2018). De plus, ces légumes contiennent des glucosinolates contenant du soufre, des anthocyanes, des flavonoïdes, des terpènes, du sulfoxyde de S-méthylcystéine, des coumarines et d'autres petits composés, qui sont des métabolites végétaux utiles (Cartea et al., 2010; Padilla et al., 2007; Pierre et al., 2011).

### **I.7. Effets thérapeutiques**

Ils protègent le corps humain contre les ROS qui causent des dommages à l'ADN, la modulation de l'expression des gènes, la modification des bases et l'oxydation des lipides et des protéines corporelles (Villatoro-Pulido et al., 2012; Villatoro-Pulido et al., 2013). Les membres de la famille des Brassicaceae jouent également un rôle important dans l'étiopathologie de nombreuses maladies telles que le vasospasme, l'athérosclérose, les cancers, les crises cardiaques, les accidents vasculaires cérébraux et les lésions hépatiques (Kapusta-Duch et al., 2012).

## **II. Peroxydases**

### **II.1. Nomenclatureur (EC)**

La peroxydase a pour code EC : 1.11.1.7 qui est construit comme suit :

- 1 signifie une oxydoréductase ;
- 1.11 : regroupe les oxydoréductases qui agissent sur les peroxydes comme accepteurs d'électrons ;
- 1.11.1 : implique celles qui utilisent  $H_2O_2$  comme peroxyde ;
- 1.11.1.7 : indique précisément une peroxydase.

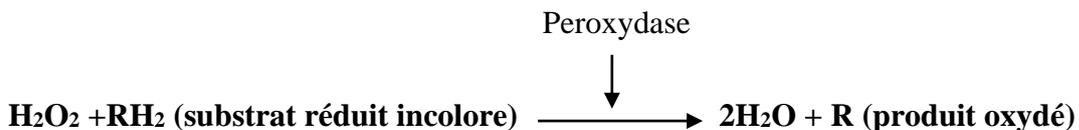
La nomenclatureur EC (EC est le sigle d'enzyme commission) est une classification numérique des enzymes, basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent. La première version de cette classification fut publiée en 1961 et elle est régulièrement remise à jour par l'union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (Delannoy et al., 2013).

## II.2. Historique

Les peroxydases firent partie des premières enzymes étudiées lorsque Schonbein, en 1855, observa l'apparition d'une coloration intense en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), de gaïacol et d'extraits animaux ou végétaux. C'est en 1898 que Linossier introduisit le nom de peroxydase (Linossier, 1898). Depuis, des peroxydases du Raifort (*Armoracia rusticana*), et notamment l'isoforme basique (HRPC), ont servi de base d'étude de ces enzymes chez les plantes, avec notamment la description de la première structure cristalline, la première séquence protéique entière (Welinder, 1979) et l'une des premières séquences nucléotidiques avec celle du Tabac (*Nicotiana tabacum*) (Lagrimini et al., 1987).

## II.3. Définition

Les peroxydases (EC : 1.11.1.7), appelées aussi peroxydase de classe III, catalyse l'oxydation de plusieurs substrats en présence du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) (Nisha Rani et Emilia Abraham, 2006), selon la réaction générale suivante :



## II.4. Sources et classification

Il existe plusieurs classifications des peroxydases établies en fonction du caractère étudié.

### II.4.1. Classification de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB)

Cette classification est basée sur les mécanismes de réactions et les substrats mis en jeu. Selon Linossier (1898) et les recommandations de la commission de nomenclature de l'IUBMB (NC-IUBMB), les peroxydases appartiennent au groupe des oxydoréductases (EC I) utilisant les peroxydes (EC 1.11) et dont elles sont d'ailleurs les seules représentantes (EC 1.11.1). Elles sont subdivisées en treize groupes de EC 1.11.1.1 à EC 1.11.1.14 (Tableau II). Ce sont des protéines à hème, sauf les NADH et NADPH-peroxydases (EC 1.11.1.1 et 2) qui sont des flavoprotéines et les glutathion-peroxydases (EC 1.11.1.9) qui sont des séléno-protéines.

Tableau II : Classification des peroxydases par l'IUBMB (Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire)

Noms	Code	Réaction caractéristique
NADH peroxydase	EC 1.11.1.1	$\text{NADH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NAD} + 2\text{H}_2\text{O}$
NADPH peroxydase	EC 1.11.1.2	$\text{NADPH}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NADP} + 2\text{H}_2\text{O}$
Acide gras peroxydase	EC 1.11.1.3	palmitate + 2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → pentadecanal + CO <sub>2</sub> + 3 H <sub>2</sub> O
Cytochrome-c peroxydase	EC 1.11.1.5	2 ferrocyclochrome c + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → ferricyclochrome c + 2 H <sub>2</sub> O
Catalase	EC 1.11.1.6	2 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → O <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O
Peroxydase	EC 1.11.1.7	substrat + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → substrat oxyde + 2 H <sub>2</sub> O
Iodure peroxydase	EC 1.11.1.8	2 I <sup>-</sup> + 2 H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → I <sub>2</sub> + 2 H <sub>2</sub> O
Glutathion peroxydase	EC 1.11.1.9	2 glutathion + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → glutathion disulfure + 2 H <sub>2</sub> O
Chlorure peroxydase	EC 1.11.1.10	2 RH <sup>+</sup> + 2 Cl <sup>-</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → 2 RCl + 2 H <sub>2</sub> O
L-ascorbate peroxydase	EC 1.11.1.11	L-ascorbate + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → deshydroascorbate + 2 H <sub>2</sub> O
Phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase	EC 1.11.1.12	2 glutathion + hydroperoxyde lipidique → glutathion disulfure + lipide + 2 H <sub>2</sub> O
Manganese peroxydase	EC 1.11.1.13	2 Mn(II) + 2 H <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → 2Mn(III) + 2 H <sub>2</sub> O
Diarylpropane peroxydase	EC 1.11.1.14	1,2-bis-(3,4-dimethoxyphenyl)propane-1,3-diol + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> → veratraldehyde + 1-(3,4-dimethylphenyl)ethane-1,2-diol + 4 H <sub>2</sub> O

#### II.4.2. Classification de Welinder

Sur la base de la présence ou de l'absence d'hème, les peroxydases ont été classées en peroxydases héminiques et non héminiques. Les peroxydases hème ont été attribuées à deux superfamilles, à savoir la superfamille peroxydase-cyclooxygénase (PCOXS) et la superfamille peroxydase-catalase (PCATS). Les peroxydases à hème ferrique exclues les NADH et NADPH peroxydases, les glutathion peroxydases, les peroxydases à deux hèmes, dont la cytochrome c peroxydase (CcP) de *Pseudomonas aeruginosa*, et les haloperoxydases qui catalysent l'halogénéation de composés organiques (Figure 2).

Welinder (1992) distingue ainsi trois superfamilles :

- les peroxydases animales comprenant les peroxydases à halogènes et les prostaglandine synthases ;

- les catalases ;

- les peroxydases végétales.

• **Classe I**

Elle contient les peroxydases d'origine procaryotique dont la cytochrome c peroxydase (CcP) de *Saccharomyces cerevisiae*, les ascorbate peroxydases (AsP) et les catalase-peroxydases (CaP) bactériennes. Ce sont toutes des peroxydases intracellulaires, non glycosylées, sans calcium ni pont disulfure. La CcP est une protéine soluble de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie ou elle doit servir à la détoxification des peroxydes (Zamocky et al., 2000; Faguy et Doolittle, 2000).

• **Classe II**

Elle contient les peroxydases secrétées par les champignons. Leur structure ressemble beaucoup à celle des peroxydases de classe III avec la présence de sites de glycosylation (Kjalke et al., 1992), de ponts disulfures, de deux molécules de calcium (Kunishima et al., 1994) et d'un peptide signal. Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine sont présentes chez un grand nombre de champignons notamment les basidiomycètes (Varela et al., 2000). Elles sont en général induites dans des conditions de carence nutritive pour le champignon, même s'il existe de nombreuses exceptions (Cullen, 1997). Les peroxydases de la classe II sont organisées en deux types (Conesa et al., 2002) :

- les lignine-peroxydases (LiP), qui oxydent un grand nombre de composés aromatiques non phénoliques dérivés de la lignine ; le substrat type des LiP est le veratrol fongique qui interviendrait dans le mécanisme de réaction soit en protégeant l'enzyme contre l'inactivation par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Valli et al., 1990), soit en servant d'intermédiaire d'oxydoréduction entre l'enzyme et les substrats (Chung et Aust, 1995 ; Khindaria et al., 1996);

- les peroxydases a manganèse, qui oxydent la lignine et les composés phénoliques qui en dérivent via l'oxydation du  $Mn^{2+}$  en  $Mn^{3+}$  qui sert d'intermédiaire d'oxydoréduction (Glenn et al., 1986).

- **Classe III**

Les peroxydases de classe III (EC. 1.11.1.7) sont des enzymes végétales multifonctionnelles sécrétoires qui catalysent l'oxydation de divers substrats par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ils présentent une remarquable diversité d'isoenzymes, sont codés par un grand nombre de gènes paralogues et sont impliqués dans un large éventail de processus métaboliques tout au long de la croissance et du développement des plantes (Tongoli et al., 2002). Ils sont impliqués dans la réticulation et le relâchement de la paroi cellulaire, la lignification et la subérisation, le catabolisme de l'auxine et le métabolisme secondaire. En raison de leur capacité à contrôler les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), les POX sont des composants efficaces du système antioxydant induit en réponse à un stress environnemental, tel que l'attaque d'agents pathogènes, l'excès de métal, la salinité, la sécheresse et une intensité lumineuse élevée. En plus de la fonction peroxydante, les POX peuvent catalyser la production de  $H_2O_2$  dans le cycle oxydatif. Les peroxydases sont responsables soit de l'élongation cellulaire, soit du raidissement de la paroi cellulaire, affectant l'allocation du carbone, le niveau d'auxine et l'homéostasie redox, ce qui implique leur rôle clé dans la régulation de la croissance et de la défense en condition de stress (Veljović Jovanović et al., 2018).

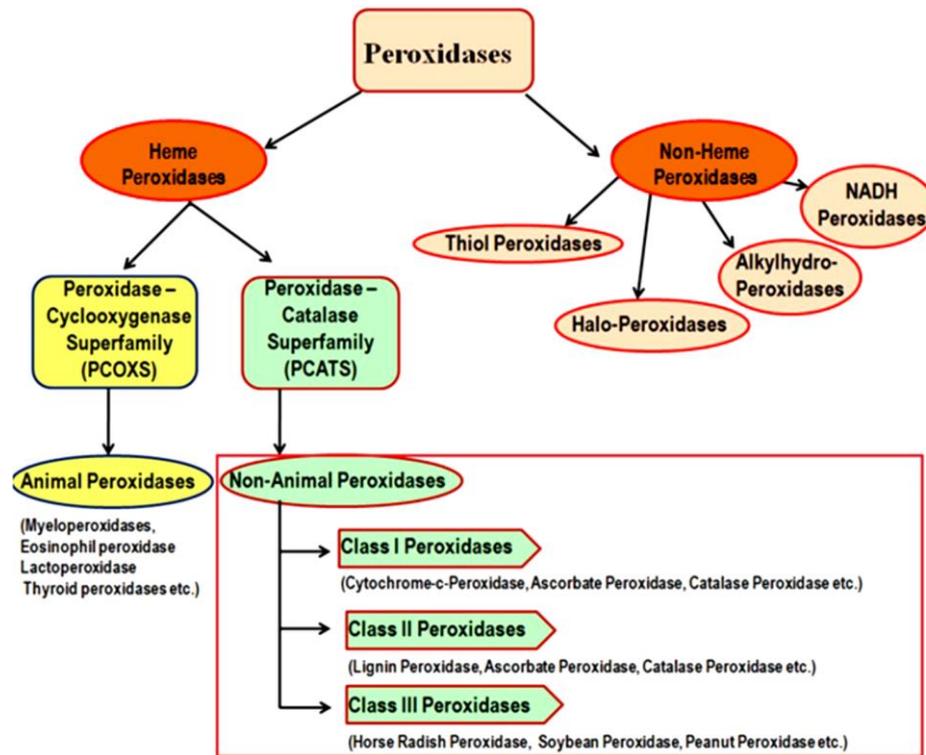


Figure 2. Représentation schématique de la classification des peroxydases (Veda et al., 2017).

## II.5. Peroxydases végétales

Les plantes supérieures contiennent au moins quatre types de peroxydases : la glutathion peroxydase (EC1.11.1.9), la catalase (EC 1.11.1.7), l'ascorbate peroxydase (EC1.11.1.11, peroxydase de classe I) et les peroxydases végétales sécrétoires classiques (EC 1.11 .17, peroxydase de classe III) (Hiraga et al., 2001). Les peroxydases sont des hèmes oxydoréductases spécifiques à la plante qui sont composées de 300 résidus d'acides aminés. Ils sont codés par un grand nombre de gènes. Par exemple, 73 gènes chez *Arabidopsis thaliana* (Tognolli et al., 2002), 138 gènes chez *Oryza sativa* (Passardi et al., 2004) et 93 gènes chez *Populus trichocarpa* (Ren et al., 2014), ce qui implique que les peroxydases possèdent un large éventail de fonctions, et il y a une relation particulière entre la fonction spécialisée et la propriété catalytique (Shigeto et Tsutsumi, 2015).

## II.5.1. Structure et site actif

### a. Structure

Les peroxydases végétales sont comme la catalase, des hémoprotéines et de ce fait, leur structure est proche de celle de l'hémoglobine du cytochrome c. L'apoenzyme est une glycoprotéine liée d'une façon non covalente au groupe prosthétique (hème) lequel est caractérisé par la présence d'un ion ferrique au centre d'une porphyrine (Figure 3) (Smulevich et al., 2006). Elle présente deux liaisons de  $Ca^{2+}$  qui interviennent dans l'activation de la sécrétion enzymatique et exercent sur la protéine repliée, un effet stabilisateur (Szigeti et al 2008).

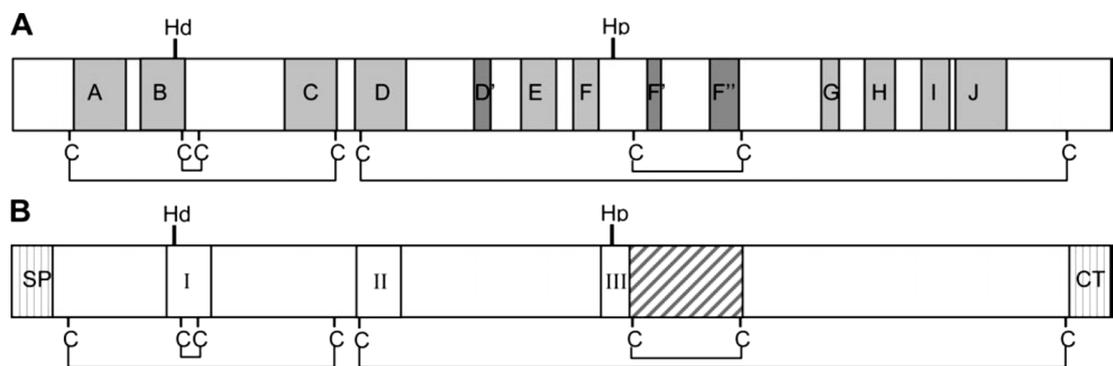


Figure 3. Schéma de la structure générale des peroxydases des plantes (Gajhede et al., 1997)

La structure de l'enzyme est en grande partie hélicoïdale  $\alpha$  bien qu'il existe également une petite région de feuille  $\beta$  (Figure 4). Il existe deux domaines, le distal et le proximal, entre lesquels se trouve le groupe hème. Ces domaines sont probablement issus de la duplication de gènes, une proposition soutenue par leurs sites communs de liaison au calcium et d'autres éléments structurels. L'intégrité globale de la structure dans cette région est maintenue par la liaison disulfure de Cys177 à Cys209 (Figure 4). Ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de la HRP C est la localisation des résidus dans l'hélice qui sont impliqués dans l'accès au substrat et la liaison. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette région structurale est importante pour la stabilisation ou la rétention des espèces radicalaires produites dans les réactions catalysées par les peroxydases végétales (veitch , 2004 ).

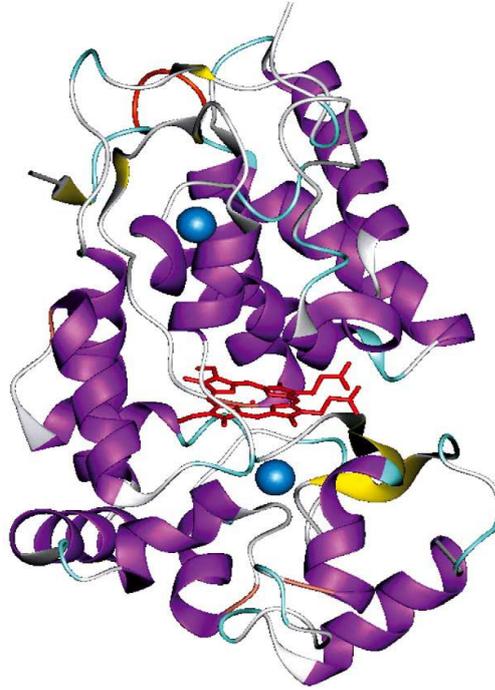


Figure 4. Représentation tridimensionnelle de la structure de la peroxydase de raifort (Veitch, 2004).

#### **b. Site actif et acides aminés impliqués dans la catalyse**

Le site de coordination axiale (du côté dit distal du plan hémique) est inoccupé au repos de l'enzyme mais disponible pour le peroxyde d'hydrogène pendant le renouvellement de l'enzyme (Howes et al., 2001).

De petites molécules telles que le monoxyde de carbone, le cyanure, le fluorure et l'azide se lient à l'atome de fer hémique au niveau de ce site distal, donnant des complexes de peroxydase à six coordonnées. Certains se lient uniquement sous leurs formes protonées, qui sont stabilisées par des interactions liées à l'hydrogène avec les chaînes latérales d'acides aminés de la poche hémique distale de l'Arg38 (l'arginine distale) et de l'His42 (l'histidine distale) (Figure 5) (Haschke et Friedhoff, 1978). Les deux sites de liaison du calcium sont situés à des positions distales et proximales du plan hème et sont liés à la région de liaison à l'hème par un réseau de liaisons hydrogène. Chaque site de calcium a sept coordonnées avec des ligands donneurs d'oxygène fournis par une combinaison de carboxylates de chaîne latérale d'acides aminés (Asp), de groupes hydroxyle (Ser, Thr), de squelettes carbonyles et d'une molécule d'eau structurale (site distal uniquement). La perte de calcium entraîne une diminution à la fois de l'activité enzymatique et de la stabilité

thermique et des modifications subtiles de l'environnement hémique qui peuvent être détectées par spectroscopie (Veitch, 2004)

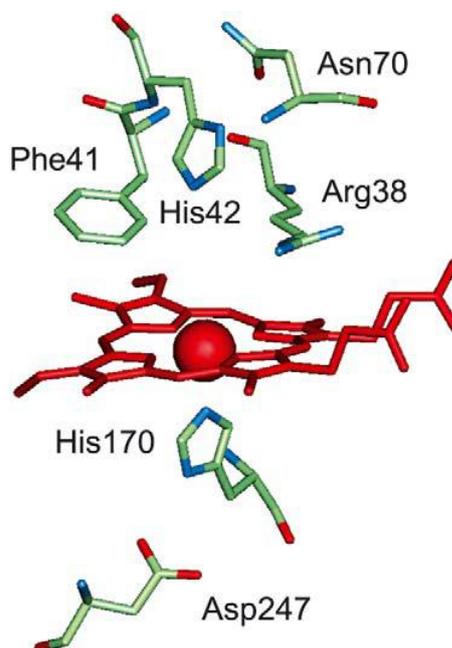


Figure 5. Résidus d'acides aminés clés dans la région de liaison à l'hème de HRP-C (Veitch, 2004).

### II.5.2. Mécanisme catalytique

La première étape du cycle catalytique est la réaction entre  $H_2O_2$  et l'état de repos Fe (III) de l'enzyme pour générer le composé I, un intermédiaire à haut état d'oxydation comprenant un centre oxoferryle Fe (IV) et un radical cationique à base de porphyrine. Un intermédiaire transitoire formé avant le composé I a été détecté dans des réactions entre HRP C et  $H_2O_2$  et décrit comme un complexe Fe (III) -hydroperoxy. Des simulations de dynamique moléculaire de ces complexes liés au peroxyde ont été réalisées (Figure 6) (Filizola et Loew, 2000).

La deuxième étape de réduction à un électron nécessite la participation d'un substrat réducteur et conduit à la génération du composé II, une espèce oxoferryle Fe (IV) qui est un équivalent oxydant au-dessus de l'état de repos. Le composé I et le composé II sont tous deux de puissants oxydants. La deuxième étape de réduction à un électron ramène le composé II à l'état de repos de l'enzyme (Dunford, 1999). La réaction d'un excès de peroxyde d'hydrogène avec une enzyme à l'état de repos donne le composé III, qui peut

également être préparé par plusieurs autres voies. Cet intermédiaire est mieux décrit comme un hybride de résonance de complexes fer (III) -superoxyde et fer (II) -dioxygène (Berglund et al., 2002).

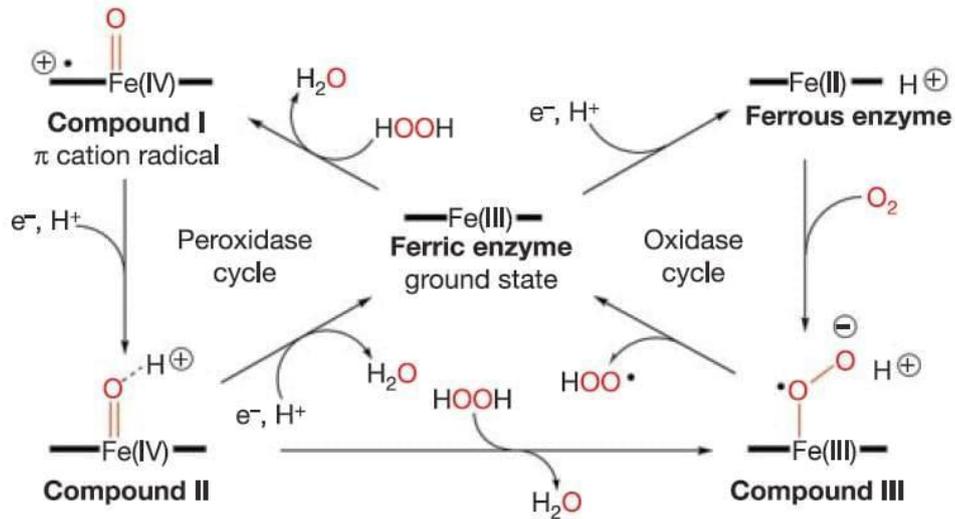


Figure 6. Réactions catalysées par la peroxydase (Berglund et al., 2002).

### II.5.3. Rôles physiologiques des peroxydases végétales

Les peroxydases végétales de classe III jouent diverses fonctions dans le cycle de vie des plantes telles que le métabolisme de la paroi cellulaire, la lignification, la subérisation, le métabolisme ROS, la cicatrisation des plaies, la croissance et la maturation des fruits, la germination des graines, etc. (Passardi et al., 2005). Une représentation schématique des diverses fonctions des peroxydases de classe III est présentée à la figure 7.

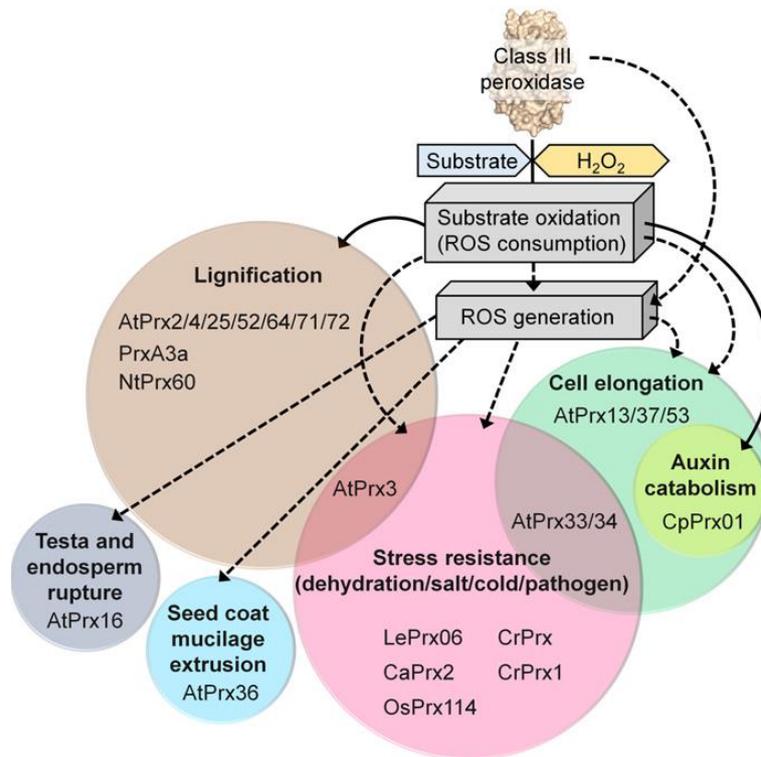


Figure 7. Représentation schématique des différents rôles des peroxydases végétales (Shigeto et Tsutsumi, 2015).

### ➤ Défense des plantes contre les infections pathogènes

Parmi les protéines induites lors de la défense végétale, les peroxydases végétales de classe III sont bien connues et jouent un rôle dans le renforcement des barrières physiques de la paroi cellulaire comprenant la lignine, la subérine, les polysaccharides feruloylés et les glycoprotéines riches en hydroxyproline (Hammerschdidt et Kuc, 1982).

La lignification se produit pendant la croissance normale et les réponses de défense chez les plantes est l'une des fonctions classiques attribuées aux peroxydases de classe III (El Mansouri et al., 1999). La subérisation joue un rôle dans les réponses défensives contre l'entrée de micro-organismes pathogènes par une partie blessée en développant une barrière physique, cela protège les tissus de la perte d'eau et de l'invasion d'agents pathogènes (Quiroga et al., 2000; Espelie et al., 1986).

La lignification et la subérisation sont des processus terminaux de cellules végétales déterminées et hautement différenciées capables de former des parois cellulaires secondaires.

Les peroxydases de la paroi cellulaire polymérisent l'acide hydroxycinnamique et leurs dérivés en les convertissant en radicaux phénoxy qui sont après déposé sur la surface extracellulaire. L'accumulation de ces polymères renforce la paroi cellulaire, limitant ainsi l'expansion cellulaire et l'invasion d'agents pathogènes, et confère une résistance structurelle au corps végétal, ce qui est particulièrement important pour les arbres et la construction de vaisseaux à xylème (Veda et al., 2017).

#### ➤ **Cicatrisation des Blessures**

Les plantes réagissent aux blessures en activant des systèmes d'autodéfense pour restaurer les tissus endommagés ou pour se défendre contre les attaques d'agents pathogènes et d'herbivores. Parmi le grand nombre de protéines inductibles par les plaies, il a été démontré que les peroxydases s'exprime lors de blessures mécaniques dans diverses plantes, notamment le tabac (Lagrimini et Rothstein, 1987; Higara et al., 2000), la tomate (Roberts et al., 1988), la pomme de terre (Roberts et al., 1988), le concombre (Svalheim et Robertsen, 1990), le haricot azuki (Ishige et al., 1993), riz (Higara et al., 2000) et raifort (Kawaoka et al., 1994).

#### ➤ **Métabolisme des espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont des formes partiellement réduites de l'oxygène atmosphérique ( $O_2$ ) et produites par l'excitation de l'oxygène pour former un oxygène singulet ( $O_2^-$ ) ou du transfert d'électrons à  $O_2$ , pour former un radical superoxyde dans le cas de un électron; peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) si deux électrons sont transférés; ou un radical hydroxyle ( $OH^-$ ) lorsque trois électrons ont été transférés à l'oxygène. Ces espèces réduites d'oxygène sont très réactives et sont capables d'oxyder divers composants cellulaires conduisant aux dommages oxydatifs de la cellule végétale associés à la peroxydation des lipides membranaires, à l'oxydation des protéines, à l'inhibition enzymatique et aux dommages à l'ADN qui conduisent finalement à la mort cellulaire programmée. (PCD) (Mittler, 2002).

Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les catalases à cofacteur fer, présentes dans les hématies et les peroxysomes hépatiques, et les glutathions peroxydases à cofacteur sélénium. Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol dans le plasma, au niveau de la membrane cellulaire, et une isoenzyme est spécifique des cellules digestives. Ces enzymes sont sans doute le principal système de protection car elles détruisent non seulement H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mais aussi les peroxydes organiques toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol (Blokhina et al., 2003).

### ➤ **Catabolisme auxine**

Les peroxydases jouent un rôle important dans le catabolisme de l'auxine par la carboxylation oxydative de l'acide indole-3-acétique (IAA) (Normanly, 1997). L'IAA, l'un des régulateurs de croissance des plantes les plus étudiés, se trouve dans toute la plante, mais est aux concentrations les plus élevées dans les régions apicales et méristématiques. L'auxine affecte le développement de la plante par la dominance apicale, l'élongation cellulaire, la formation d'éthylène et la formation de racines adventives. Les peroxydases végétales sont impliquées dans l'oxydation de l'auxine soit par la voie conventionnelle dépendante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soit par une voie indépendante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et dépendante de l'O<sub>2</sub>. En tant qu'oxygénases IAA spécifiques, les peroxydases ont des domaines, similaires aux protéines de liaison à l'auxine, qui manquent dans les peroxydases non végétales (Gazaryan et al., 1996).

### ➤ **Tolérance au stress**

Les peroxydases sont considérées comme l'un des indicateurs de stress des plantes car leur niveau augmente considérablement après la stimulation par le stress. La lignification se produit également en raison des réponses au stress (Jansen et al., 2001). Le rôle des peroxydases et d'autres enzymes antioxydantes sur le stress thermique a été documenté par divers chercheurs. Larkindale et Huang ont démontré que le niveau d'expression des peroxydases et de la superoxyde dismutase augmentait, tandis que celui de la catalase diminuait après le traitement thermique des plantes (Larkindale et Huang, 2004). En général, une augmentation de l'expression de la peroxydase en réponse à diverses expositions à des métaux, pourrait être une sorte de réponse défensive pour piéger le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> généré en raison de la toxicité des métaux (Prasad et al., 1999).

#### **II.5.4. Domaines d'applications des peroxydases végétales**

Les peroxydases sont importantes du point de vue de leurs applications industrielles en raison de leur capacité à catalyser la réaction d'oxydoréduction d'une large gamme de substrats phénoliques ainsi que non phénoliques en présence de peroxyde d'hydrogène. Un certain nombre d'applications industrielles des peroxydases ont été rapportées dans le domaine de l'agriculture, de l'analyse, de l'environnement, des secteurs médicaux, etc (Sergeyeva et al., 1999; Adams,1997). Dans ce qui suit, sont décrites les plus importants types d'applications des POD :

##### **➤ Application comme biocapteur**

Les biocapteurs ont une importance capitale dans la médecine et le contrôle de la qualité des aliments. Les biocapteurs à base d'enzymes présentent des avantages par rapport aux autres techniques analytiques en terme de sélectivité et de sensibilité. Les performances de ces biocapteurs dépendent de la quantité et de la bio-activité de l'enzyme immobilisée sur les électrodes (Jia et al., 2002). La peroxydase de raifort a été largement utilisée dans le développement de biocapteurs (Zang et al., 2004). Les biocapteurs potentiométriques sont développés en combinant une enzyme, par exemple la peroxydase, et un transducteur qui peut détecter la variation des protons. Le glucose, le maltose ou le lactate seraient détectés par un biocapteur à base de peroxydase en utilisant des méthodes potentiométriques (Pisoschi, 2016). Des biocapteurs à base de HRP pour la surveillance des antioxydants ont été appliqués à la détection du radical superoxyde (Pastor et al., 2004), de l'oxyde nitrique (Casero et al., 2000), du glutathion (Mao et Yamamoto,2000), de l'acide urique (Akyilmaz et al., 2003) et des composés phénoliques (Imabayashi et al., 2001), d'autres peroxydases végétales telles que la patate douce, le tabac, l'arachide, le soja, etc. ont également été explorées pour leurs applications en tant que biocapteurs (Lindgren et al., 2000).

##### **➤ Application dans les kits d'analyse et de diagnostic**

Les peroxydases sont largement utilisées dans le développement de kits analytiques et diagnostiques. Parmi elles, les peroxydases de raifort sont les plus couramment utilisées à des fins analytiques (Veitch,2004). Cependant, d'autres peroxydases végétales ayant une grande stabilité de pH et de température émergent comme alternative à la HRP. De plus,

les peroxydases ont la capacité de générer des produits chromogènes stables, Ainsi, ce sont des enzymes candidate et appropriées pour la fabrication de divers kits de diagnostic basés sur la technologie des anticorps conjugués aux enzymes (Agostini et al., 2002).

Des kits de détection d'acide urique ont été développés en utilisant des peroxydases de racine de navet (Agostini et al., 2002). Les peroxydases ont également été exploitées pour développer des kits de détection du cholestérol qui aident à la quantification et à la surveillance du cholestérol sérique humain (Folkes et al., 2002). Dans les secteurs biomédicaux, pour le traitement du cancer, la thérapie enzymatique/promédicament dirigée par gène (GDEPT) a été largement utilisée et avec succès. Ce système enzyme-promédicament s'est avéré efficace contre les cellules tumorales hypoxiques et anoxiques et peut également être utilisé dans d'autres stratégies anticancéreuses (Melton et Sherwood, 1996).

#### ➤ **Application Industrielle dans la décoloration**

Des enzymes telles que les lignine peroxydases (LiPs) et les manganèse peroxydases (MnPs), sont utilisées dans la décoloration des colorants azoïques synthétiques tels que l'orange II et autres (Chivukula et al., 1995). La peroxydase de raifort (HRP) dégrade le phénol et les phénols substitués via un mécanisme de polymérisation radicalaire et peut être efficace pour dégrader et précipiter des colorants azoïques industriels importants (Tatsumi et al., 1996; Bhunia et al., 2001). Les peroxydases se sont avérées avoir un grand potentiel dans le processus de décoloration pour réduire les résidus de polluants de l'industrie textile (Maciel et al., 2007; Hsain, 2006). Des utilisations de peroxydases, telles que le raifort, le navet, la tomate, la courge amère, le soja, pour dégrader et détoxifier les hydrocarbures polyaromatiques, les biphényles polychlorés et d'autres colorants industriels synthétiques ont été signalées (Baldrian et Snajdr, 2006; Nicell et al., 1992).

#### ➤ **Application en bioremédiation**

Les composés aromatiques tels que les phénols et ses dérivés constituent une classe majeure de polluants dans les eaux usées d'un certain nombre d'industries alimentaires et chimiques (Karam et Nicell, 1997). Les phénols sont connus pour être des molécules toxiques et dangereux qui peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire. Étant hautement toxiques. La polymérisation à l'aide d'enzymes redox est l'une des méthodes d'élimination

du phénol. Le traitement enzymatique offre un haut degré de spécificité, un fonctionnement dans des conditions douces et une vitesse de réaction élevée (Wagner et Nicell, 2001). La capacité des peroxydases à catalyser la formation de radicaux libres à partir de divers polluants aromatiques et leur polymérisation peut être potentiellement exploitée dans la biorestauration et le traitement des eaux usées. Ainsi, des peroxydases ont été utilisées pour l'élimination des composés phénoliques des effluents en système modélisé et également des effluents industriels réels (Wagner et Nicell, 2002; Bewtra et al., 1995).

### ➤ **Applications analytiques**

Le test ELISA est développé pour détecter des antigènes ou des anticorps en produisant un signal mesurable tel que les changements de couleur catalysés par la peroxydase. Dans ces dosages, un anticorps lié à une enzyme spécifique de l'antigène est nécessaire avec un substrat chromogène, cette réaction donne un produit coloré en présence de l'enzyme et la couleur du produit est proportionnelle à la quantité d'antigène/anticorps d'intérêt. Pour ce type de dosages, les HRP sont les enzymes les plus couramment utilisées liées à un anticorps. Elles sont utilisées en combinaison avec les anticorps monoclonaux contre les mycotoxines dangereuses de diverses espèces fongiques comme *Aspergillus*, *Penicillium*, etc. (Clark et al., 1993; Kawatsu et al., 2002).

La détection d'ADN à l'aide de sondes ADN complémentaires est importante dans le diagnostic et la recherche. Les sondes d'ADN non radioactives associées aux peroxydases, comme la HRP, sont devenues plus sûres par rapport aux sondes radioactives (Vianelle et al., 2000). Il a été rapporté que les peroxydases conviennent pour les analyses de microréseaux car elles catalysent un grand nombre de réactions de transfert d'électrons avec des substrats naturels et synthétiques. Il peut être utilisé soit directement immobilisé sur le microréseau (Van Gijlswijk et al., 2002), soit comme agent de marquage d'acides nucléiques, d'anticorps et d'autres protéines (Yakovleva et al, 2002; Moody et al., 2001). Les puces (biopuces) à base de HRP ou associées ont été utilisées dans diverses applications telles que l'analyse d'expression, la recombinaison et la cartographie génique et l'analyse de mutation, etc. (Curey Theodore et al., 2002; Huttermann et al., 2001).

### ➤ Application en synthèse et greffage de polymères organiques

L'importance des hème peroxydases dans la chimie des polymères est basée sur leur capacité à oxyder une variété de molécules phénoliques générant ainsi des espèces réactives (radicaux phénoxy) qui fournissent des sites pour la réticulation conduisant à des réactions de polymérisation. L'application par greffage de la peroxydase est l'une des applications industrielles importantes des hème peroxydases. Les radicaux libres générés par les réactions catalysées par les peroxydases peuvent induire la formation d'autres nouveaux polymères fonctionnels tels que les résines phénoliques (Gross et al., 2001; Van Deurzen et al., 1997). La polymérisation catalysée par la peroxydase de phénols et d'anilines substitués et non substitués a également été rapportée comme une alternative meilleure à la méthode de polymérisation chimique (formaldéhyde) (Wright et Nicell, 1999; Sottomayor et al., 1998). Les peroxydases catalysent également les réactions stéréospécifiques de transfert d'oxygène telles que les oxydations d'hétéroatomes, l'oxydation des liaisons C-H dans les composés allyliques/benzyliques, les alcools et les indoles qui donnent divers composés synthétiques d'importance (Eker et al., 2009).

## III. Antioxydants et activité antioxydante

### III.1. Radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène

Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme. Ils possédants un ou plusieurs électrons célibataires, ce qui les rend très instables tels l'anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et le radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote  $NO^{\cdot}$ . Ils sont principalement synthétisés dans la cellule lors de réactions avec l'oxygène. Cette instabilité chimique fait que ces substances sont très réactives et certaines des réactions avec des structures de la cellule entraînent des dégâts en leur sein (Ré et al, 2005). D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, non radicalaires dont la toxicité est importante comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le nitroperoxyde ( $ONOOH$ ). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (figure 8) (Favier, 2003).

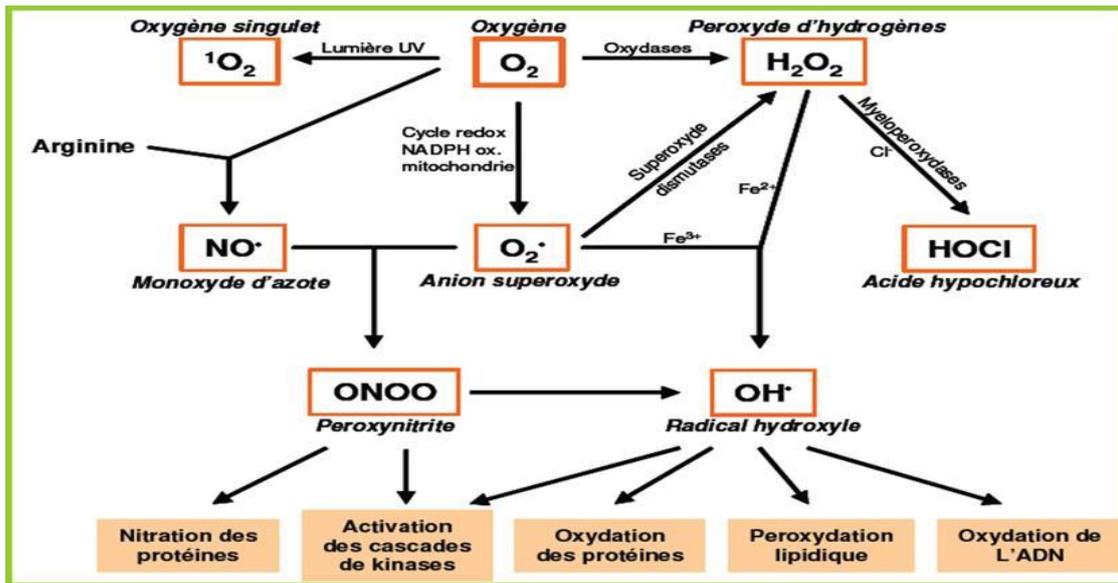


Figure 8. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie (Favier, 2003).

On peut distinguer les radicaux primaires, qui ont un rôle physiologique particulier et les radicaux secondaires, issus de la réaction des radicaux primaires avec des entités biochimiques cellulaires (lipides, protéines, glucides...).

## III.2. Sources des radicaux libres

### III.2.1. Sources endogènes

#### a. Mitochondrie

La mitochondrie est considérée comme la source majeure de production cellulaire de radicaux libres. Dans une cellule à l'état de repos, 2 à 6 % des électrons transportés au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale vont aboutir à la production d'anions superoxydes à partir des complexes I et III de la chaîne respiratoire (Carrière et al., 2006). Malgré l'efficacité de la chaîne respiratoire à transférer les électrons, l'environnement intramitochondrial hautement réducteur et la nature des réactions redox catalysées font que divers composants contenant des flavoprotéines, des centres fer-soufre et l'ubisemiquinone sont thermodynamiquement capables de transférer un seul électron à une molécule d'oxygène et ainsi être des sites de production de radicaux libres de l'oxygène (RLO). Ainsi, les RLO (anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$  et peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ ) sont des sous-produits toxiques de la respiration (Nouette-Gaulain et al., 2007).

## b. Xanthine oxydase

La xanthine oxydase est une métalloenzyme à molybdène, et elle provient de l'oxydation et/ou de la conversion protéolytique de la xanthine déhydrogénase . Elle catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (Coa et al., 2010) (Figure 9).

La xanthine oxydase est exprimée dans les cellules vasculaires et elle peut circuler dans le plasma et se lier à la matrice extracellulaire des cellules endothéliales. Cette enzyme catalyse le métabolisme de la NADH, de l'oxygène moléculaire, de l'hypoxanthine et de la xanthine pour produire de l' $O_2^-$  et du  $H_2O_2$  (Lobus et al., 2009).

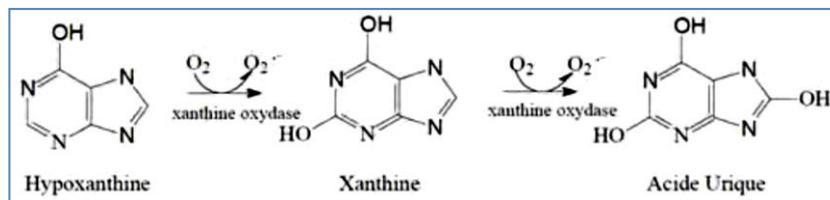


Figure 9. Processus enzymatique catalysé la Xanthine oxydase (Coa et al., 2010).

## c. NADPH oxydase

Les composants du NADPH sont dormants dans les cellules au repos et sont activés en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires, à la présence de microbes, à la phagocytose et / ou à l'activation de récepteurs de reconnaissance de formes (PRR). (Moffarts et al., 2005).

Au sein du phagosome, l'activation de la NADPH oxydase va donner lieu à la production de l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) qui sera dismuté ( $H_2O_2$ ) grâce à l'action des superoxydes dismutases (SOD), le peroxyde d'hydrogène en présence de l'ion ferreux va former le radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) (Figure 10). De plus les phagocytes possèdent des granulations qui libérant la myeloperoxydase et en présence de chlore et de l'anion superoxyde cette enzyme catalyser la formation de l'acide hypochloreux HOCL qui a un rôle important dans l'immunité car il est toxique pour toute une série de microorganismes (bactéries, champignons, virus, protozoaires...). Son activité bactéricide comprend une étape de fixation sur la membrane bactérienne en de nombreux points pour détruire les structures

polysaccharidiques résistantes aux enzymes protéasiques et hydrolytiques (Nguyen et al., 2017).

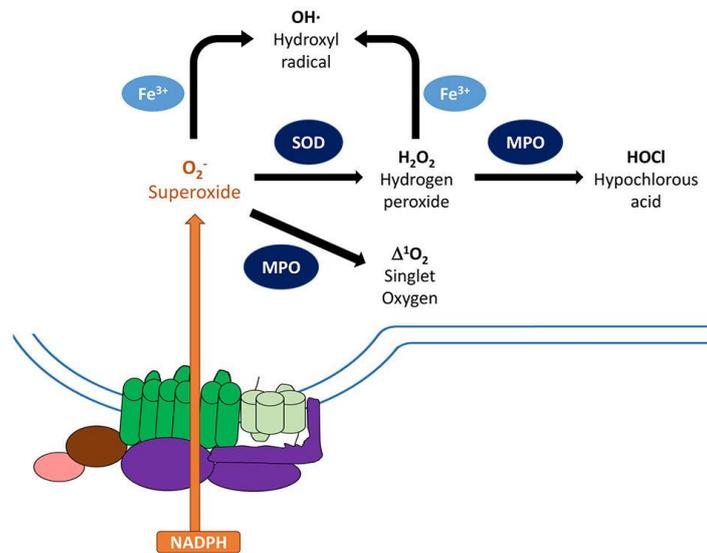


Figure 10. NADPH oxydase catalyse le transfert d'électrons du NADPH vers des anions superoxyde (Nguyen et al., 2017).

#### d. Auto-oxydation des catécholamines

L'auto-oxydation de petites molécules telles que la dopamine, l'épinéphrine, les flavines et les hydroquinones peut être une source importante de production intracellulaire de ROS. Dans la plupart des cas, le produit direct de ces réactions d'auto-oxydation est O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Bien qu'il n'y ait pas de rôle connu pour l'auto-oxydation des petites molécules dans la signalisation des facteurs de croissance et / ou des cytokines, ces réactions peuvent induire un stress oxydatif et modifier l'état redox cellulaire global. Il est suggéré que les effets prooxydants de l'auto-oxydation de la dopamine pourraient être impliqués dans l'apoptose induite par la dopamine qui est impliquée dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Thannickal et Fanburg, 2000).

### III.2.2. Sources exogènes des ERO

Les sources exogènes des ERO sont surtout d'origine physique et chimique : les intoxications aux métaux lourds (cadmium, mercure, arsenic) ou dans les phénomènes d'irradiations provoquant des dommages au niveau de l'ADN, la carence en antioxydants apportés par l'alimentation ou anomalies génétiques et les cytokines pro-inflammatoires.

Par ailleurs des agents environnementaux, la pollution, le tabagisme, une consommation excessive d'alcool ou même certains médicaments (xénobiotiques) peuvent être source de radicaux libres, l'expositions immodérée au soleil ou à des radiations sans protection suffisante (Migdal et Serres, 2011 ; Islam et al., 2019).

### **III.3 Stress oxydatif**

Le stress oxydatif survient lorsque l'équilibre entre les antioxydants et les ERO est perturbé en raison de l'épuisement des antioxydants ou de l'accumulation de ERO. Lorsqu'un stress oxydatif survient, les cellules tentent de contrer les effets oxydants et de restaurer l'équilibre redox par l'activation ou la mise au silence de gènes codant pour des enzymes défensives, des facteurs de transcription et des protéines structurelles (Scandalios, 2005). Le stress oxydant est largement implique dans le vieillissement et dans l'apparition de certaines pathologies telles que le cancer, le diabète, l'athérosclérose, l'ostéoporose, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les maladies neurodégénératives et les maladies inflammatoires (Rahman et Choudhury, 2012 ; Sanchez, 2017 ; Forrester et al., 2018).

### **III.4 Conséquences du stress oxydatif**

Le déficit en antioxydant et/ou la surproduction et la non maîtrise des ERO n'est pas sans conséquences néfastes dans l'organisme, car elle aboutit souvent à un stress oxydatif qui est défini comme un déséquilibre entre le système antioxydant et la production d'oxydants (ERO) (Avcı et al., 2014). Le principal danger de ces molécules oxygénées vient du fait des dommages qu'elles causent aux différents composants cellulaires tels que les lipides, les protéines l'ADN etc... , la dégradation des cellules et des tissus (Sanchez, 2017 ; Ighodaro et Akinloye, 2018).

### **Modification de l'ADN**

Les dommages oxydatifs de l'ADN font l'objet de recherches approfondies en physiologie animale, car il s'agit d'une cause majeure de cancérogenèse (Vadim Demidchik, 2014). Le radical hydroxyle produit par sa décomposition peut causer des dommages aux acides nucléiques. Cinq classes principales de dommages oxydatifs médiés par OH<sup>•</sup> peuvent être générées : Parmi elles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits de dérivé d'oxydation lipidique, des cassures de brins et des pontages ADN protéines (figure 11) (Cadet et al., 2002 ; Favier, 2003 ; Yoshiyama et al., 2013). Des

systèmes de réparation empêchant les dommages à l'ADN existent dans les plantes, y compris la réparation directe de la partie endommagée de la molécule, en plus du remplacement de la base et des nucléotides (Vanderauwera et al., 2011).

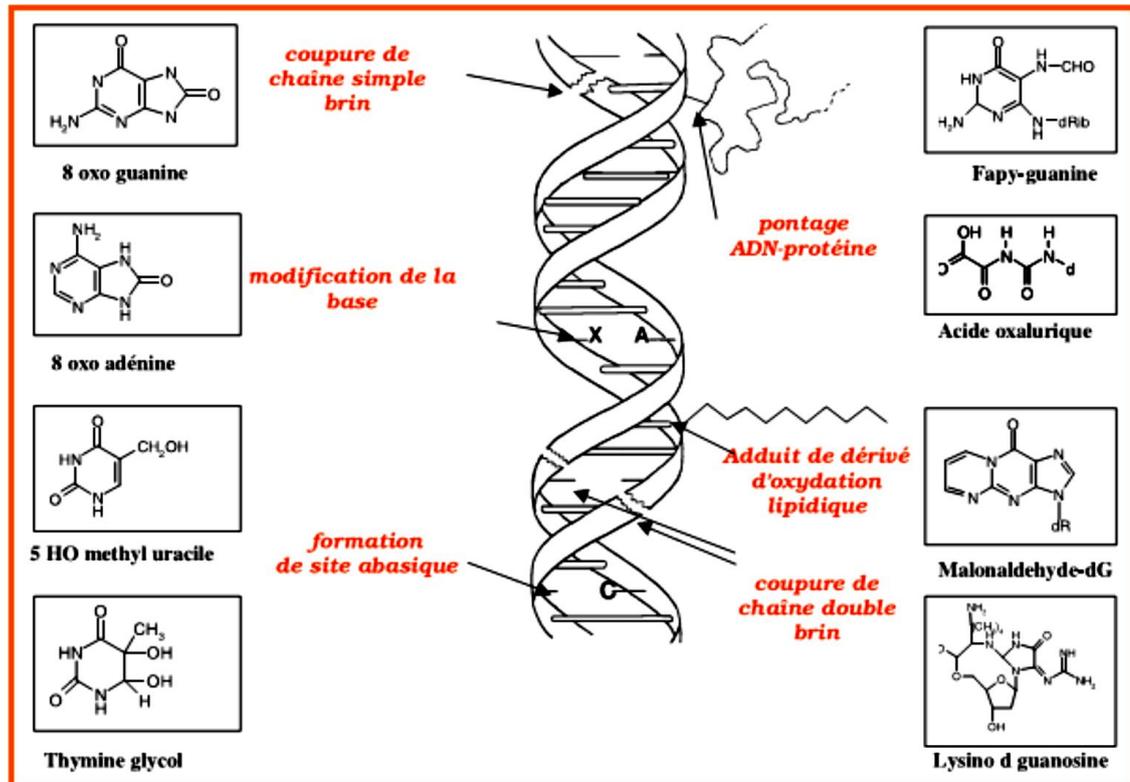


Figure 11. Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

### a. Modification des protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées ou inactivées. Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques (enzyme, récepteur...) et deviennent beaucoup plus sensible à l'action des protéases (Ott et al., 2007). Les protéines oxydées deviennent aussi très hydrophobes, soit par suppression de groupement amines ionisables, soit par extériorisation de zones hydrophobes centrales. Elles vont alors former des amas anormaux dans et autour des cellules (Figure 12) (Favier, 2003).

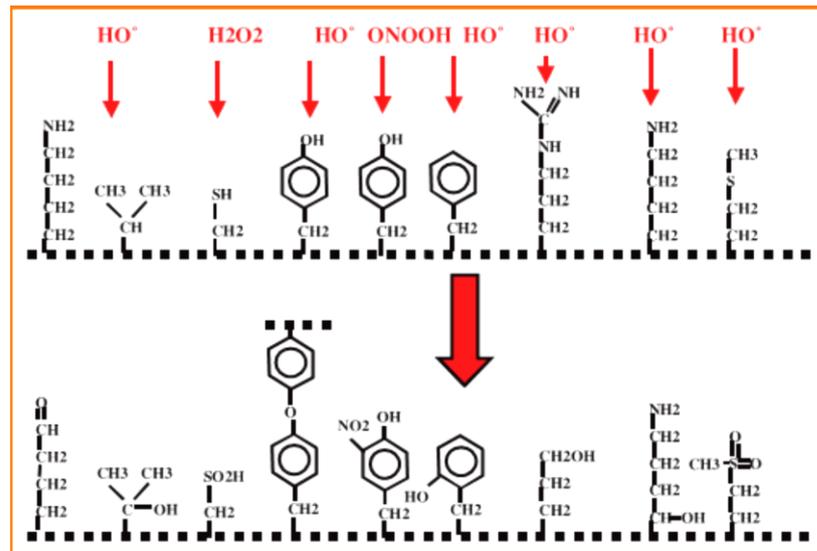


Figure 12. Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

### b. Modification des lipides

Les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés sont la cible privilégiée de l'attaque par le radical hydroxyle capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons, pour former un radical diène conjugué, oxydé en radical peroxyde. Cette réaction appelée peroxydation lipidique forme une réaction en chaîne car le radical peroxyde formé se transforme en peroxyde au contact d'un autre acide gras qui forme un nouveau radical diène conjugué (Figure 13) (Migdal et Serres, 2011).

Les hydroperoxydes après leur dégradation peuvent soit libérer différents aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde ou l'hydroxynonanal ou reformer de nouveaux radicaux lipidiques en présence de métaux de transition (Ré et al., 2005).

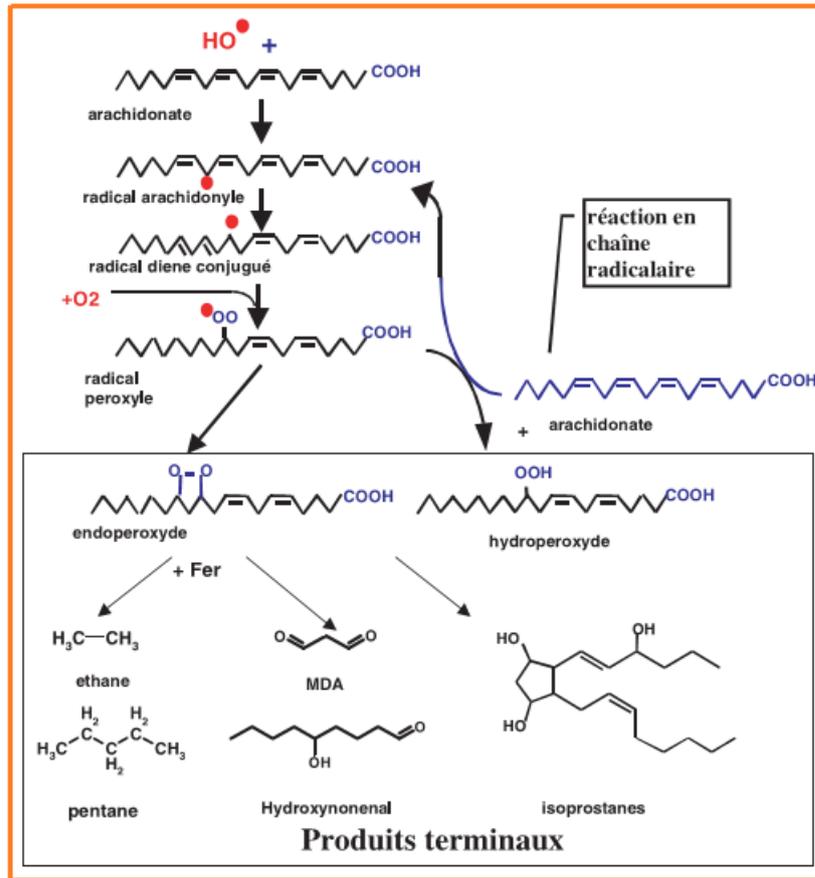


Figure 13. Mécanisme en chaîne de la peroxydation des acides gras polyinsaturés et nature des produits terminaux formés (Favier, 2003).

### c. Modification des glucides

La chimie de l'attaque radicalaire des polysaccharides a été beaucoup moins étudiée que celle des autres macromolécules, il n'en demeure pas moins que les espèces réactives de l'oxygène attaquent les mucopolysaccharides et notamment les protéoglycanes du cartilage. Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et OH•, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde, formant un dérivé AGEs (Advanced glycation end-product). Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine (Favier, 2003).

### III.5 Systèmes antioxydants

Le corps humain est équipé d'une variété d'antioxydants qui servent à contrebalancer l'effet des oxydants. Les mécanismes antioxydants sont aussi multiples. Certains agissent préférentiellement en supprimant ou diminuant la formation des radicaux libres, notamment par des actions enzymatiques. En effet, de nombreuses molécules ou enzymes sont capables de piéger les radicaux libres. Il s'agit dans ce cas de réactions chimiques d'oxydoréductions. D'autres antioxydants vont agir davantage sur les radicaux formés après réaction des molécules biologiques avec les radicaux libres. Ces antioxydants réduisent ou empêchent ainsi la propagation des réactions en chaîne. Ceux-ci peuvent agir à différents niveaux des réactions d'oxydation (Pietta, 2000).

#### III.5.1 Antioxydants endogènes

Une barrière endogène composée de plusieurs enzymes clés lutte contre ces radicaux libres et autres espèces oxydantes, afin de prévenir les dommages oxydatifs (Figure 14). Parmi ceux-ci, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase (CAT) (Droge, 2002).

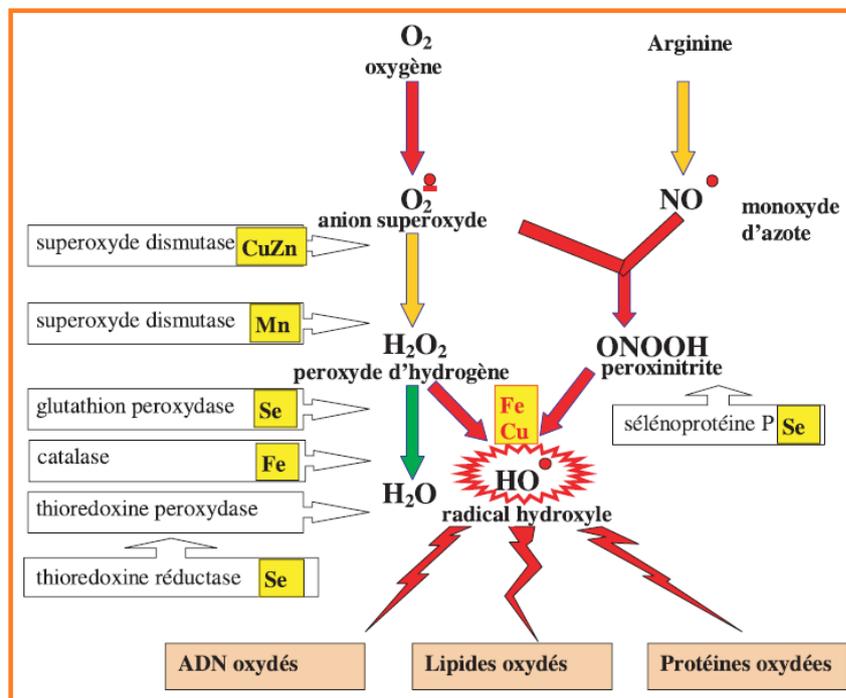


Figure 14. Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003).

### a. Super-oxydes dismutases (SOD)

Les super-oxydes dismutases sont des métalloprotéines en première ligne de défense, dismutant l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en eau (Figure 15). Il existe différentes formes de SOD se distinguant par le métal de leur site actif (Cu ; Zn ; Mn ; Fe ; Ni).

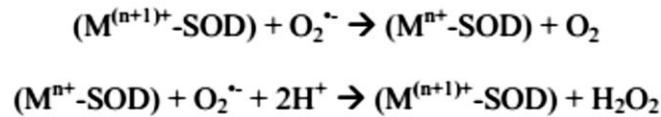


Figure 15. Mécanisme enzymatique de la SOD (Alfonso-Prieto et al., 2009).

### b. Catalase

Essentiellement présente dans les peroxysomes et dans les érythrocytes, est capable de transformer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. La catalase, portant dans ses sites actifs de l'oxyde de fer (Por-FeIII) permettant une coupure hétérolytique générant de l'eau et la forme catalase compose I de l'enzyme (Cat Cpd I = une forme cationique oxoferryl porphyrine de la catalase :  $Por^{+}\text{-Fe}^{IV}=\text{O}$ ) (Figure 16). Celle-ci va alors rapidement réagir avec une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène générant de l'eau et de l' $O_2$  et régénérant la catalase sous sa forme initiale : Por-FeIII (Alfonso-Prieto et al., 2009).

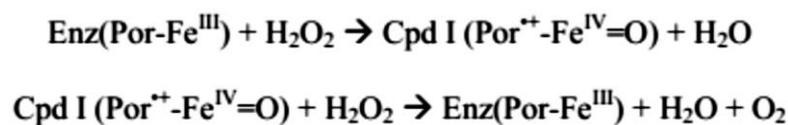


Figure 16. Mécanisme enzymatique de la CAT (Alfonso-Prieto et al., 2009)

### c. Glutathion peroxydase

Grâce à son coenzyme, le glutathion réduit (GSH) peut réduire le peroxyde d'hydrogène en eau en oxydant le GSH en GSSG (Figure 17). Un élément clé dans le maintien de ce mécanisme de défense est la régénération du glutathion réduit par la glutathion réductase, nécessitant du NADPH. Le glutathion est encore un antiradicalaire direct neutralisant l'anion superoxyde et le radical hydroxyle. Enfin, le GSH permet encore

la régénération de certaines molécules antiradicalaires à partir de leur forme oxydée (ex vitamine C ou E) (Valko et al., 2007).

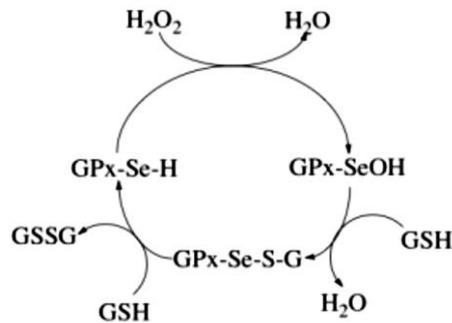


Figure 17. Mécanisme enzymatique de la GPx (Prabhakar et al., 2005).

### III.5.2 Antioxydants exogènes

D'autres mécanismes de lutte contre les radicaux libres entrent également en jeu. Il s'agit de nombreuses molécules exogènes, notamment apportées par l'alimentation, capables d'éliminer ces composés oxydatifs, ou de stopper les réactions d'oxydations en chaîne (Birben et al., 2012). L'alimentation contient un grand nombre d'antioxydants non seulement les vitamines (Acide ascorbique,  $\alpha$ -Tocophérol...) et les oligoéléments, mais aussi les polyphénols, les caroténoïdes...ect (Judde,2004).

#### a. Composés phénoliques

Les composés phénoliques sont une classe principale de métabolites secondaires dans les plantes et sont divisés en acides phénoliques et polyphénols. Ces composés se retrouvent associés à des mono et polysaccharides, liés à un ou plusieurs groupements phénoliques, ou peuvent se présenter sous forme de dérivés, tels que des esters ou des esters méthyliques (Vijaya Kumar Reddy et al., 2010). Parmi les différentes classes de composés phénoliques, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les tanins sont considérés comme les principaux composés phénoliques alimentaires (Figure 18) (Someya et al., 2002). De nombreuses études ont montré une corrélation entre la teneur en composés phénoliques et le potentiel antioxydant des fruits et légumes. Ce mécanisme antioxydant, présent dans les plantes, a un rôle important dans la réduction de l'oxydation des lipides dans les tissus (végétaux et animaux) (Sarawong et al., 2014).

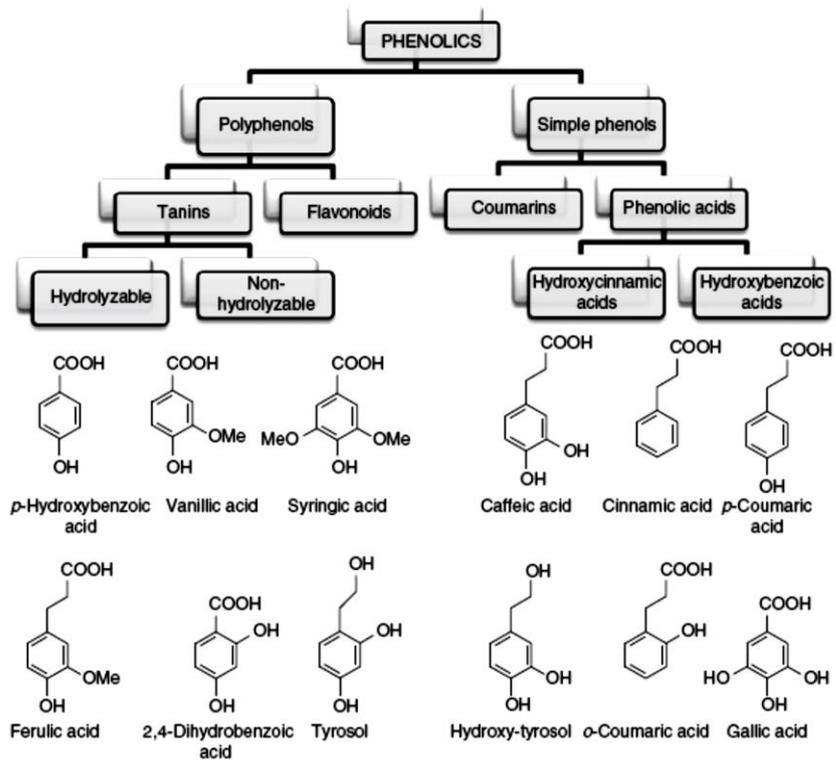


Figure 18. Différents groupes de composés phénoliques dans les plantes (Goleniowski et al., 2013).

## b. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des métabolites secondaires largement répandus dans tout le règne végétal. Les composés phénoliques confèrent un goût, une saveur et des propriétés bénéfiques pour la santé unique aux légumes et aux fruits (Tomas-Barberan et Espin, 2001). Par conséquent, augmenter le contenu phénolique de ces plantes peut améliorer leur qualité. Les composés phénoliques sont cruciaux pour la croissance et la reproduction des plantes, et sont produits en réponse à des facteurs environnementaux (lumière, refroidissement, pollution, etc.) et pour défendre les plantes blessées (Mandal et al., 2010 ; Yildiz et al., 2015 ; Ezzudin et al., 2018). Les composés et fonctions de l'acide phénolique ont fait l'objet d'un grand nombre d'études agricoles, biologiques, chimiques et médicales. Les acides phénoliques peuvent être divisés en deux classes : les dérivés de l'acide benzoïque comme l'acide gallique et les dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide coumarique, caféique et férulique (Kozarski et al., 2015) (Figure 19). L'acide caféique est l'acide phénolique le plus abondant dans de nombreux fruits et légumes, le plus souvent estérifié avec l'acide quinique comme dans l'acide chlorogénique, qui est le



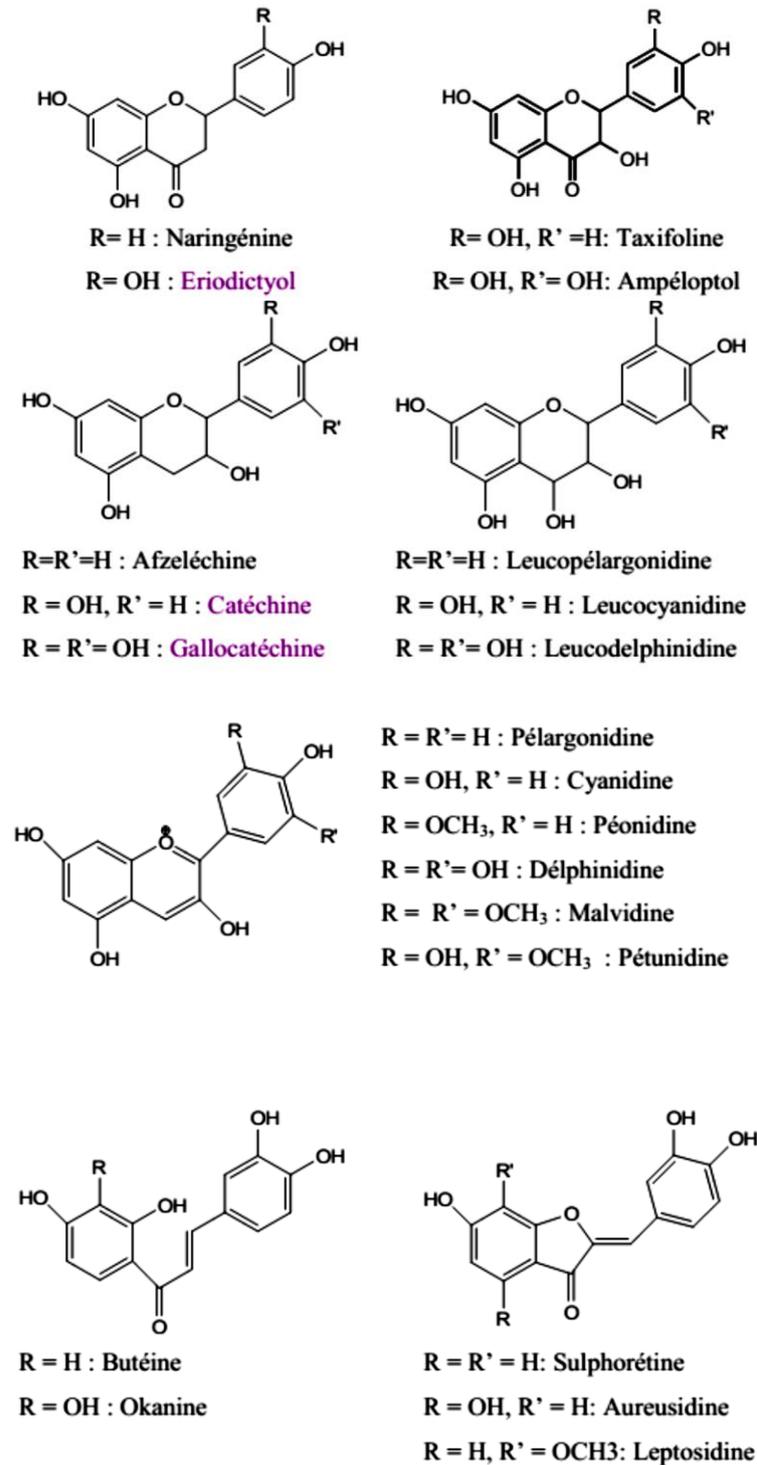


Figure 20. Exemples des flavonoïdes (Ghedira, 2005)

#### d. Lignanes

Cette classe de polyphénols se définit par une structure dimérique d'unités phénylpropanes C6-C3 reliées au niveau des carbones C8 (Figure 21) (Manach et

al.,2004). Les lignanes sont classées dans les huit sous-groupes suivants en fonction de la manière dont l'oxygène est incorporé dans le squelette et du schéma de cyclisation: furofurane, furane, dibenzylbutane, dibenzylbutyrolactone, aryltétraline, arylnaphtalène, dibenzocyclooctadiène et dibenzylbutansolactol : les furofuranes ; les furanes ; les dibenzylbutanes ; les dibenzylbutyrolactones ; les aryltétralines ; les arylnaphtalènes ; les dibenzocyclooctadiènes et les dibenzylbutyrolactols. De chaque sous-groupe varient sensiblement dans les niveaux d'oxydation à la fois des cycles aromatiques et des chaînes latérales propyle. De plus, ces lignanes peuvent être classés en trois catégories en fonction de l'état d'oxydation des positions C9 (C9'), qui sont à l'extrémité de la chaîne latérale propyle: lignanes avec 9 (9') - oxygène, lignanes sans 9 (9') - oxygène et lignanes d'acide dicarboxylique, comme indiqué sur la figure 22 (Suzuki et Umezawa, 2007).

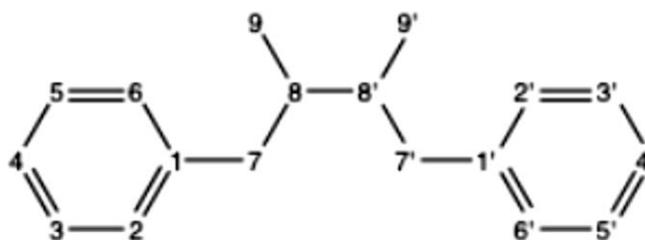
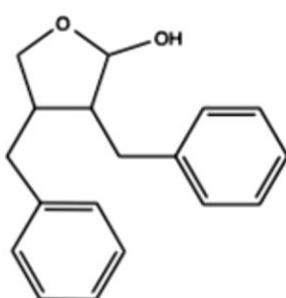
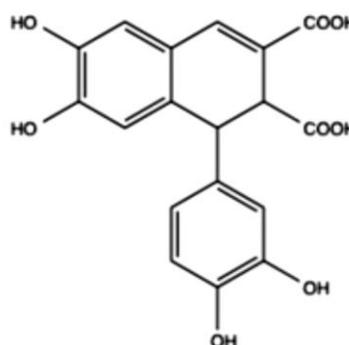


Figure 21. Squelette des lignanes (Manach et al.,2004)



Dibenzylbutyrolactone



Acide epiphyllique

Figure 22. Exemples de lignanes (Suzuki et Umezawa, 2007).

### e. Tannins

Les tanins représentent un des quatre groupes de métabolites secondaires des plantes supérieures avec les saponines, les huiles essentielles et les alcaloïdes. A la différence des métabolites primaires intervenant directement dans la nutrition et la croissance, les

métabolites secondaires participent à la vie de relation de la plante avec son environnement. La synthèse des tanins est ainsi un des mécanismes de défense contre les agressions des phytopathogènes (bactéries, champignons, virus) et des prédateurs (insectes, mammifères herbivores) (Mueller-Harvey et al., 2017). Du point de vue de la composition chimique, plusieurs catégories de tanins ont été distingués, les tanins hydrolysables et les tanins condensés étant les principales catégories (Figure 23). Il y a aussi les caffe-tanins, les labiatae-tanins et les phlorotanins qui se réfèrent à la famille des tanins (Okuda et Ito, 2011).

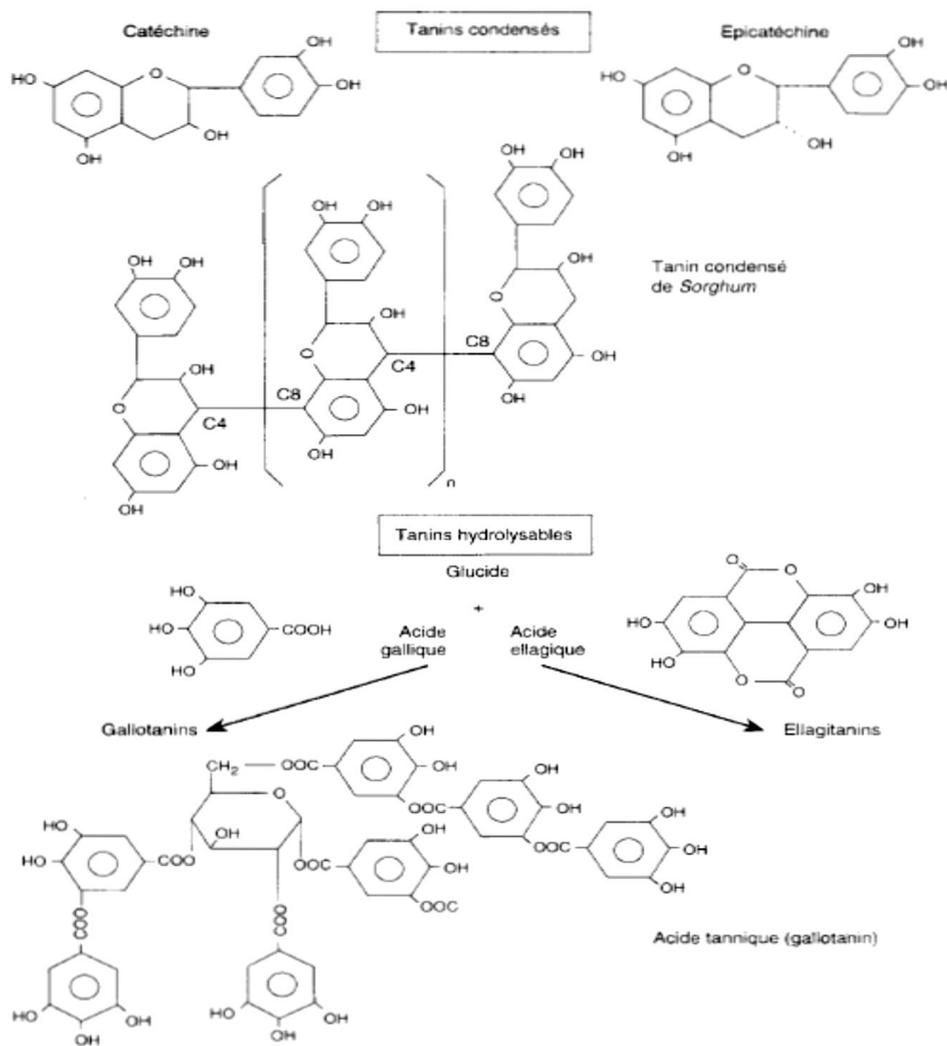


Figure 23. Structure des précurseurs des deux classes de tanins hydrolysables et les tanins condensés (Zimmer et Cordesse, 1996 ).

### f. Vitamine E ( $\alpha$ -tocophérol)

La vitamine E liposoluble est concentrée dans le site intérieur hydrophobe de la membrane cellulaire et constitue la principale défense contre les lésions membranaires induites par les oxydants. La vitamine E donne des électrons au radical peroxyde, qui est produit lors de la peroxydation lipidique (Birben et al., 2012). L' $\alpha$ -tocophérol est le principal antioxydant contenu dans les LDL. Chaque particule de LDL contient en moyenne de 6 à 12 molécules de vitamine E. La vitamine E (Figure 24) interrompt la chaîne de propagation radicalaire dans les membranes en limitant la peroxydation des acides gras polyinsaturés. La vitamine E déclenche l'apoptose des cellules cancéreuses et inhibe les formations de radicaux libres (Evans, 2000).

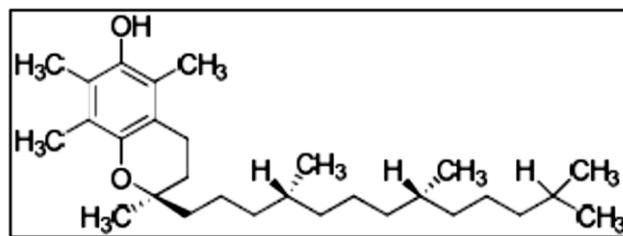


Figure 24. Structure de la vitamine E (ou  $\alpha$ -tocophérol) (Evans, 2000).

### g. Vitamine C (Acide ascorbique)

La vitamine C ou acide ascorbique est un composé possédant une fonction 2,3 énédiol, soluble dans l'eau fournit une capacité antioxydante en phase aqueuse intracellulaire et extracellulaire principalement en piégeant les radicaux libres d'oxygène, Elle peut protéger divers substrats biologiques de l'oxydation (protéines, acides gras et ADN). Elle est capable de réagir avec le radical tocophéryle en régénérant la vitamine E (Figure 25) (Wang et Jiao, 2000; Huang et al, 2002)

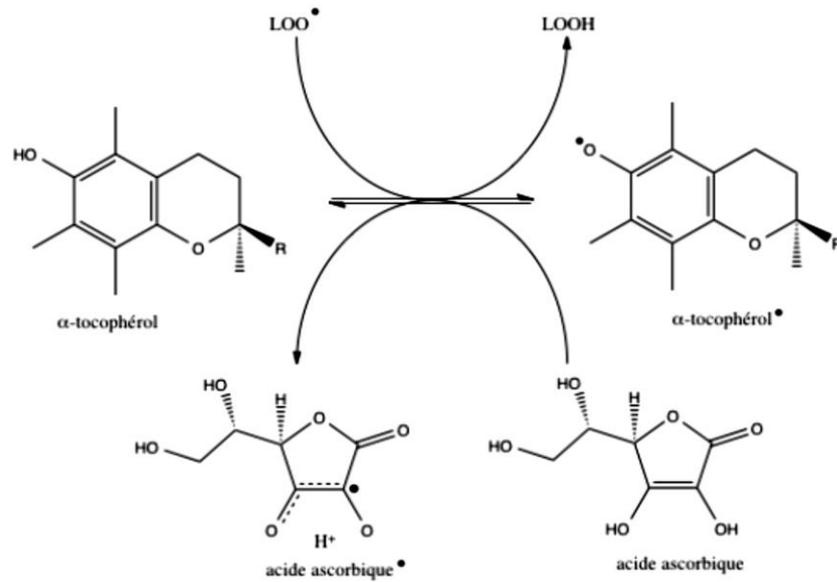


Figure 25. Cycle de la vitamine E et de la vitamine C

#### h. Caroténoïdes ( $\beta$ -carotène)

Les caroténoïdes sont des pigments présents dans les plantes. Le  $\beta$ -carotène réagissait principalement avec les radicaux peroxyde (ROO), hydroxyle (OH) et superoxyde ( $O_2^-$ ). Les caroténoïdes montrent leurs effets antioxydants à faible pression partielle d'oxygène, mais peuvent avoir des effets pro-oxydants à des concentrations d'oxygène plus élevées (El-Agamey et al, 2004). Les caroténoïdes et les acides rétinoïques (RA) sont capables de réguler les facteurs de transcription et inhiber l'activation du NF-kB induite par l'oxydant et la production d'interleukine (IL) -6 et du facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  et affecter également l'apoptose des cellules. Des effets antiprolifératifs de la PR ont été démontrés dans plusieurs études (Niles, 2004), cet effet de la PR est principalement médié par les récepteurs de l'acide rétinoïque et varie selon les types de cellules. Dans les cellules de carcinome mammaire, il a été démontré que le récepteur de l'acide rétinoïque déclenche l'inhibition de la croissance en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou les deux (Donato et Noy, 2005; Niizuma et al., 2006).

#### i. Oligo-éléments

Les oligo-éléments (Cu, Zn, Se, Mn, Fe etc.) ne sont pas des antioxydants en tant que tels, mais agissent comme cofacteurs des enzymes constituant la première ligne de défense face aux attaques oxydatives. Il s'agit en réalité de catalyseurs redox de ces enzymes. Leur

apport par l'alimentation permet donc de maintenir le bon fonctionnement de la machinerie antioxydante cellulaire et donc l'équilibre oxydatif. Par ailleurs, certains oligo-éléments, selon leur état et leur concentration, peuvent être à l'origine d'une production de ROS par des mécanismes redox comme dans le cas du fer et la réaction de Fenton. La supplémentation en oligo-éléments en cas de carence nécessite donc un certain contrôle (Baliga et al., 2011).

#### **j. Glutathion**

Le GSH est très abondant dans tous les compartiments cellulaires et est le principal antioxydant soluble. Le rapport GSH / GSSG est un déterminant majeur du stress oxydatif. Le GSH montre ses effets antioxydants de plusieurs manières. Il détoxifie le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques par l'action du GSH-Px. GSH fait don de son électron à  $H_2O_2$  pour le réduire en  $H_2O$  et  $O_2$ . Le GSSG est à nouveau réduit en GSH par la GSH réductase qui utilise le NADH comme donneur d'électrons. Les GSH-Px sont également importants pour la protection de la membrane cellulaire contre la peroxydation lipidique. Le glutathion réduit donne des protons aux lipides membranaires et les protège des attaques oxydantes (Masella et al., 2005). Le GSH est un cofacteur de plusieurs enzymes détoxifiantes, comme le GSH-Px et la transférase, il protège les cellules contre l'apoptose en interagissant avec les voies de signalisation pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (Birben et al., 2012).

#### **IV. Microencapsulation**

L'encapsulation des protéines est un domaine de recherche très prometteur puisque de nombreuses protéines sont désormais disponibles grâce aux progrès récents de la biotechnologie. Cependant, leur utilisation à des fins thérapeutiques reste un défi dans le domaine de la nano et de la microencapsulation en raison de l'instabilité physique et chimique, de la protéolyse et de la courte demi-vie (Sanchez et al., 2003). L'encapsulation de protéines dans des systèmes polymères s'est avérée être une approche polyvalente pour protéger ces biomolécules, pour permettre leur délivrance prolongée et pour améliorer leur efficacité thérapeutique (Sinha et al., 2003).

#### **IV.1. Définition**

La microencapsulation est une technique dans laquelle le matériau d'intérêt est revêtu d'au moins une couche de matériau de revêtement à l'échelle microscopique. Le matériau d'intérêt pour l'encapsulation est également connu sous le nom d'ingrédient actif, de noyau (Kuang et al., 2010), de remplissage ou de phase interne, tandis que le matériau de revêtement est connu comme agent d'encapsulation, matériau de paroi, capsule, membrane ou support et coque (Gibbs, Kermasha et al., 1999). Les produits encapsulés peuvent être produits sous différentes formes, telles que simple (une couche de matériau de revêtement) ou multi-paroi (plus d'une couche de matériaux de revêtement) (Kuang et al., 2010).

Les buts de l'encapsulation peuvent être multiples : protéger une substance, masquer une odeur ou bien encore permettre de contrôler, de déclencher et/ou de cibler la libération d'un principe actif (Subtil et al., 2014). L'encapsulation s'applique à de nombreux domaines tels que l'agroalimentaire, la pharmacie, les cosmétiques ou bien encore les catalyseurs. Selon les propriétés d'usages recherchées des particules, les techniques d'obtention peuvent varier (Gharsallaoui et al., 2007).

#### **IV.2. Historique**

La première application des microparticules date des années 1950 quand Green et Schleicher ont encapsulé des particules de pigments dans des polymères naturels (protéine/gélatine et polysaccharide/gomme arabique) par coacervation complexe (Dubey et al., 2009). Dans les années 60s, l'encapsulation de cristaux liquides par la gélatine et la gomme d'acacia pour la production de matériaux pour écrans thermosensibles a été décrite par Ferguson (Ferguson et al., 1964). Au cours des dernières années, la microencapsulation s'est considérablement développée à l'échelle industrielle. Les microparticules ont des applications très variées, elles sont utilisées pour la production de textiles parfumés (Rodrigues et al., 2008) et de produits cosmétiques (El-Zawahry et al., 2007; Ge et al., 2009), pour la protection des récoltes agricoles (Bingham et al., 2007; Stelinski et al., 2007), dans l'agroalimentaire pour donner de nouvelles propriétés aux aliments (encapsulation d'arômes, colorants, épices) (Augusti et Hemar, 2009), mais aussi dans les produits phytosanitaires (Nordstierna et al., 2010; Scher et al., 1998) et dans le domaine de la médecine et de la pharmacie (Huang et al., 2007; Scalia et al., 2011).

### IV.3. Types de microparticules

Les microparticules synthétiques sont des systèmes colloïdaux développés principalement en vue de leur utilisation thérapeutique. Selon la nature des éléments qui les constituent et leur structure, il est possible de distinguer les liposomes, les microsphères, et les microcapsules (Andrieux et al., 2003).

Les liposomes (Figure 26) sont de petites vésicules sphériques dont la paroi est constituée par une ou plusieurs bicouches phospholipidiques délimitant une cavité centrale contenant une phase aqueuse. Ils sont apparus il y a quarante ans grâce aux travaux de Bangham et al. (1965) et ont été les premiers à être utilisés comme vecteur de médicaments. Leur diamètre se situe dans un intervalle allant de 20 nm à 1  $\mu\text{m}$ . Ils peuvent véhiculer des principes actifs de nature hydrophile, sous forme dissoute dans la phase aqueuse centrale, ou de nature hydrophobe par insertion de ces molécules dans la bicouche. Les liposomes présentent une bonne biocompatibilité en raison des matières premières qui les composent (phospholipides naturels, stérols, glycérolipides) et peuvent se comporter comme des formes médicamenteuses à libération contrôlée (Mourtas et al., 2007). Cependant, ces structures vésiculaires sont instables chimiquement (oxydation et hydrolyse des phospholipides) et physiquement (agrégation, fusion et perte du contenu) (Barenholz, 2001).

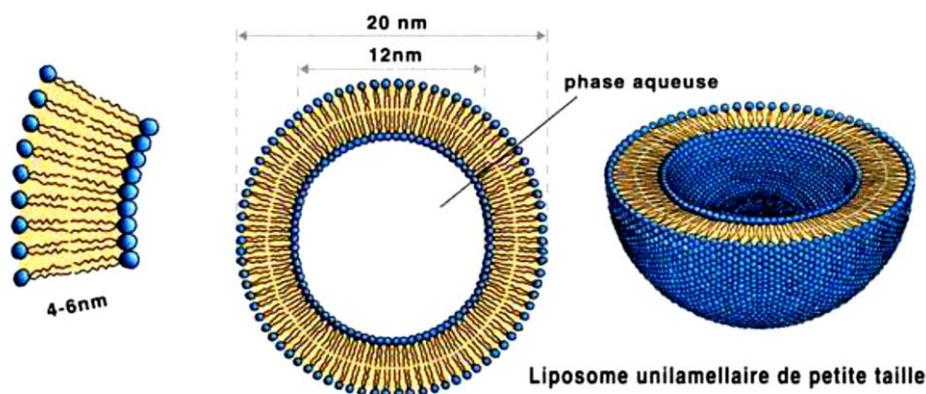


Figure 26. Structure d'un liposome (Rabeau, 2009).

Les microcapsules, particules sphériques de type « cœur -membrane » ; le cœur est constitué de la substance active et la membrane de l'agent encapsulant qui forme l'enveloppe solide (Figure 27 A et 28 A), et les microsphères, le principe actif est soit

incorporé à l'intérieur du réseau polymère durant la formation des microsphères, soit adsorbé à leur surface par l'intermédiaire de liaisons de type hydrophobe, électrostatique ou covalente. Il est libéré par simple diffusion ou à la suite de la biodégradation du polymère dans l'organisme (Figures 27 A et 28 B) (Rabeau, 2009).

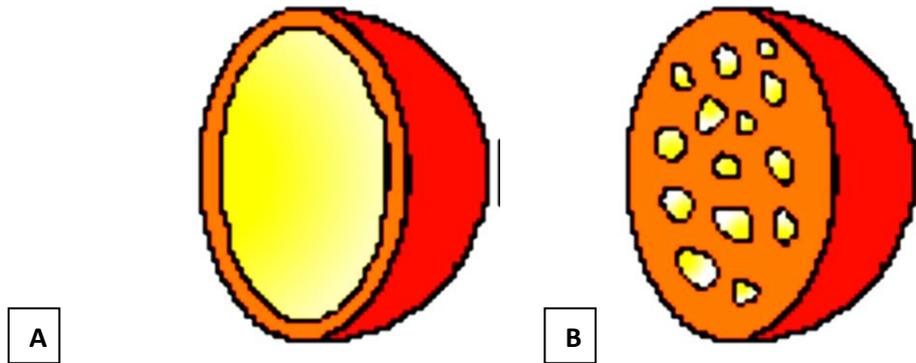


Figure 27. Structures d'une capsule (A) et d'une microsphère (B) (Rabeau, 2009).

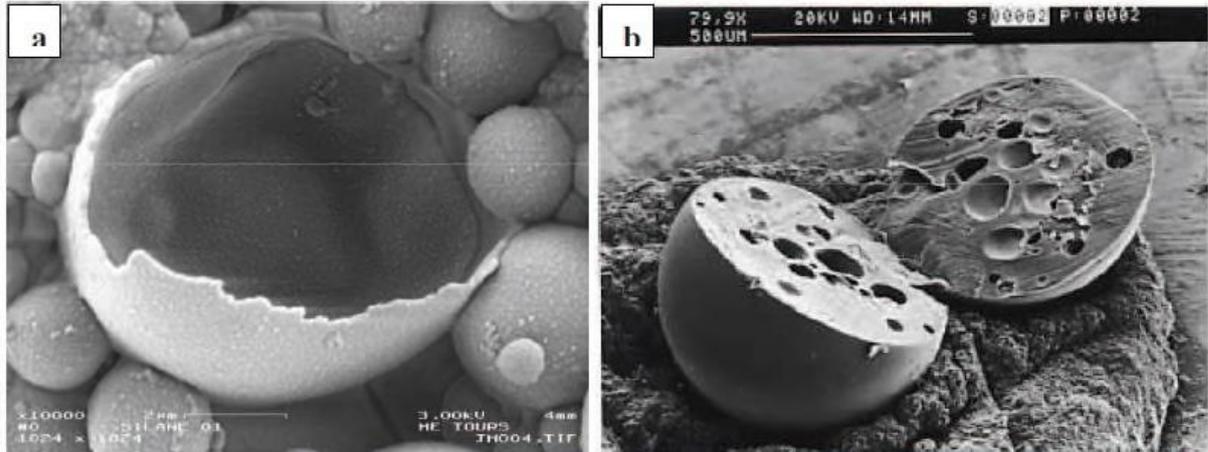


Figure 28. Images MEB de microcapsules (a) et de microsphères (b) (Rabeau, 2009).

#### IV.4. Composés des microparticules

Les constituants principaux d'une particule obtenue par microencapsulation sont la matière enrobante et la matière active. Afin d'améliorer la stabilité du système et/ou lui apporter des fonctionnalités désirées, des additifs peuvent également être ajoutés. Les constituants de microparticules le plus souvent utilisés sont présentés ci-dessous.

#### IV.4.1. Matière enrobante

Le système enrobant joue un rôle principal sur l'efficacité, la stabilité des microparticules et sur le degré de protection de la matière active. En général, les critères de choix des matériaux enrobants sont basés sur leurs propriétés physico-chimiques (stabilité, humidité, pH, oxydation), thermiques et mécaniques. L'enrobage permet de modifier radicalement l'aspect du produit encapsulé : masquer le goût et l'odeur, changer l'état de surface, la solubilité, la rhéologie ou l'état fondamental, comme par exemple transformation des liquides ou des gaz en poudres fluides (Nesterenko, 2012).

Tableau III : Exemples d'utilisation des polymères synthétiques comme matière enrobante en microencapsulation.

<i>Polymère</i>	<i>Matière active</i>	<i>Technique d'encapsulation</i>	<i>Application</i>	<i>Référence</i>
Acide polylactique/ Acide polylactique-co-glycolique	Principes actifs hydrophobes	Atomisation coacervation gélification Technologie des fluides supercritiques	Médicaments	Wischke et al., 2008
Polystyrène	Matériau à changement de phase	Polymérisation en suspension	Textile	Sanchez et al., 2007; Supsakulchai et al., 2003
Poly(acrylate d'alkyl)	Insuline	Polymérisation en émulsion	Médicaments	Damge et al, 1997; Tiarks et al., 2001
Polyuréthane	catalyseur	Polymérisation interfaciale	Catalyse	Ley et al., 2003
Ployacrylonitrile	Hépatocytes	Co-extrusion	Biomédecine	Aebischer et al.,1991; Honiger et al., 2000
Poly(éthylène glycol)	Felodipine	Enrobage en lit fluidisé avec CO2 supercritique	Médicaments	Krober et al., 2005; Chiou et al., 2006

Selon le procédé utilisé, les polymères synthétiques sont largement utilisés comme matrice de microparticules. L'avantage des systèmes enrobants polymériques (à base des polymères naturels ou synthétiques) réside dans la possibilité de fonctionnalisation des chaînes ce qui permet l'obtention de nouvelles propriétés telles que la résistance aux

températures élevées et aux agents chimiques. Les particules enrobées par les polymères synthétiques sont généralement utilisées dans la médecine et la pharmacie. Par exemple, le polyacrylate est utilisé pour encapsuler le paracétamol (Benita et al., 1985), des cellules vivantes (Huang et al., 2007) ou des cellules endocrines (Scalia et al., 2011). D'autres exemples de polymères synthétiques utilisés pour protéger des composés actifs sensibles sont présentés dans le Tableau III.

Les polysaccharides, les protéines d'origine végétale et les lipides ont largement fait leur preuve dans le domaine de la microencapsulation et sont d'usage courant dans de nombreux secteurs d'activité (cosmétique, textile, pharmacie, agroalimentaire) (caldero et al., 2011). L'avantage majeur de ces matériaux comme les lipides réside dans leur diversité, leur capacité à lier les arômes, une faible viscosité à une concentration élevée dans la solution, une bonne solubilité et un faible coût. Ils peuvent agir en tant que matériaux enrobants.

Les protéines sont biocompatibles et biodégradables, la nature amphiphile des chaînes protéiques permet d'encapsuler des matières actives hydrophobes ou hydrophiles ; la masse moléculaire élevée et la flexibilité de leurs chaînes permettent de bien enrober et de protéger la matière active.

Les lipides amphiphiles, tels que les glycérides, les phospholipides et les glycolipides ont la possibilité de stabiliser des émulsions et de provoquer l'auto-assemblage des molécules dans les structures supramoléculaires (Augustin et al., 2009). Ces propriétés de surface permettent aux lipides amphiphiles de protéger les molécules sensibles (à l'oxydation, l'humidité, l'action des substances chimiques ou encore à pH du milieu), ainsi que de mieux disperser les molécules hydrophiles au sein de la préparation liquide.

#### **IV.4.2. Molécules encapsulées**

Les molécules encapsulées ou la matière active est la partie qui détermine l'utilisation suivante des microparticules produites. La nature des substances actives utilisées dans la microencapsulation est très variable. Parmi les ingrédients que l'on peut protéger et isoler se trouvent :

- des arômes, des huiles essentielles et des substances aromatisantes volatiles ((Dardelle et al., 2007; Given et al., 2009; Marcuzzo et al., 2010);

- des vitamines, comme l'acide ascorbique (vitamine C) (Wilson et Shah, 2007; Pierucci et al., 2006), le  $\beta$ -carotène (vitamine A) (Loksuwan et al., 2007), l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) (Somchue et al., 2009);
- des lipides sensibles à l'oxydation tels que des acides gras polyinsaturés (Kapusniak et Tomasik, 2006);
- des acides et bases alimentaires (acide citrique, bicarbonate de sodium) (Abbasi et al., 2009);
- des additifs alimentaires (colorants, conservateurs) (Rascon et al., 2011);
- des bactéries et des enzymes (Kailasapathy, 2002; Anjani et al., 2007);
- des principes actifs pour l'industrie pharmaceutique (Huang et al., 2007; Scalia et al., 2010);
- des principes actifs cosmétiques (Ge et al., 2009);
- des minéraux (sels du calcium ou du fer) (Abbasi et Azari, 2011).

#### **IV.4.3. Additifs**

En plus du matériau enrobant et la matière active, des nombreux additifs sont ajoutés pendant la formulation afin de stabiliser certaines protéines. Parmi ces additifs souvent utilisés en microencapsulation nous pouvons citer les agents tensioactifs (Salaüna et al., 2011; Hirech et al., 2003), les agents antimicrobiens (Gharsallaoui et al., 2012; Wang et al., 2011) ou encore les agents réticulants (Lazko et al., 2004).

Dans le cas de l'utilisation d'un principe actif hydrophobe, la stabilisation de l'émulsion, avant l'étape de microencapsulation, peut se faire en présence d'un agent tensioactif. Les surfactants utilisés pour stabiliser la phase huileuse de l'émulsion sont les oléates de sorbitane (Span) (Saihi et al., 2006; Gan et al., 2008), les polysorbates (Tween) (Krishnan et al., 2005; Shaikh et al., 2006), le polyricinoléate de polyglycérole et les copolymères à blocs (Synperonic) (Yoo et al., 2006; Hildebrand et al., 2000). Ces tensioactifs sont ajoutés dans les préparations liquides en faible quantité (de 0,5 % à 5 %).

#### **IV.5. Techniques d'encapsulation**

Les différentes méthodes de la microencapsulation ont été classifiées selon différents critères (Tableau IV) (Rabeau, 2009). Elles peuvent être classées selon :

- L'utilisation ou non de solvants organiques ;

- La nature du milieu dispersant : liquide, gazeux, ou à l'état supercritique ;
- Le composé employé pour obtenir la capsule : peuvent être utilisés des polymères préformés, des lipides ou des monomères (polycondensation interfaciale, polymérisation en milieu dispersé...) ;
- La dernière classification repose sur le procédé selon lequel est réalisée la microencapsulation.

Tableau IV : Classification des techniques d'encapsulation

Types de procédé	Mode d'encapsulation	Gamme de tailles de microparticules obtenue	Type de produit obtenu
<b>Procédés chimiques</b>	Polycondensation interfaciale	2-2000 $\mu$ m	Microcapsules
	Polymérisation en milieu dispersé par voie radicalaire ou anionique		Microsphères
<b>Procédés physico-chimiques</b>	Séparation de phases ou coacervation ( simple ou complexe)	2-1200 $\mu$ m	Microcapsules Microsphères
	Evaporation-extraction de solvant	1-200	Microsphères
	Gélification thermique d'émulsion (hot melt)	1-201	Microsphères
<b>Procédés mécaniques</b>	Nébulisation/séchages(spray drying)	1-202	Microsphères
	Gélification ou congélation de gouttes (priling)	1-203	Microsphères
	Enrobage en lit fluidisé (spray coating)	1-204	Microcapsules
	Extrusion/sphéronisation	1-205	Microsphères

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés uniquement à un des procédés physico-chimiques qui est l'encapsulation par émulsion/évaporation ou extraction de solvant où une émulsion selon l'IUPAC, est une dispersion colloïdale d'un liquide sous forme de globules (phase dispersé ou discontinue) dans un autre liquide non miscible (phase dispersante ou continue) comme l'eau et l'huile, à laquelle on ajoute généralement un agent de surface de l'émulsion (Boris et al., 2007).

La méthode de microencapsulation par évaporation/ précipitation de solvant est une méthode de microencapsulation physico-chimique qui est simple à mettre en œuvre mais est régie par des phénomènes complexes. Cette méthode repose sur le transfert puis

l'évaporation de la phase interne d'une pseudo-émulsion sous agitation (Benoit et al., 2007).

Le matériau enrobant, le plus souvent un polymère hydrophobe et biocompatible (biodégradable), est dissous dans un solvant organique et volatil. Ce solvant est partiellement ou totalement soluble dans la phase continue qui est le plus souvent de l'eau. Les molécules actives à encapsuler peuvent alors être dissoutes ou dispersées dans la solution organique. Ensuite, la phase organique est ajoutée au goutte à goutte, sous agitation, dans la phase dispersante contenant un surfactant (Li et al., 2008) ( Figure 29).

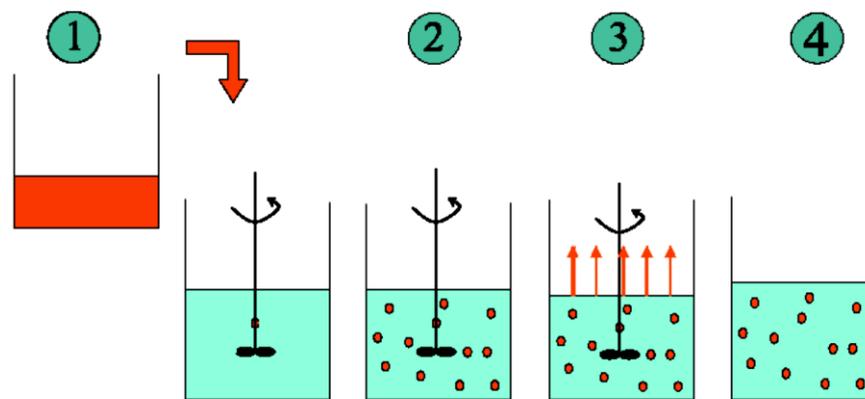


Figure 29. Schéma du procédé d'encapsulation par précipitation/évaporation (Rabeau, 2009).

Les principaux avantages de la microencapsulation par évaporation/précipitation sont :

- Un rendement d'encapsulation élevé, le taux d'encapsulation est d'autant plus élevé que les molécules actives sont hydrophobes,
- La facilité de mise en œuvre,
- Un faible coût de mise en place de l'installation.

#### IV.6. Domaines d'application de la microencapsulation

Selon les molécules encapsulées, des applications sont envisagées dans de nombreux domaines : l'agriculture, la santé, l'industrie, etc... Dans le tableau V sont énumérés quelques exemples de composés encapsulés selon le domaine d'application (Finch et al., 2000).

Tableau V : Applications de la microencapsulation

<i>Domaine d'application</i>	<i>Exemples de composés encapsulés</i>
<b>Pharmacie et médical</b>	Antibiotiques, contraceptifs, enzymes, vaccins, bactéries, vitamines, minéraux, antigènes, anticorps...
<b>Cosmétique</b>	Parfums, huiles essentielles, anti transpirants, agents bronzants, crèmes solaires, colorants capillaires...
<b>Alimentaire</b>	Huiles essentielles, graisses, épices, arômes, vitamines, minéraux, colorants, enzymes, levures, micro organismes....
<b>Agriculture</b>	Herbicides, insecticides, engrais, répulsifs, hormones végétales....
<b>Biotechnologie</b>	Enzymes immobilisées, microorganismes, cellules vivantes, cellules artificielles, cultures tissulaires, composés nutritionnels...
<b>Chimie</b>	Catalyseurs, enzymes, additifs pour plastiques, eau (plâtre et béton), inhibiteurs de corrosion, retardateurs d'incendie, colorants et pigments, agents UV protecteurs, parfums, huiles essentielles, agents lubrifiants....
<b>Détergents</b>	Adoucissants, antistatiques, agents décolorants, agents moussants, silicones, cires, détachants...
<b>Textile</b>	Colorants, parfums, pigments, bactéricides, fongicides, répulsifs d'insectes, agents antistatiques, retardateurs d'incendie, agents imperméabilisants, adhésifs, composés bioactifs médicaux, composés bioactifs cosmétiques
<b>Traitement des déchets</b>	Microorganismes, substrats, détoxifiants, déchets industriels à risques, déchets radioactifs....

#### IV.7. Microencapsulation des enzymes

Les applications industrielles des enzymes en solution se trouvent parfois considérablement limitées par leur prix de revient et leur relative instabilité du fait de leur nature protéique (sensibles à la température, au pH, aux ions). En solution, même si l'activité de l'enzyme est suffisante, sa récupération après utilisation nécessite un processus de purification long et coûteux. Par conséquent, ces enzymes sont perdues une

fois la réaction effectuée : elles ne sont pas utilisables pour d'autres cycles de production. L'immobilisation des enzymes sur des supports solides, en augmentant leur stabilité opérationnelle et en permettant l'utilisation de réacteurs en flux continu qui permet de contourner cette difficulté (Marouf et Tremblin, 2016).

Plusieurs études ont été réalisées par des stratégies d'encapsulation des enzymes différentes, en utilisant différents types de polymères (Tableau VI).

Tableau VI : Exemples sur l'encapsulation des enzymes

Protéine/Enzyme	Méthode	Polymère	Type de capsule	Référence
Superoxyde dismutase(SOD)	Double émulsion Evaporation de solvant	Polycaprolactone (PCL)	Nanosphère	Singh et al., 2013
Peroxydase de raifort	Double émulsion Evaporation de solvant	Alginate	Microsphères	Santos et al., 2014
Lipase	Double émulsion Evaporation de solvant	Polycaprolactone (PCL)	Nanofibres	Song et al., 2012
manganèse peroxydase	polymerization/cross-linking in aqueous droplets	poly(N-isopropylacrylamide)	Microsphère	Schachschal et al., 2011
lysozyme	Extraction/évaporation à double émulsion-solvant	poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA)	Microsphère	Kang et al., 2002
Catalase(CAT)	Double émulsion Evaporation de solvant	Polycaprolactone (PCL)	Nanosphère	Singh et al., 2013
$\alpha$ -chymotrypsin	Double émulsion Evaporation de solvant	poly(glycerol adipate) (PGA) et poly(glycol adipate-pentadecalactone)	microparticules	Gaskell et al., 2008
$\beta$ -galactosidase	Atomisation	calcium alginate et sodium alginate	Microcapsules	Estevinho et al., 2015

#### IV.8. Stabilité des protéines dans des systèmes polymériques particuliers

Les microparticules ont largement été utilisées en tant que systèmes polymériques particuliers à libération contrôlée dans le but d'administrer des protéines. Cependant, les protéines sont des molécules fragiles et peuvent subir une dénaturation physique ou une dégradation chimique durant la formulation, la libération et le stockage de ces systèmes. Ainsi, la conservation de la stabilité des protéines dans des microparticules de système polymériques reste un défi majeur (Mohammadi-Samani et Taghipour, 2015 ; Teekamp et al., 2015).

#### **IV.8.1. Stabilité des protéines durant la formulation**

La présence de l'interface eau/huile dans la méthode d'émulsion huile/eau (H/E) ou eau/huile/eau (E/H/E) entraîne la déstabilisation de la protéine. Etant dissoute dans la phase aqueuse, la protéine est plus flexible mais aussi plus réactive et pourrait s'adsorber et s'agréger à l'interface eau/huile du fait de sa nature amphiphile (Kwon et al., 2001; van de Weert et al., 2000). La protéine pourrait également être dénaturée à cause de la force de cisaillement exercée lors de la préparation de l'émulsion initiale eau/huile (E/H) (Morlock et al., 1997). La sonication utilisée lors de certains procédés d'émulsification pourrait provoquer la dénaturation de la protéine du fait de l'extrême température pouvant survenir localement (Zambaux et al., 1999). De plus, les interactions hydrophobes entre le polymère et la protéine durant la formulation posent un problème de stabilité car la protéine est capable de s'adsorber sur le polymère et pourrait se dénaturer (Butler et al., 1999). En outre, le pH, la force ionique et la polarité du solvant jouent un rôle important sur l'adsorption de la protéine. Un pH proche du point isoélectrique (Pi) favorise ce phénomène à cause de la neutralité de la protéine (Gaspar et al., 1998). L'augmentation de la force ionique et l'utilisation des solvants plus polaires induisent également plus d'adsorption (Tsai et al., 1996). Dans une étude, l'acétate d'éthyle, étant moins polaire que le dichlorométhane, provoque moins d'interactions avec le polymère ce qui fait de lui un solvant plus intéressant pour les procédés de formulation en termes de stabilité des protéines (Sturesson et Carlfors, 2000).

#### **IV.8.2. Stabilité des protéines durant la libération**

La libération de la protéine à partir de systèmes polymériques particuliers dans des conditions physiologiques est souvent caractérisée par une libération précoce suivie par une libération lente et incomplète. De nombreux mécanismes tels que l'agrégation covalente ou non covalente, l'hydrolyse et l'adsorption non-spécifique sont responsables de l'instabilité de la protéine dans les particules de polymère durant la libération. En effet, l'humidité captée par le polymère pendant l'incubation dans le milieu de libération augmente la mobilité et la flexibilité de la protéine ce qui facilite son agrégation dans la matrice polymérique et entraîne une libération incomplète (Lucke et al., 2002). L'humidité résiduelle dépend de la nature du polymère (ratio des acides lactique/glycolique, masse molaire...) et des excipients ajoutés dans la matrice polymérique (PEG, surfactants, sels...). En outre, l'instabilité de la protéine pourrait résulter de l'acidification dans ces systèmes

polymériques due aux produits de dégradation de polymère pendant l'incubation. Cela contribuerait à l'agrégation et à la dégradation chimique par acylation ou désamination entraînant une libération incomplète de la protéine (Tran et al., 2012). Cependant, l'acidification au sein des particules dégradées dépend de nombreux paramètres tels que le type de polymère, la durée d'incubation, la taille et la porosité des particules de polymère, les excipients ajoutés, etc.... D'autre part, l'adsorption de protéines sur le polymère due aux interactions hydrophobes joue aussi un rôle important vis-à-vis de la libération incomplète (Paillard-Giteau et al., 2010; Kim et Park, 1999).

#### **IV.8.3. Stabilité des protéines durant le stockage**

L'instabilité des protéines dans des microparticules de polymère durant le stockage est mineure en comparaison avec l'instabilité survenant lors de la formulation ou de la libération. Cependant, l'humidité résiduelle dans ces systèmes pendant le stockage est critique du fait qu'elle favorise l'hydrolyse de polymère entraînant des acides lactique et glycolique, ce qui abaisse le pH et ainsi déstabilise la protéine (Shao et Bailey, 2000). De plus, l'humidité résiduelle dans ces systèmes particuliers induit l'agrégation de la protéine par dimérisation covalente durant le stockage entraînant une libération incomplète.

# **Matériel et Méthodes**

Dans cette partie de la thèse, nous décrivons le matériel utilisé pour l'extraction jusqu'à la caractérisation des échantillons élaborés.

## **I. Matériel et produits chimiques**

Les produits utilisés lors des expériences sont :

Guaiacol (2-méthoxyphénol) (Sigma), pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzène); catéchol (1,2-dihydroxybenzène), anisole (méthoxybenzène); albumine sérique bovine (BSA), Comassie bleu brillant R250 (Bio-Rad). 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS), L'acide poly-lactique (PLA; PM: 150 000 g/mol, densité: 1,21 g/cm<sup>3</sup>), l'alcool polyvinylique (PVA; PM, 13 000–23 000 g/mol). Les tampons utilisés étaient A: tampon MES 50 mM contenant 2 mM MnSO<sub>4</sub> à pH 6, B: tampon HEPES 50 mM contenant NaCl 25 mM à pH 6,4, C: tampon MOPS 25 mM à pH 7,1, D: tampon phosphate 100 mM pH 6,5 contenant 1% (p/v) de polyvinylpyrrolidone (PVPP), E: tampon phosphate de sodium 200 mM à pH 6,6, et F: tampon phosphate 50 mM à pH 7,4.

L'appareillage utilisé pour les différentes caractérisations sont :

- Les protéines marqueurs et supports de chromatographie utilisés pour la purification sont : Sephacryl S-200 haute résolution (HR) (2,5 cm x 150 cm), la colonne Mono Q-Sepharose (2,6 cm × 50 cm) de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Suède) et la colonne HPLC Shodex Protein® WK-802.5 (8 mm × 300 mm) provient de Showa Denko KK (Kawasaki, Japon).
- Analyseur de protéines utilisant un système de séquenceur de protéines automatisé en phase gazeuse (modèle 473A, ABI) a été fourni par Applied Biosystems (Foster City, Californie).
- Thermobalance simultanée (LINSEIS STA PT 1600, Allemagne) pour L'analyse thermogravimétrique (ATG) de polymère PLA et les microcapsules ;
- Spectrométrie infrarouge à transformée Fourier pour l'identification des groupements et les liaisons entre les molécules formées (IR Affinity-1. CE, Shimadzu, Japon) ;
- Microscopie électronique à balayage pour la morphologie des molécules (S-800 Hitachi, Japon) ;

- Ultra-turrax pour la dispersion des peroxydases (T-25 basic IKA-WERK, Allemagne) ;
- Centrifugeuse pour la séparation des phases des extraits (Sigma 2–16K, Sartorius, Allemagne) ;
- Lyophilisateur pour le séchage à froid des poudres préparées (Alpha1-4 LD Plus, Christ, Osterode am Harz, Allemagne) ;
- Spectrophotométrie UV-visible pour la détermination de l'activité enzymatique et d'autres dosages (Shimadzu UV-2700 ; Kyoto, Japon).

## II. Caractérisation et optimisation des conditions réactionnelles de l'extrait du navet blanc

**II.1. Matériel végétal :** La présente étude s'est portée sur la variété de navet *Brassica rapa.L* provenant du marché local de la ville de Béjaia. Ce légume a été lavé avec de l'eau courante afin d'éliminer les traces de poussières, puis les tiges de navet ont été séparées des racines qui sont utilisées dans cette étude. Les racines du navet sont râpées puis congelées pendant 48 h avant la lyophilisation. L'échantillon lyophilisé en poudre est conservée à la température de - 20 °C.

### II.2. Paramètres physique-chimiques

Dans ce travail, les caractéristiques physico-chimiques ont été réalisées sur la variété de navet blanc.

**II.2.1. Humidité :** La teneur en humidité a été déterminée en séchant l'échantillon à poids constant dans un four à 70 °C jusqu'à la stabilisation du poids (Martinez et al., 2010).

La mesure du pourcentage d'humidité est calculée par l'équation :

$$\text{Pourcentage D'humidité}(\%) = \frac{P1 - P2}{P1 - P3} \times 100$$

P1 : le poids de l'échantillon frais + le poids de la boîte pétri ;

P2 : le poids de l'échantillon après séchage + le poids de la boîte pétri ;  
 P3 : le poids de la boîte pétri vide.

**II.2.2. pH et acidité :** Le pH de la racine du navet est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (HANNA instruments, Romania). Pour l'acidité, le jus d'échantillon a été dilué (1/5) puis titré à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) (0,01 N) en présence d'un indicateur coloré (phénolphtaléine) jusqu'à apparition d'une coloration rose (Martinez et al., 2010). L'acidité du jus de navet est exprimée en gramme d'acide citrique par litre de jus selon l'équation suivante :

$$L'acidité(g/L) = \frac{C_{NaOH} \times V_{NaOH} \times MM}{Prise\ d'essai}$$

$C_{NaOH}$  : concentration de la solution de soude (0,01 mol/L) ;

$V_{NaOH}$  : volume de la soude ajouté (mL) ;

Prise d'essai : masse de l'échantillon utilisé pour le test ;

MM : masse molaire de l'acide citrique (192,124 g/mol).

**II.2.3. Cendres :** La teneur en cendres a été déterminée selon le protocole défini par Martinez et collaborateurs (Martinez et al., (2010) avec quelques modifications, soit, 3 g de l'échantillon de navet est mis dans un four à moufle (Nabertherm, Germany) à 500 °C pendant 3h30.

La formule suivante a permis de calculer la teneur en cendres :

$$Cendres\ (\%) = \frac{PBS}{PBH} \times 100$$

PBS : poids sèche (g) ;

PBH : poids de la base humide (g).

**II.2.4. Brix :** Le pourcentage du Brix est défini comme étant le taux de matière sèche soluble exprimé en g pour 100 g de l'extrait de navet. Le Brix est déterminé par lecture directe à l'aide d'un réfractomètre d'ABBE (ABBE type refractometer) (Martinez et al., 2010).

**II.2.5. Sucres totaux :** Les sucres totaux sont extraits en mélangeant 1 g d'échantillon frais avec 10 mL d'acide sulfurique (0,5 M), puis le mélange est incubé à 105 °C pendant 3 heures.

Le dosage des sucres consiste à ajouter un volume de 0,3 mL du mélange précédent à 0,3 mL de phénol (5%) et 1,5 mL d'acide sulfurique concentré. Après incubation pendant 5 min à 105 °C, les absorbances sont mesurées à 490 nm par spectrophotomètre ultra-violet (SECOMAM, France) (Dubois et al., 1956). Les teneurs en sucres totaux sont exprimées en mg équivalent de glucose par 100 g de matière fraîche.

**II.2.6. Protéines :** Les protéines sont extraites en mélangeant 50 g d'échantillon dans 50 mL d'eau distillée, puis centrifuger à 5000 tr/min pendant 10 minutes, et récupérer le surnageant par filtration.

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). En mélangeant 200 µL de l'extrait avec 2,5 mL du réactif de Bradford. Après agitation, le mélange est incubé pendant 10 min à l'obscurité. Utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme standard. Les absorbances sont mesurées à 595 nm. La teneur en protéines est exprimée en mg équivalent de BSA par 100 g de matière fraîche.

### **II.3. Optimisation des paramètres de dosage de l'activité enzymatique des peroxydases**

**II.3.1. Préparation de l'extrait enzymatique :** Les racines de navet ont été lavées et broyées, l'homogénat brut a été préparé avec 400 mL de solution tampon de phosphate citrate (0,5 M, pH 6,0) et homogénéisé par ultra-turrax pendant 2 min. L'homogénat a été centrifugé à 5000 tr/min pendant 20 min, et le surnageant contenant des peroxydases a servi d'extrait enzymatique utilisé dans l'étude préliminaire de l'optimisation du dosage de l'activité peroxydases et pour les étapes ultérieures de la purification de l'enzyme.

**II.3.2. Effet du pH :** L'activité du POD a été déterminée à des valeurs de pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 9 en utilisant une solution tampon de phosphate de citrate 0,5 M. L'effet du

pH sur l'activité du POD a été déterminé en utilisant un mélange réactionnel contenant 50 µL de gaïacol, 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 25 mL de tampon phosphate citrate (0,5 M) avec différents niveaux de pH 3,0 à 9,0 et 20 µL d'extrait enzymatique.

**II.3.3. Effet de la température :** La solution du mélange réactionnel qui contient 50 µL de gaïacol, 25 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 25 mL de solution tampon de phosphate citrate (0,5 M, pH 6,0) a été incubée 10 min à différentes températures allant de 5 °C à 70 °C avant l'addition de l'extrait enzymatique. Des mesures spectrophotométriques UV ont été effectuées chaque min pour déterminer l'effet de la température sur l'activité de la peroxydase du navet.

**II.3.4. Effet de la force ionique :** L'effet de la force ionique sur l'activité du POD a été déterminé en mesurant l'activité de l'enzyme avec différentes concentrations de NaCl (0,5-2 M) dans une solution tampon de phosphate citrate pH 6,0 (0,5 M) à une concentration fixe de gaïacol et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**II.3.5. Détermination de l'activité peroxydase :** L'activité peroxydase est déterminée selon la méthode de Lobarzewski (Lobarzewski et al., 1990) par lecture au spectrophotomètre UV-visible d'absorbance de tétra-gaïacol qui a été mesurée à 470 nm ( $\epsilon_{470 \text{ nm}} = 26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) en présence de gaïacol et de peroxyde d'hydrogène en 1 minute (Lobarzewski et al., 1990). L'activité enzymatique a été déterminée en utilisant 980 µL de mélange réactionnel contenant 100 µL de gaïacol (45 mM), 50 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (22,5 mM) et 50 mL de solution tampon de phosphate de citrate (0,5 M) en plus de 20 µL d'extrait enzymatique. Une unité d'activité enzymatique (U/mg) a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 1 µmol de tétragaïacol par minute dans les conditions du test (Shih et al., 1971). Les absorbances ont été lues par un spectrophotomètre UV-vis. L'activité enzymatique a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Activite enzymatique (U/mL)} = V_t \times m / \epsilon \times D \times V$$

V<sub>t</sub>, m,  $\epsilon$ , D et V sont le volume total de la réaction (mL), masse de l'échantillon, le coefficient d'extinction molaire (26600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>), la distance du passage de la lumière, et le volume de l'enzyme (mL), respectivement. Une unité d'activité peroxydase a été définie

comme la quantité d'enzyme nécessaire pour catalyser l'oxydation de 1  $\mu\text{mol}$  de gaïacol par minute dans les conditions expérimentales utilisées.

### II.3.6 Optimisation de l'activité enzymatique avec la méthodologie des surfaces de réponse

**a. Conception expérimentale :** Dans cette partie, nous avons utilisé le plan expérimental de Box-Behnken qui comprenait trois variables et trois niveaux factoriels. Les variables indépendantes utilisées étaient le pH ( $x_1$ ), la température ( $x_2$  ; °C) et la concentration en NaCl ( $x_3$  ; mol / L), tandis que la réponse variable dépendante était l'activité de la peroxydase. Les résultats de l'optimisation de l'activité POD par méthodologie de séquence ont été utilisés pour les niveaux des trois paramètres : pH (0,5-1,5), température (25-35 °C) et concentration en NaCl (5-7M) pour l'optimisation avec RSM.

**b. Construction et validation du modèle :** La procédure de régression de surface de réponse de JMP 10 (système d'analyse statistique Inc., SAS) a été utilisée pour analyser les données expérimentales. La qualité des modèles mathématiques a été évaluée par l'ANOVA, les données expérimentales ont été ajustées à un modèle polynomial de second ordre et les coefficients de régression utilisés dans l'analyse de la surface de réponse ont été obtenus selon l'équation générale suivante (équation 1).

$$y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i x_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} x_i x_j \quad (i \neq j) \quad (\text{Eq. 1})$$

Où  $\alpha_0$ ,  $\alpha_i$ ,  $\alpha_{ii}$  et  $\alpha_{ij}$  sont les coefficients de régression pour les termes d'interception, linéaire, quadratique et d'interaction, respectivement ;  $x_i$  et  $x_j$  sont les variables indépendantes.

Les données expérimentales ont ensuite été ajustées au modèle de régression sélectionné pour parvenir à une bonne compréhension de la corrélation entre chaque facteur et les différentes réponses. Les conditions optimales de l'activité peroxydase du navet dépendaient du pH, de la température, du tampon de réaction et de la concentration de NaCl, ces valeurs de paramètres ont été obtenues en utilisant l'équation prédictive de RSM. Les valeurs expérimentales et prédites des réponses ont été comparées afin de déterminer la validité du modèle. Une méthodologie de

surface de réponse basée sur une conception de Box-Behnken (BBD) pour la détermination de l'activité POD a été réalisée pour optimiser le processus. Les niveaux de facteur ont été codés comme + (faible), 0 (point central ou milieu) et - (élevé). La conception expérimentale a été réalisée en double et les résultats de 30 essais sont indiqués dans le tableau VII.

Tableau VII : Facteurs et niveaux pour la méthodologie de surface de réponse de la matrice de conception de Box-Behnken (en niveaux codés et non codés de trois variables), avec les valeurs de réponse expérimentales (observées) et prédites.

Numéro des essais	Niveaux des variables			Activite Enzymatique	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Observe	Prédicte
1	5 (-)	25 (-)	1 (0)	1725,854	1601,069
2	7 (+)	25 (-)	1 (0)	2154,853	2049,225
3	5 (-)	25 (-)	1 (0)	1725,854	1601,069
4	7 (+)	25 (-)	1 (0)	2154,853	2049,225
5	5 (-)	30 (0)	1,5 (+)	2751,505	2634,364
6	7 (+)	35 (+)	1 (0)	1291,925	1367,333
7	6 (0)	30 (0)	1 (0)	4063,155	4009,188
8	6 (0)	25 (-)	1,5 (+)	2100,611	2388,734
9	6 (0)	30 (0)	1 (0)	4003,983	4009,188
10	6 (0)	25 (-)	0,5 (-)	2085,818	2137,997
11	7 (+)	35 (+)	1 (0)	1324,799	1367,333
12	6 (0)	30 (0)	1 (0)	3872,489	4009,188
13	6 (0)	30 (0)	1 (0)	4018,776	4009,188
14	6 (0)	30 (0)	1 (0)	4092,741	4009,188
15	5 (-)	35 (+)	1 (0)	1727,498	1851,206
16	5 (-)	30 (0)	0,5 (-)	2118,692	1973,034
17	6 (-)	25 (-)	1,5 (0)	1469,442	1601,069
18	5 (-)	35 (+)	1 (0)	1763,659	1851,206
19	5 (-)	30 (0)	0,5 (-)	1750,509	1973,034
20	6 (0)	35 (+)	1,5 (+)	2087,462	2327,446
21	7 (+)	30 (0)	0,5 (-)	1840,911	2211,178
22	6 (0)	35 (+)	1,5 (+)	2608,506	2327,446
23	7 (+)	30 (+)	0,5 (-)	2411,265	2211,178
24	6 (0)	25 (-)	0,5 (-)	2149,100	2137,997
25	5 (-)	30 (0)	1,5 (+)	2687,402	2634,364
26	6 (0)	35 (+)	0,5 (-)	1880,359	1767,528

Numéro des essais	Niveaux des variables			Activite Enzymatique	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Observe	Prédicte
27	6 (0)	35 (+)	0,5 (-)	1942,819	1767,528
28	7 (+)	30 (0)	1,5 (+)	2342,231	2360,504
29	7 (+)	30 (0)	1,5 (+)	2455,644	2360,504
30	6 (0)	30 (0)	1 (0)	4003,983	4009,188

$x_1$ , pH du milieu réactionnel;  $x_2$ , température du milieu réactionnel ( $^{\circ}\text{C}$ );  $x_3$ , concentration de NaCl (M); l'activité de la peroxydase a été exprimée en U/mg,

#### II.4. Purification de l'extrait enzymatique du navet

**II.4.1. Préparation de l'extrait brut :** Une masse de 200 g de racines de navet a été homogénéisée par ultra-turrax à  $4^{\circ}\text{C}$ , dans le tampon phosphate citrate 100 mM pH 6,5 contenant 1% (p/v) de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Pour éliminer les particules solides fibreuses en suspension, le mélange d'homogénat a été rapidement filtré sur du coton et centrifugé (Maciel et al., 2007), Le surnageant a été utilisé comme solution de l'extrait enzymatique riche en peroxydases,

**II.4.2. Fractionnement au sulfate d'ammonium :** Un volume de 400 mL de l'extrait enzymatique brut contenant 950000 unités a été fractionné de manière différentielle via un sel de sulfate d'ammonium  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Le sel a été ajouté à l'extrait sous agitation constante pendant une nuit à froid (dans de la glace) pour une précipitation complète des protéines, L'extrait brut a été porté à 30% de saturation en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en ajoutant lentement 176 g/L en poudre de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  sous agitation, On a laissé la solution reposer pendant 1 h et le précipité formé a été éliminé par centrifugation, Le fluide surnageant a ensuite été amené à une saturation de 80%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (351 g/L) et le précipité qui contenait une activité enzymatique a été dissous dans le tampon HEPES 50 mM contenant NaCl 25 mM à pH 6,4, La matière insoluble a été éliminée par centrifugation, Les fractions collectées avec une précipitation sélectionnée de 30 à 80% de saturation ont été analysées pour l'activité peroxydase, la teneur totale en protéines et l'activité spécifique,

**II.4.3. Chromatographie par filtration sur gel :** un volume de 30 mL du surnageant a été chargé sur une colonne Sephacryl S-200 HR qui a été pré-équilibrée avec le tampon

HEPES 50 mM contenant NaCl 25 mM à pH 6,4. L'élution de la peroxydase a été réalisée avec le même tampon à un débit de 1 mL/min. Les fractions contenant les peroxydases (éluées à 1,2 volume vide) ont été rassemblées. La concentration en protéines et l'activité enzymatique ont été déterminées.

**II.4.4. Chromatographie d'échange d'anions :** Les fractions rassemblées de la colonne Sephacryl S-200 HR ont été appliquées à un échangeur d'anions Mono Q-Sepharose équilibré avec tampon C. La colonne a été lavée abondamment avec du tampon C jusqu'à ce que l'absorbance de l'effluent à 280 nm (A<sub>280</sub> nm) soit nulle, Aucune activité peroxydase n'a été détectée dans le flux de lavage. L'élution a été induite avec un gradient linéaire (650 mL de 0 à 500 mM) dans le tampon MOPS 25 mM à pH 7,1, à une vitesse de 0,5 mL/min. Les fractions ont été collectées manuellement et évaluées pour la présence de protéines en mesurant l'absorbance à 280 nm et en déterminant l'activité peroxydase à 470 nm. L'activité peroxydase a été éluée entre 150 et 220 mM NaCl. Les fractions regroupées contenant les peroxydases ont été concentrées (Amicon 30-kDa), lyophilisées, puis utilisées pour la caractérisation enzymatique,

**II.4.5. Concentration par ultrafiltration :** La technique présente l'avantage à la fois, de concentrer et de dessaler une solution protéique à l'aide des tubes Amicon (Millipore PM 10Kd) permettant d'éliminer les sels. Les protéines collectées ont été ultra-filtrés séquentiellement en utilisant une unité d'ultrafiltration Millipore à travers des membranes de cellulose avec différentes limites de poids moléculaire (MW) ( Zhou et al., 2012).

**II.4.6. Détermination de la concentration protéique :** La concentration en protéines à chaque étape de la procédure de purification a été déterminée sur la base de la méthode de Bradford, en utilisant le dosage de protéine avec BSA comme standard. L'absorbance a été mesurée à 595 nm (A<sub>595</sub> nm) (Bradford, 1976),

**II.4.7. Méthodes analytiques :** Le poids moléculaire de la sous-unité de l'enzyme peroxydase purifiée a été estimé par électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide (SDS-PAGE) dans des conditions réductrices (Laemmli, 1970). Des bandes de protéines ont été colorées avec du bleu brillant de Coomassie

R250, Dans les conditions non réductrices (natives), le poids moléculaire de peroxydase a été résolu par rapport aux marqueurs protéiques standard et confirmé par chromatographie par filtration sur gel d'exclusion de taille en utilisant une colonne HPLC Shodex Protein® WK-802,5, pré-équilibrée avec le tampon (Allala et al., 2019), L'analyse zymographique de l'activité peroxydase a été réalisée en incubant des gels SDS pendant 30 min dans un mélange constitué de 28 mL de tampon MES 50 mM contenant 2 mM MnSO<sub>4</sub> à pH6, 1 mL de gaïacol 200 mM et 1 mL de 500 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Les gels colorés ont finalement été lavés avec de l'eau bidistillée. Les bandes TRP spécifiques ont été électro-transférées sur une membrane de transfert de difluorure de polyvinylidène et les résidus N-terminaux ont été identifiés par dégradation d'Edman avec un séquenceur de protéines automatisé ABI,

## **II.5. Caractérisation spectrale et physico-chimique des peroxydases des racines du navet blanc purifié.**

**II.5.1. Test spectral :** Le spectre d'absorption de 200 à 700 nm de peroxydase du navet purifié a été enregistré sur un spectrophotomètre UV-vis à température ambiante (23 ± 2 °C). La réduction enzymatique a été obtenue par le dithionite de sodium. La teneur en protohème a été déterminée par la méthode pyridine ferro-hémochrome (Yumoto et al., 2000). La teneur en hème a été calculée sur la base du coefficient d'extinction (34 500 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) de l'hémochrome b de pyridine,

**II.5.2. Analyse par spectroscopie FT-IR :** L'utilisation de la technique FT-IR vise à analyser les fonctions chimiques présentes dans l'échantillon en détectant les vibrations caractéristiques des liaisons chimiques. L'extrait enzymatique du navet a été analysé avec FTIR (spectromètre IR Affinity-1 CE, Shimadzu, Japon), Le spectre de transmittance a été enregistré par balayage dans la plage de 400 à 4000 cm<sup>-1</sup>,

**II.5.3. Effet de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :** L'effet de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activité catalytique de la peroxydase de navet purifié a été étudié en faisant varier la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les conditions expérimentales, Le taux de génération de couleur a été surveillé à 470 nm et converti en activité apparente, qui a ensuite été exprimée en activité relative par rapport à celle mesurée dans les conditions de dosage standard décrites ci-dessus,

**II.5.4. Effets de différents inhibiteurs et ions métalliques sur la stabilité de la peroxydase du navet :** Les effets des inhibiteurs et des réactifs de la protéine hème ont été étudiés à l'aide d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ), de cyanure de potassium (KCN), de L-cystéine, d'hydroxylamine, d'iodoacétamide, d'acide 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoïque (DTNB), de SDS, de  $\beta$ -mercaptoéthanol ( $\beta$ -ME) et DL-dithiothréitol (DL-DTT). L'activité de peroxydase restante a été mesurée après la préincubation avec chaque inhibiteur pendant 1 h à 55 °C.

**II.5.5. Effets de différents pH sur l'activité et la stabilité de la peroxydase du navet :** L'activité de la peroxydase purifiée a été mesurée à partir une gamme de pH de 2 à 11 à 55 °C en utilisant du guaiacol, Sa stabilité au pH a été déterminée par pré-incubation dans des solutions tampons de 4 à 8 à 30 °C pendant 12 h. Des aliquotes ont été prélevées et l'activité enzymatique résiduelle a été déterminée dans des conditions optimales. Les systèmes tampons, complétés avec 2 mM de  $\text{MnSO}_4$ , ont été utilisés à 50 mM (Jaouadi et al., 2014).

**II.5.6. Effets de différentes températures sur l'activité et la stabilité de la peroxydase du navet :** L'effet de la température sur l'activité peroxydase a été vérifié à des température allant de 30-80 °C et à pH 6 pendant 5 minutes en utilisant du guaiacol, Sa stabilité thermique a été déterminée par incubation à 40, 50 et 60 °C et pH 6 pendant 12 h avec et sans 2 mM de  $\text{MnSO}_4$ , Le peroxydase non chauffé a été considéré comme un témoin (100%) comme décrit ailleurs (Rekik et al., 2019),

**II.5.7. Mesures cinétiques :** Les paramètres cinétiques ont été évalués sur la base des taux des activités initiaux des peroxydases du navet (TRP) purifiées et de raifort (HRP), en utilisant le gaïacol, le pyrogallol, le catéchol et l'anisole, Les valeurs de pH et de température utilisées dans l'étude cinétique ont été ajustées aux conditions optimales pour chaque enzyme (TRP à pH 6 et 55 °C et HRP à pH 7 et 40 °C), La réaction a été réalisée à différentes concentrations de substrat allant de 1 à 50 mM, pendant 2 minutes dans un tampon avec des concentrations enzymatiques constantes à un volume final de 1 mL. Les constantes cinétiques apparentes, les valeurs  $K_m$  et  $V_{max}$  ont été estimées par des graphiques Lineweaver – Burk et calculées à l'aide du logiciel Hyper32.

### **III. Activité antioxydante et la teneur en composés bioactifs**

**III.1. Préparation des extraits :** L'extraction a été réalisée à l'aide de quatre solvants de polarités différentes (eau distillée, (méthanol, éthanol, acétone diluent avec l'eau à 50%)). Pour définir le solvant le plus efficace pour l'activité antioxydante du navet, l'extraction selon Georgé et collaborateurs (Georgé et al., 2005) consiste à mélanger 2 g de poudre d'échantillon dans 50 mL de chaque solvant. Chaque mélange est agité puis homogénéisé en le plaçant dans le bain sonicateur à une amplitude de 50 % pendant 10 min. Les mélanges sont centrifugés à 5000 rpm pendant 10 min puis filtrés obtenant ainsi des extraits bruts stockés à une température de 4 °C.

#### **III.2. Teneurs en composés bioactifs**

**III.2.1. Détermination du contenu phénolique total :** Les teneurs en composés phénoliques totaux sont déterminées en utilisant la méthode spectrophotométrique Folin-Ciocalteu décrite dans les travaux de Djeridane et collaborateurs (Djeridane et al., 2006). Le Folin-Ciocalteu a la capacité d'oxyder les ions phénolates résultant de la formation du complexe de carbonate de sodium ajouté à la solution d'extrait. Une couleur bleue est observée dont l'intensité reflète la concentration des composés phénoliques dans un extrait. La méthode consiste à mélanger 200 µL d'extrait avec 600 µL de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) et 600 µL de réactif folin-Ciocalteu. L'ensemble est incubé pendant une heure dans l'obscurité. Les absorbances sont mesurées à 750 nm et les teneurs en composés phénoliques totaux sont déduites d'une équation de régression linéaire d'une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique.

**III.2.2. Détermination de la teneur totale en flavonoïdes :** Les teneurs en flavonoïdes ont été mesurées par le dosage colorimétrique du chlorure d'aluminium (Zhishen, et al, 1999). Selon la méthode de Kim et collaborateurs (Kim et al., 2003), des volumes de 200 µL d'extraits, 800 µL d'eau distillée et 60 µL de solution à 5 % de  $\text{NaNO}_2$  % ont été mélangés. Après 5 minutes, 60 µL de  $\text{AlCl}_3$  à 10% ont été ajoutés et 400 µL de NaOH (1 M) ont été ajoutés après une minute. La solution est mélangée et les absorbances ont été mesurées immédiatement à 510 nm. Les concentrations de flavonoïdes sont déterminées en se référant à la courbe d'étalonnage réalisée avec la

quercétine. Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent quercétine pour 100 g d'extrait (mg EQ/100 g).

**III.2.3. Détermination de la teneur totale en tanins condensés :** Les tanins condensés également connus sous le nom de proanthocyanidines sont des polyphénols de haut poids moléculaire. Ils résultent de la polymérisation d'unités flavan-3-ol. Dans un environnement acide, les tanins condensés se dépolymérisent et se transforment en anthocyanidols rouges spécifiques, mesurables par spectrophotométrie (Scalbert et al., 1989), La méthode, selon Scalbert et collaborateurs (Scalbert et al., 1989) consiste à mettre 250 µL de chaque extrait et 1 mL de la solution de ferrosulfate (FeSO<sub>4</sub>) préparée dans du butanol-HCl (3:2). Le mélange est incubé à 95 °C pendant 15 minutes et les absorbances ont été mesurées à 530 nm. Le calcul de la concentration des proanthocyanidines permet d'obtenir des résultats qui s'expriment selon l'équation suivante:

$$C(\text{mg/mL}) = \frac{A * V * MM * V_2 * DF}{\epsilon * L}$$

*A*: Absorbance;

*V*: volume total de la réaction (mL);

*MM* : Masse molaire de cyanidine ( 287,24 g/mol) ;

*V<sub>2</sub>* : Volume de l'extrait aqueux récupéré après extraction à l'éther diéthylique (mL) ;

*FD*: facteur de dilution de l'échantillon analysé ;

*L*: Longueur du chemin (cm<sup>-1</sup>) ;

*ε*: Coefficient d'extinction molaire (34,700 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).

### III.3. Evaluation de l'activité antioxydante

**III.3.1. Activité anti-radicalaire DPPH :** La DPPH est un radical accepteur d'hydrogène libre. Il perd sa coloration native lorsqu'il se lie aux substances antioxydantes qui lui transfèrent des électrons ou des protons. La forme réduite de DPPH donne à la solution une couleur jaune (Gulcin et al., 2003). La détermination de l'activité antioxydante par le radical DPPH a été réalisée selon la méthode de Dahmoune et collaborateurs (Dahmoune et al., 2013) où un volume de 1 mL de DPPH est ajouté à 100 µL de chaque extrait (le contrôle contient 1 mL de DPPH + 100 µL de chaque solvant). Après 30 minutes d'incubation dans l'obscurité, les absorbances ont

été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre à 515 nm. Les résultats sont exprimés selon la formule suivante :

$$\text{Inhibition du radical DPPH (\%)} = \frac{(A_c - A_e)}{A_c} \times 100$$

*Ac*: Absorbance du contrôle ;

*Ae*: Absorbance de l'échantillon,

**III.3.2. Activité anti-radicalaire ABTS :** Le test est basé sur la capacité de différentes substances à éliminer le cation radicalaire. Le cation radicalaire a été préparé en mélangeant une solution mère d'ABTS 7 mM avec du persulfate de potassium 2,45 mM (v / v) et en laissant le mélange pendant 4-16 h jusqu'à ce que la réaction soit terminée et que l'absorbance soit stable. Après un volume de 20 µL de l'extrait a été ajouté à 180 µL d'ABTS<sup>+</sup>, les absorbances ont été mesurées à 734 nm (Sellem et al., 2016). L'activité antioxydante d'échantillon testé a été calculée en déterminant la diminution de l'absorbance à différentes concentrations en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Inhibition du radical ABTS (\%)} = \frac{(A_c - A_t)}{A_c} \times 100$$

*Ac*: absorbance de l'étalon ;

*At* : absorbance de l'échantillon.

**III.3.3. Pouvoir réducteur :** Le test est utilisé pour la détermination de l'activité antioxydante. Le principe de cette technique consiste à réduire un complexe ferrique (Fe<sup>3+</sup> -TPTZ) en sa forme ferreuse (Fe<sup>2+</sup> -TPTZ) en présence d'antioxydants (Alvarez-Suarez et a., 2009). La solution FRAP est préparée sur la base de trois constituants qui sont le tampon, TPTZ et FeCl<sub>3</sub> avec un rapport de 10, 1,1 (v/v/v) respectivement. Un volume de 100 µL de chaque extrait est ajouté à 3 mL du réactif FRAP. Après 30 minutes d'incubation à 37 °C, les absorbances ont été mesurées à 595 nm (Tenore et al., 2012). Les concentrations des composés réducteurs présents dans les extraits sont exprimées en mg d'équivalent Trolox pour 100 g d'extrait (mg EAG/100 g).

**III.3.4. Pouvoir chélateur des ions ferreux :** L'activité de chélation des ions ferreux a été mesurée selon la méthode décrite par Madoui et collaborateurs (Madoui et al., 2018) avec quelques modifications. Le mélange réactionnel contient 500 µL d'extrait, 100 µL de Fe<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,6 mM) et 900 µL de méthanol. Le contrôle contient tous les

réactifs de réaction sauf l'échantillon qui est remplacé par le solvant d'extraction. Le mélange a été agité et incubé à température ambiante pendant 5 minutes, 100 µL de ferrozine (5 mM) ont ensuite été ajoutés, le mélange a été agité à nouveau. Après une minute d'incubation, l'absorbance du complexe Fe<sup>+2</sup>-ferrozine est mesurée à 562 nm contre un blanc contenant tous les réactifs de réaction sauf la ferrozine qui est remplacée par le méthanol. La capacité de chélation du fer est exprimée en pourcentage (%) et est déterminée avec la formule suivante :

$$\text{Pourcentage de chélation du Fer} = \frac{(A_c - A_e)}{A_c} \times 100$$

*A<sub>c</sub>*: absorbance du contrôle ;

*A<sub>e</sub>*: absorbance en présence d'extrait,

**III.3.5. Activité anti-radicalaire OH :** Le test d'élimination des radicaux hydroxyles a été réalisé selon la méthode d'Avellar et collaborateurs (d'Avellar et al., 2004) avec quelques modifications. 1 mL de 1,10-phénanthroline (0,75 mM), 1 mL de tampon phosphate (pH 7,4) et 1 mL de FeSO<sub>4</sub> (0,75 mM) ont été soigneusement mélangés. Un volume de 1 mL de peroxyde d'hydrogène (0,12%) a été ajouté avec 1 mL d'extrait et le mélange a été incubé à 37 °C pendant 90 min puis l'absorbance a été mesurée à 536 nm.

$$\text{Inhibition du radical OH (\%)} = \frac{(A_s - A_c)}{(A_b - A_c)} \times 100$$

*A<sub>s</sub>*: L'absorbance de l'échantillon ;

*A<sub>c</sub>* : L'absorbance de la solution de contrôle, y compris la 1,10-phénanthroline, FeSO<sub>4</sub> et le peroxyde d'hydrogène ;

*A<sub>b</sub>*: L'absorbance de la solution à blanc, y compris la 1,10-phénanthroline et FeSO<sub>4</sub>,

**III.4. Analyse statistique :** Les données sur l'activité antioxydante ont été analysées à l'aide des logiciels Microsoft Excel et Graph Pad PRISM 5 (version 5.03) respectivement. Toutes les valeurs représentent la moyenne de trois répétitions indépendantes avec leur écart-type (moyenne ± écart-type). L'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) avec le test de différence le moins significatif a été utilisée pour déterminer les différences significatives (p <0,05) entre les moyennes. Le coefficient de corrélation entre les paramètres étudiés est calculé avec corrélation des

données à l'aide de la matrice de corrélation et le degré de signification des données est pris à la probabilité ( $p < 0,05$ ).

#### IV. Microencapsulation d'extrait enzymatique de navet

##### IV.1. Préparation de microcapsules par double émulsion

Après purification et caractérisation de l'extrait enzymatique à partir de l'extrait brute du navet dans la première partie de ce travail, les microcapsules d'extrait enzymatique de navet ont été préparées par la méthode double émulsion-évaporation de solvant décrite par Zheng (Zheng, 2016) avec quelques modifications. En résumé, la phase aqueuse interne de l'extrait protéique (10-100 mg) dissout dans 1 mL de solution tampon phosphate (0,5 M, pH 6) a été ajoutée à 5 mL de dichlorométhane contenant le contenu choisi (25-275 mg) d'acide poly lactique dissout (PLA). Cette émulsion primaire (W1/O) a été versée dans 20 mL d'une solution d'alcool polyvinylique (PVA) (0,1-3%) comme émulsifiant. Une double émulsion stable (W1/O/W2) a été obtenue sous agitation continue (400 tr/min) pendant une nuit. Après trois lavages à l'eau distillée, les microcapsules obtenues ont été isolées par centrifugation pendant 15 min à  $5000 \times g$  puis séchées à froid avec lyophilisateur à  $-60^\circ\text{C}$ .

##### IV.2. Optimisation de taux de l'efficacité d'encapsulation des microcapsules d'extrait enzymatique du navet avec la méthodologie surface de réponse

- **Conception expérimentale :** Dans cette étude, nous avons utilisé RSM pour optimiser la microencapsulation d'extrait enzymatique de navet (*Brassica rapa*, L) en utilisant un modèle expérimental à trois variables Box-Behnken. Les variables indépendantes utilisées étaient la concentration de PVA ( $x_1$  ; %), la concentration de PLA ( $x_2$  ; mg/mL) et la concentration de l'extrait ( $x_3$  ; mg/mL) tandis que la réponse variable dépendante était l'efficacité d'encapsulation (%).
- **Construction et validation du modèle :** Une méthodologie de surface de réponse basée sur Box-Behnken Design (BBD) pour la détermination des niveaux d'efficacité d'encapsulation d'extrait enzymatique a été réalisée pour optimiser le processus. Les niveaux de facteur ont été désignés comme codés + (élevé), 0 (moyen) et - (faible). La conception expérimentale a été réalisée en

double et les résultats de 15 essais ont été indiqués dans le tableau VIII. Les données expérimentales ont été analysées en utilisant le logiciel JMP suivant la procédure de régression de surface de réponse (Statistical Analysis System Inc, SAS) puis elles ont été ajustées à une seconde à ordre polynomial. Après cela, la qualité des modèles mathématiques a été évaluée par l'ANOVA qui a été réalisée pour vérifier la signification du modèle et du processus des variables. Les coefficients de régression ont été obtenus selon l'équation générale suivante (équation 1),

$$y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i x_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} x_i x_j \quad (i \neq j) \quad (Eq, 1)$$

Dans cette équation, Y est la réponse variable attendue associée à chaque combinaison de trois niveaux,  $x_i$  et  $x_j$  sont des variables indépendantes,  $\alpha_0$  est le coefficient d'interception du modèle ;  $\alpha_i$ ,  $\alpha_{ii}$  et  $\alpha_{ij}$  sont l'interaction des coefficients.

Le modèle a évalué les effets de chaque variable indépendante sur la réponse. L'analyse du plan expérimental et le calcul des données prédites ont été effectués à l'aide du logiciel Design-Expert pour estimer la réponse des variables indépendantes.

Les conditions optimales attendues de l'efficacité d'encapsulation d'extrait enzymatique dépendent de la concentration de PLA, de la concentration de PVA et de la concentration d'extrait enzymatique. Les valeurs des paramètres données dans le tableau VII ont été obtenues en utilisant l'équation prédictive de RSM. Ensuite, les résultats expérimentaux et prédits des réponses ont été comparés pour valider le modèle.

Tableau VIII : Facteurs et niveaux pour la méthodologie RSM de la matrice de conception de Box-Behnken (en niveaux codés et non codés de trois variables), avec les valeurs de réponse expérimentales (observées) et prédites.

Numéro des essais	Niveaux des variables			Efficacité Encapsulation (%)	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	Observé	Prédite
1	1,55(0)	30(0)	55(0)	56,08	56,67
2	1,55(0)	5(-)	10(-)	41,1	42,04
3	3(+)	30(0)	10(-)	44,09	43,27
4	1,55(0)	55(+)	100(+)	51,27	50,32
5	1,55(0)	30(0)	55(0)	57,29	56,67
6	0,1(-)	30(0)	10(-)	41,77	40,31
7	0,1(-)	5(-)	55(0)	39,47	39,98
8	3(+)	55(+)	55(0)	39,24	38,72
9	1,55(0)	55(+)	10(-)	32,89	34,21
10	0,1(-)	30(0)	100(+)	52	52,81
11	3(+)	30(0)	100(+)	53,35	54,80
12	0,1(0)	55(+)	55(0)	40,65	40,78
13	1,55(0)	30(0)	55(0)	56,63	56,67
14	3(+)	5(-)	55(0)	47,13	46,99
15	1,55(0)	5(-)	100(+)	51,29	49,96

$X_1$ , PVA (%);  $X_2$ , PLA (mg/mL);  $X_3$ , concentration d'extrait enzymatique (mg/mL); L'efficacité d'encapsulation a été exprimée en utilisant (%).

### IV.3. Caractérisation des microcapsules

**IV.3.1. Calcul de l'efficacité d'encapsulation :** Le taux d'efficacité d'encapsulation a été calculé en pourcentage de la différence de concentration initiale en protéines ( $CP_0$ ) ajoutée à la formulation et en soustrayant la concentration de protéines non encapsulées des restes dans le surnageant ( $CPS$ ) (Davda et Labhasetwar, 2002). Ainsi, les microcapsules, récupérées du surnageant obtenu après lavage, ont été analysées pour déterminer la concentration en protéines par la méthode de Bradford. L'équation suivante a été utilisée pour calculer l'efficacité d'encapsulation (EE) :

$$EE\% = \frac{(CP_0 - CPS)}{PC_0} \times 100$$

**IV.3.2. Analyse de la morphologie des microcapsules :** L'analyse morphologique des microcapsules de l'extrait enzymatique par double émulsion a été réalisée au microscope électronique à balayage (SEM) JEOL JSM-840A. Les échantillons ont été pulvérisés par petite quantité avec un micro-analyseur à rayons X à dispersion

d'énergie AN10 / 85S fonctionnant sous un accélérateur, tension de 20 kV, qui produit un courant de 1 nA et une durée de vie de 100 s.

**IV.3.3. Analyse de la taille des particules :** La taille moyenne des particules et la distribution granulométrique des microsphères PCL chargées de valsartan ont été mesurées par diffractométrie laser à l'aide du système de contrôleur d'unité de dispersion Malvern Mastersizer 2000 (Royaume-Uni), après dispersion des microsphères dans l'eau distillée en utilisant les valeurs d'indices de réfraction de l'eau qui sont égales à 1,33. La portée, une valeur mathématique indiquant la largeur de la distribution granulométrique, a été calculée comme suit :

$$P = [d(0,9) - d(0,1)] / d(0,5)$$

où  $d(0,1)$ ,  $d(0,5)$  et  $d(0,9)$  correspondent, respectivement, au diamètre des particules à 10, 50 et 90% de la distribution accumulée de l'échantillon.

**IV.3.4. Humidité des microcapsules :** La teneur en humidité des microcapsules a été mesurée à l'aide d'un analyseur d'humidité électronique. Le test a été répété trois fois et le contenu a été exprimé en pourcentage.

**IV.3.5. Analyse thermogravimétrique (ATG) :** L'analyse thermogravimétrique (ATG) a été réalisée avec une thermobalance simultanée de ATG. Les mesures ont été réalisées avec une vitesse de chauffage de 10 °C/min dans une atmosphère N<sub>2</sub> et une température allant de la température ambiante à 800 °C.

**IV.3.6. Spectroscopie infrarouge de microcapsules :** Une analyse par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) du PLA, de l'extrait enzymatique lyophilisé et des microcapsules synthétisées a été réalisée afin d'identifier les groupes fonctionnels spécifiques et les liaisons chimiques avant et après la microencapsulation, puis de prédire les propriétés physico-chimiques des matériaux analysés, les spectres ont été enregistrés de 400 à 4000 cm<sup>-1</sup>.

**IV.4. Libération in vitro :** La libération in vitro d'extrait enzymatique de navet à partir de microcapsules a été évaluée par dialyse à l'équilibre. Pour satisfaire les conditions d'immersion appropriées, deux milieux physiologiques simulés ont été préparés : acide

(gastrique, pH 2,5) et neutre (intestinal, pH 7,4). Une solution saline tamponnée au phosphate (0,5 M, pH 7), se référant aux compartiments physiologiques souhaités, a été ajustée en utilisant HCl (0,1 N) et NaOH (0,5 N). En bref, 50 mg des poudres lyophilisées d'extrait enzymatique et d'extrait encapsulé ont été pesés puis ajoutés à un sac de dialyse séparé (Jiang et al., 2002) ; Nour et al., 2014), des sacs de dialyse ont ensuite été immergés dans un godet contenant 200 mL du milieu physiologique (acide ou neutre), équipé d'un système d'agitation, et maintenus avec une vitesse d'agitation de 100 tr/min à une température de 37 °C. Après des intervalles de temps donnés, des échantillons de 1 mL sont prélevés toutes les 5 min pendant les 60 premières minutes, puis 15 minutes pendant 2 heures, et après chaque heure jusqu'à atteindre 4 heures au niveau intestinal et 30 min jusqu'à atteindre 7 heures au niveau gastrique. Après chaque prélèvement, les échantillons ont été dosés par spectrophotométrie UV-visible. Les données représentent la moyenne  $\pm$  la variation standard des mesures prises en triple. Le pourcentage de libération de protéines à différents intervalles a été calculé par l'équation suivante :

$$\text{Libération de protéines(\%)} = (C_t/C_o) \times 100$$

*C<sub>t</sub>* : Concentration en protéines au temps *t* déterminée par la courbe d'étalonnage ;  
*C<sub>0</sub>* : Concentration initiale de protéines trouvée dans les microcapsules,

**IV.5. Stabilité des microcapsules pendant le stockage :** Afin d'évaluer l'effet protecteur de la microencapsulation de l'activité POD pendant le stockage, des extraits enzymatiques encapsulés et non encapsulés de navet ont été stockés et la cinétique de dégradation de l'activité POD a été surveillée à différentes températures (25, 4 et - 20 °C) avec des périodes d'analyse jusqu'à 3 mois (7, 15, 30, 45, 60, 75 et 90 jours). Après chaque temps d'incubation, 100 mg de poudre d'extrait enzymatique ont été dissous dans un volume de 5 mL de solution tampon phosphate (0,5 M, pH 6) et 100 mg de microcapsules ont été dissous dans 5 mL de dichlorométhane. Les solutions ont été doucement agitées pendant 10 min puis centrifugées à 5000 rpm pendant 10 min. Le surnageant a été récupéré pour l'essai d'activité POD et le calcul du pourcentage d'activité résiduelle POD des microcapsules et de l'extrait enzymatique a été calculé en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Activité résiduelle (\%)} = \frac{A_t}{A_0} * 100$$

$A_t$  : Activité enzymatique des microcapsules ou extrait enzymatique au temps  $t$  ;  
 $A_0$  : Activité enzymatique initiale trouvée dans les microcapsules ou l'extrait enzymatique

**IV.6. Digestion gastro-intestinale in vitro :** Dans ce travail, la digestion gastro-intestinale in vitro des extraits enzymatiques du navet encapsulés et non encapsulés a été réalisée selon la méthode de Minekus et collaborateurs (Minekus et al., 2014). Elle consiste en une procédure de trois étapes, qui simule la digestion dans la bouche (digestion orale), l'estomac (digestion gastrique) et l'intestin grêle (digestion intestinale). Les solutions mères de liquides simulés de la digestion ont été préparées comme est indiqué dans les tableaux IX et X.

*Tableau IX : Préparation des solutions mères des liquides simulés de la digestion (Minekus et al., 2014)*

		Liquide salivaire simulé (LSS)		Liquide gastrique simulé (LGS)		Fluide intestinal simulé (LIS)	
		pH 7		pH 3		pH 7	
Constituant	Concentration de la solution mère (mol/L)	Volume de la solution mère (mL)	Concentration de la solution mère (mmol/L)	Volume de la solution mère (mL)	Concentration de la solution mère (mmol/L)	Volume de la solution mère (mL)	Concentration de la solution mère (mmol/L)
KCl	37,3	15,1	15,1	6,9	6,9	6,8	6,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	3,7	3,7	0,9	0,9	0,8	0,8
NaHCO <sub>3</sub>	84	6,8	13,6	12,5	25	42,5	85
NaCl	117	-	-	11,8	47,2	9,6	38,4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30,5	0,5	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0,06	0,06	0,5	0,5	-	-
pH d'ajustement	(mol/L)	(mL)	(mmol/L)	(mL)	(mmol/L)	(mL)	(mmol/L)
NaOH	1	-	-	-	-	-	-
HCl	6	0,09	1,1	1,3	15,6	0,7	8,4
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	mol/L		mmol/L		mmol/L		mmol/L
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	0,3		1,5 (0,75*)		0,15 (0,075*)		0,6 (0,3*)

(\*) la concentration de Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> dans le mélange de la digestion finale.

Tableau X. Concentrations recommandées d'électrolytes dans liquides simulés (LS, LG, LI), basé sur des données de la digestion humaine in vivo (Minekus et al., 2014)

	A * (mL)	B * (mL)	C * (mL)
KCl (0,5 M)	7,550	3,45	3,40
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 M)	1,850	0,45	0,40
NaHCO <sub>3</sub> (1 M)	3,400	6,25	21,25
NaCl (2 M)	/	5,90	4,80
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> (0,15 M)	0,250	0,20	0,50
NH <sub>4</sub> (CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (0,5 M)	0,030	0,25	/
HCl (6 M)	0,045	0,65	0,70

(\*) A : solutions mères ajoutées pour préparer 250 mL LS ; B : solutions mères ajoutées pour préparer 250 mL LG et C : solutions mères ajoutées pour préparer 250 mL LI.

Un échantillon de 0,5 g de poudre a été pesé dans un flacon et mis en suspension dans 40 mL de liquide salivaire simulé (LS) contenant 7,5 mg d' $\alpha$ -amylase et 25  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> (0,3 M) à pH 7 a été agité pendant 2 min à 37 °C sous agitation douce. Dans la phase gastrique, 5 mL de liquide gastrique (LG) (20 mg de pepsine et 2,5  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) ont été ajoutés à la phase orale, le pH a été ajusté à 3 avec HCl (6 M) et le mélange a été incubé à 37 °C dans un bain marié mené d'agitation pendant 2 h sous agitation douce.

Dans la phase intestinale, 10 mL de liquide intestinal (LI) avec 37,5 mg de pancréatine, 40 mg de sels biliaires et 20  $\mu$ L of CaCl<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>) ont ensuite été ajoutés à la phase gastrique. Le pH a été ajusté à 7 avec du NaOH (1 M) et le mélange a été incubé pendant 2 h dans les mêmes conditions que la phase gastrique. Les échantillons ont été centrifugés et filtrés avant chaque analyse. La procédure de la digestion in vitro est brièvement résumée dans la figure 30.

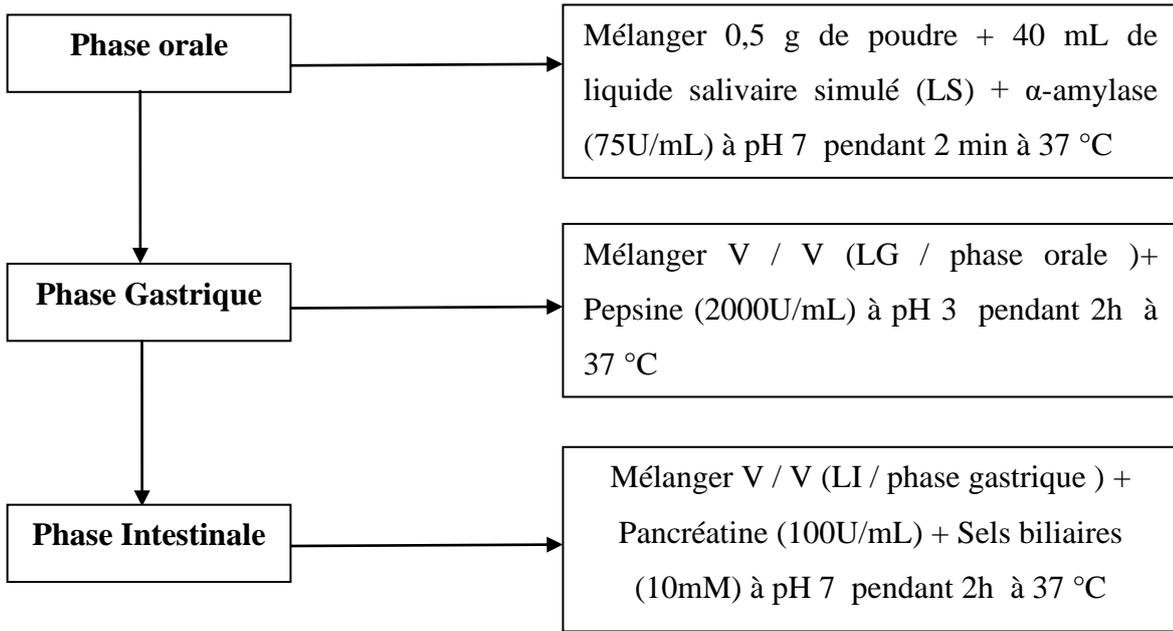


Figure 30. Etapes de la digestion gastro-intestinale in vitro d'extrait enzymatique de navet,

# **Résultats et Discussion**

## I. Caractérisation de l'extrait enzymatique du navet blanc et optimisation des conditions réactionnelles

### I.1. Paramètres physico-chimiques du navet blanc

#### I.1.1. Humidité

La teneur en humidité est le volume d'eau présent dans l'échantillon. Le taux humidité du navet blanc est de 94,28%, le résultat est illustré dans le Tableau XI La valeur de taux d'humidité enregistré dans cette étude est similaire à celui rapporté par Martinez et collaborateurs (Martínez et al., 2010) pour la variété de navet vert (*Brassica rapa var. rapa*) qui varie entre 88,03% et 92,50% et à celui réalisé par Bekhit et collaborateurs (Bekhit et al., 2013) sur différentes variétés de *Brassica*, qui ont obtenu un taux d'humidité de 94,2% pour le brocoli (*Brassica oleraceavar. Italica*) et de 93,7% pour le chou (*Brassica oleracea. L.*). Le taux d'humidité varie selon les variétés, les conditions climatiques, ainsi que le stade de maturité.

#### I.1.2. Brix

Le Brix correspond au taux de matière sèche dans un légume (Sidonia et al., 2010). D'après le résultat présenté dans le tableau XI, la teneur en brix des racines de navet blanc est de 7,75%. Cette valeur est très proche de celles rapportés par Sidonia et collaborateurs (Sidonia et al., 2010) qui ont observé des valeurs de 7,34% pour le navet vert (*Brassicarapa var. rapa*) et de 7,82% pour le chou blanc (*Brassicaoleracea var capitata*).

#### I.1.3. pH et acidité

Le pH décrit le taux d'acidité ou d'alcalinité de la solution qui dépend de la concentration en ion hydrogène (Sidonia et al., 2010). La valeur du pH obtenue dans notre étude pour la variété de navet blanc est de 6,56 (Tableau XI). Les résultats de la présente étude sont similaires à ceux obtenus par Sidonia et collaborateurs (Sidonia et al., 2010) pour les variétés *Brassicaoleracea* (6,06 à 6,44) et du chou chinois (*Brassica rapa subsp. Pekinensis*) avec une valeur de pH 6,48.

L'acidité est un paramètre important pour l'évaluation de la qualité alimentaire d'un légume. La teneur en acidité dans la présente étude est de  $64,04 \pm 4,44$  (mg/100 g MS)

(Tableau XI). Une valeur proche à celle de brocoli (*Brassica oleraceavar. Italica*) avec une teneur de  $54,4 \pm 13,10$  (mg/100 g MS) et inférieur à celle de chou-fleur (*Brassica oleraceavar. botrytis*) avec une valeur de  $89,8 \pm 3,01$  (mg/100 g MS) (Bekhit et al., 2013). La composition en acides organiques peut être affectée par divers facteurs comme la variété, l'espèces, les conditions de croissance, le stade de maturité, l'origine géographique, le type de sol et les conditions de conservation (Lo Scalzo et al., 2007).

#### **I.1.4. Cendres**

Le taux des cendres représente la quantité totale en sels minéraux présents dans un légume. Le résultat du test des cendres de la variété de navet blanc est de  $0,67 \pm 0,06$  (Tableau XI). Cette valeur est proche de résultat obtenu par Khalid et collaborateurs (Khalid et al., 2012) qui ont rapporté des valeurs de 0,82% pour le navet blanc et 0,70% pour le navet jaune (*Brassicarapa var. rapa*) mais elle est inférieure par rapport à celles enregistrées par Sidonia et collaborateurs (Sidonia et al., 2010) qui ont rapporté des valeurs de 26,3% pour le brocoli (*Brassicaoleraceavar. Italica*) et 19,2% pour le chou (*BrassicaoleraceaL*). Cette différence peut être expliquée par la différence en teneurs en minéraux des sols de plantation.

#### **I.1.5. Sucres totaux**

Les sucres sont les constituants les plus importants des légumes ; ils sont également responsables de la douceur des aliments. Le navet constitue une bonne source d'énergie rapide en raison de sa teneur élevée en sucres. L'évolution du taux de sucres après la récolte dépend principalement de la quantité et de la forme des réserves dont dispose le légume (Poiroux-gonord et al., 2010).

D'après les résultats obtenus qui sont illustrés dans le tableau XI, la teneur en sucres de la variété de navet blanc est de  $401,59 \pm 3,00$  (mg/100 g MS). Cette valeur est inférieure à celle enregistrée dans les travaux réalisés par Tenore et collaborateurs (Tenore et al., 2012) sur la même espèce (*Brassicarapa var. rapa*) dont la teneur est de 8500 (mg/100 g MS) mais elle est supérieure à celle obtenue par Jahangir et collaborateurs (Jahangir et al., 2014) pour les racines de *Brassicarapa var* avec une valeur de 195,84 (mg/100 g MS).

### I.1.6. Protéines

Les protéines et les acides aminés contribuent à la valeur nutritive et à la saveur des aliments (Sidonia et al., 2011). Les résultats de dosage des protéines de la variété du navet étudiée sont présentés dans le tableau XI. La teneur en protéines est de  $41,32 \pm 0,12$  (mg/100 g MS). Ces résultats concordent avec les résultats rapportés par d'autres auteurs pour d'autres variétés de Brassica (Ayaz et al., 2006 ; Hanif et al., 2006).

Tableau XI. Caractéristiques physico-chimiques du navet blanc.

Echantillon	Humidité (%)	Brix (%)	pH	Cendres (%)	Sucres (mg/100g)	Protéines (mg/100g)	Acidité (mg/100g MS)
Navet blanc	94,28±0,31	7,75	6,56	0,67±0,06	401,59±3,00	41,32±0,12	64,04 ± 4,44

Les paramètres physico-chimiques peuvent être affectés par la région géographique, la période de la récolte, la partie de la plante testée, différences génétiques, les stress biotiques (attaque des insectes et pathogènes) et les stress abiotiques (lumière, température, apport en éléments nutritifs, disponibilité en eau) en plus des conditions de stockage (Cartea et al., 2010).

## I.2. Optimisation les paramètres de l'activité enzymatique des peroxydases du navet blanc

### I.2.1. Méthodologie séquentielle

#### I.2.1.1. Effet du pH sur l'activité des peroxydases

L'activité POD du navet (*Brassicarapa. L*) est testée à différentes valeurs de pH. Comme l'illustre la Figure 31, la valeur de pH optimale est de 6. En général, la plupart des plantes sont caractérisées par une activité enzymatique maximale autour d'un pH neutre (Arnnok et al., 2010). Pour des valeurs de pH supérieures à 9 et inférieures à 3, la POD perd presque complètement son activité. Cette réduction d'activité à pH extrême est due à la dénaturation des enzymes (Amiour et Hambaba, 2016). Le pH optimal pour l'activité enzymatique dépend du matériel végétal, du substrat et du milieu réactionnel (Arnnok et al., 2010 ;Rezaei et al., 2017). Le pH optimal de la peroxydase de kiwi, en utilisant la p-phénylènediamine comme substrat, est de 6,0 à 8,5 (Fang et al., 2008), il est égal à environ

5,0 pour le POD extrait des fruits de nêfle et de sapota avec du gaïacol (Zhang et Shao, 2015) , la pomme de terre POD est la plus active à 6,0, et pour le bulbe d'ail, elle se situe autour de 5,5 à 6,5 avec le gaïacol comme substrat (Cai et al., 2012), en utilisant le même substrat, le pH optimal des peroxydases de dattes Ghars et Deglet Nour sont respectivement de 6,4 et 5,6 (Amiour et Hambaba, 2016). Le pH optimal de la peroxydase de châtaigne peut atteindre jusqu'à 7,0 avec du 2-méthoxy phénol comme substrat (Gong et al., 2015). Tout changement de pH affecte la structure de la protéine et une baisse de l'activité enzymatique au-dehors du pH optimal pourrait être due à l'inactivation de l'enzyme ou à son instabilité. Il est largement connu que la concentration des ions  $H^+$  et  $OH^-$  dans le milieu réactionnel influence fortement l'ionisation des groupement fonctionnels des acides aminés du site actif de l'enzyme. L'effet du pH sur l'activité enzymatique est déterminé par la nature des acides aminés de site actif, qui subit la protonation et la déprotonation, et par les changements de conformation induits par l'ionisation des acides aminés (Sabu et al., 2005 ; Battestin et Macedo, 2007).

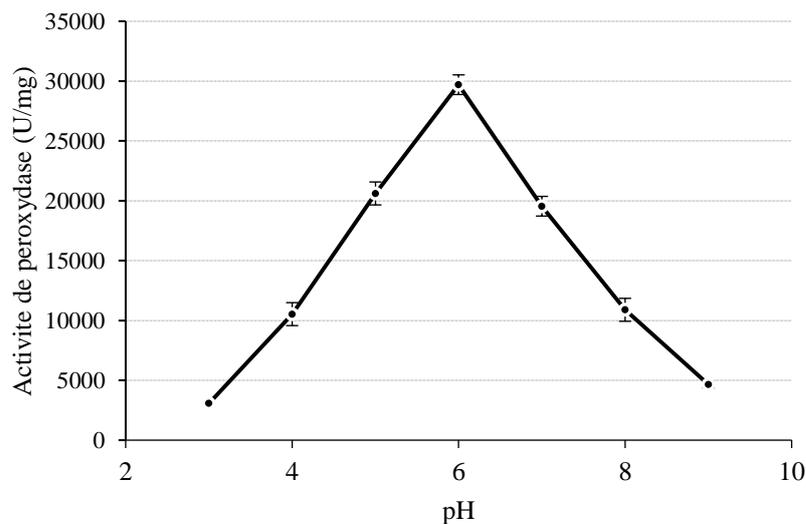


Figure 31. Influence du pH sur l'activité des peroxydases du navet

### I.2.1.2 Effet de la température sur l'activité des peroxydases

L'utilisation de différents milieux avec des températures variables (5-70 °C) a montré une augmentation graduelle de l'activité de la peroxydase pour une température allant de 5 à 30 °C, puis rapidement diminué (Figure 32). Au-delà de 50 °C, la POD est complètement inactivée. Les températures élevées rompent les liaisons responsables du maintien de la structure tridimensionnelle de l'enzyme qui induit la modification de la forme de l'enzyme

et par conséquent perturbe la réactivité du site actif. Dans ce cas, l'activité enzymatique sera réduite ou complètement supprimée (Agostini et al., 2002 ; Sáez et al., 2019). L'activité enzymatique dépend généralement de la température du milieu et plusieurs études ont été consacrées à l'étude de l'influence de la température sur l'activité POD. La température optimale pour l'activité peroxydase de la patate douce et de la laitue est d'environ 30 °C et de 40 °C pour le radis, l'ail, le sorgho et les dattes (Saraiva et al., 2007 ; Diao et al., 2011 ; Amiour et Hambaba, 2016). L'influence de la température sur l'activité enzymatique réside principalement dans l'apport de l'énergie réactionnelle propre au site actif (Daniel et al., 2008)

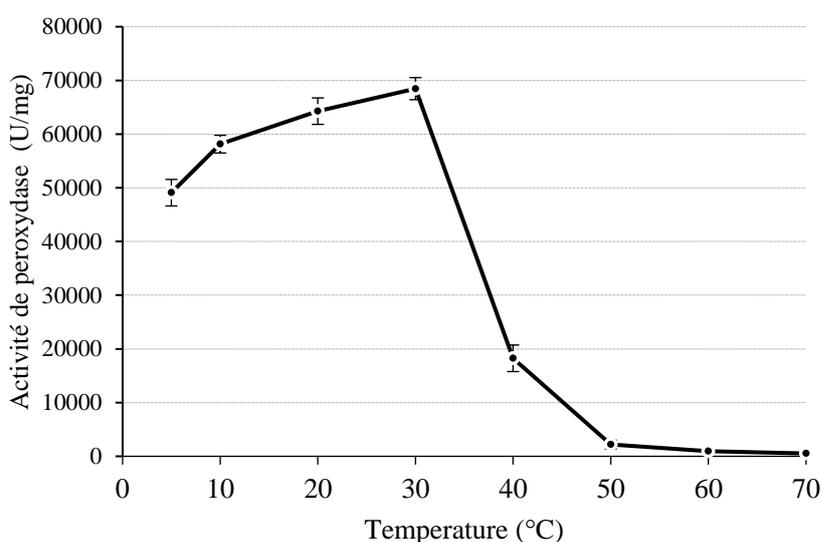


Figure 32. Influence de la température sur l'activité des peroxydases du navet

### 1.2.1.3 Effet de la concentration de NaCl sur l'activité des peroxydases

L'activité POD a augmenté avec la concentration de NaCl passant de 0 à 1 M, puis a diminué pour des concentrations plus élevées en raison de la modification de la structure de l'enzyme (Figure 33). Les réactifs les plus couramment utilisés pour l'extraction enzymatique sont le NaCl et les solutions tampons. Le NaCl augmente la force ionique du tampon, ce qui améliore l'extraction des enzymes végétales. Certains auteurs ont signalé que l'activité POD des plantes augmentait de manière significative en réponse à la salinité ; le prétraitement au sel a provoqué une augmentation significative de l'activité POD après exposition à 100 mM de NaCl (Dicko et al., 2006 ; Harinasut et al., 2003; Zeyadi and Almulaiky 2020)). L'activité des enzymes est influencée par la concentration en sel et par

conséquent par la force ionique ; en fait, à faible concentration d'électrolyte, les sels peuvent modifier la nature de la charge de surface ionique. À des concentrations élevées, les forces électrostatiques peuvent être neutralisées à la surface de l'enzyme et les structures enzymatiques tridimensionnelles (conformation, ionisation de site actifs) peuvent également être affectées (Bosco et al., 2002).

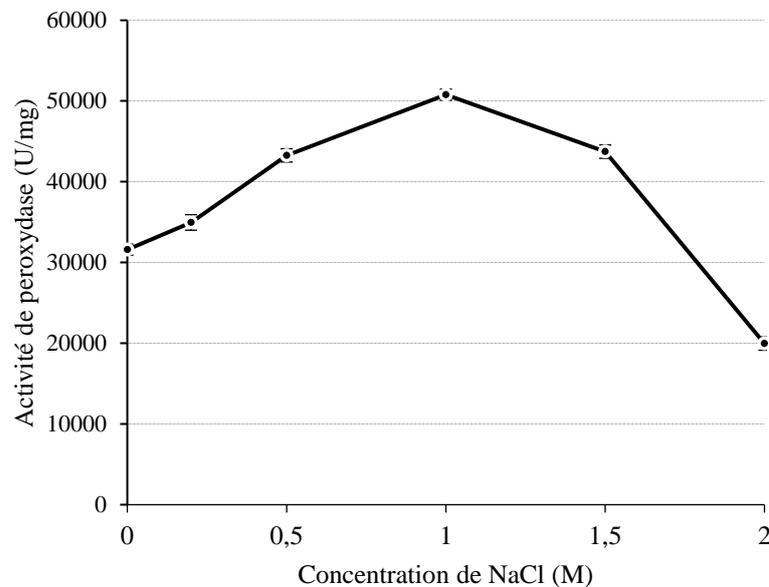


Figure 33. Influence de la concentration de NaCl sur l'activité des peroxydases du navet.

## I.2.2. Méthodologie RSM utilisant la conception Box-Behnken

### I.2.2.1 Analyse du modèle

Une étude préliminaire a été réalisée pour chaque paramètre (température, pH et concentration en NaCl), avant l'optimisation de l'activité peroxydase du navet par la méthode RSM. Les résultats de l'analyse du modèle pour l'optimisation de l'activité de la peroxydase sont énumérés dans les tableaux XII et XIII. Le coefficient de régression des termes d'interception, linéaire, quadratique et d'interaction du modèle a été calculé en utilisant la technique des moindres carrés, comme indiqué dans le tableau XII. Dans ce résultat, les paramètres linéaires ( $x_2$ ,  $x_3$ ), les trois paramètres quadratiques et les paramètres d'interaction ( $x_1x_2$ ) sont significatifs au niveau de  $p < 0,05$ , alors que le paramètre linéaire ( $x_1$ ) et deux paramètres d'interaction ( $x_1x_3$  et  $x_2x_3$ ) sont insignifiants. Le modèle quadratique

ajusté pour l'activité de la peroxydase dans les variables codées est donné dans l'équation 2:

$$\text{Activité de peroxydase} = 3726,23 + 498,94x_3 - 46,60x_1x_2 - 1076,32x_1^2 - 48,62x_2^2 - 2552,40x_3^2(2)$$

Il est évident que le paramètre linéaire ( $x_3$ ) et les trois paramètres quadratiques ont l'effet positif le plus élevé sur l'activité de la peroxydase, tandis que deux paramètres linéaires ( $x_1$ ,  $x_2$ ) et d'interaction ( $x_1x_3$  et  $x_2x_3$ ) ont un effet négatif sur l'activité de la peroxydase.

Tableau XII. Coefficient de régression, erreur standard et résultats du test t de la surface de réponse pour l'activité de la peroxydase.

Paramètre	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob.> t
Constante	3726,23	386,59	9,64	<0,0001*
$x_1$	67,09	44,85	1,50	0,1503
$x_2$	-20,55	9,28	-2,21	0,0387*
$x_3$	498,94	95,86	5,20	<0,0001*
$x_1x_2$	-46,60	12,34	-3,78	0,0012*
$x_1x_3$	-256	12,39	-1,98	0,0618
$x_2x_3$	30,92	28,33	1,09	0,2882
$x_1x_1$	-1076,32	68,31	-15,76	<0,0001*
$x_2x_2$	-48,62	2,72	-17,87	<0,0001*
$x_3x_3$	-2552,40	273,25	-9,34	<0,0001*

\* Valeurs statistiquement significatives à  $p < 0.05$ .

$x_1$  : pH;  $x_2$  : température (°C) ;  $x_3$ : Concentration de NaCl (M)

Les données ajustées suivant le modèle quadratique sont résumées dans le tableau XII. L'analyse de la variance du modèle développé de l'activité enzymatique de peroxydase a montré une signification statistique élevée avec une probabilité inférieure à 0,0001. Ceci est porté par la valeur élevée du coefficient de corrélation (0,9704) indiquant que la réponse expérimentale de 97,04% est expliquée par le modèle et que seulement moins de 3% des informations sont perdues, attestant de la qualité du modèle quadratique pour l'activité POD. De plus, la vérification du défaut d'ajustement du modèle est jugée non significative ( $p = 2,7221$ ). Ce résultat implique que le modèle mathématique a une performance élevée pour la prédiction de l'activité peroxydase du navet.

Tableau XIII. ANOVA pour l'effet de la concentration de NaCl, du pH et de la température sur l'activité de la peroxydase.

Source	F <sup>a</sup>	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
x <sub>1</sub>	1	74909	2,2372	0,1503
x <sub>2</sub>	1	163890	4,8947	0,0387*
x <sub>3</sub>	1	907055	27,0898	<0,0001*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>	1	477556	14,2626	0,0012*
x <sub>1</sub> x <sub>3</sub>	1	131074	3,9146	0,0618
x <sub>2</sub> x <sub>3</sub>	1	39860	1,1905	0,2882
x <sub>1</sub> x <sub>1</sub>	1	8311763	248,2368	<0,0001*
x <sub>2</sub> x <sub>2</sub>	1	10689979	319,2640	<0,0001*
x <sub>3</sub> x <sub>3</sub>	1	2921390	87,2494	<0,0001*
Model	9	21917617	2435291	72,7317
Défaut d'ajustement	3	217298,98	72433,0	2,7221
Erreur	20	669664,02		
Modèle Total	29	22587281		
Erreur pure	17	452365,04		
R <sup>2</sup> = 0,970352				
AdjR <sup>2</sup> = 0,957011				

x<sub>1</sub>: pH ; x<sub>2</sub> : température (°C) ; x<sub>3</sub> : Concentration de NaCl (M)

a : Degrés de liberté

\* valeurs statistiquement significatives à p<0,05

### I.2.2.2 Analyse de la surface de réponse

Afin d'illustrer l'interaction entre les trois variables étudiées et l'activité de la peroxydase, la figure 34 montre les tracés graphiques de la surface tridimensionnelle du modèle. L'effet du pH et de la température du milieu réactionnel sur la réponse est donné sur la figure 34a qui indique que les deux facteurs ont influencé ensemble l'activité de la peroxydase. Ces derniers ont augmenté jusqu'à atteindre pH de 5,9 et la température de 29,8 °C et ont ensuite diminué. La peroxydase végétale présente une activité enzymatique optimale à des températures allant généralement de 30 à 50 °C et à un pH compris entre 3 et 7 (Pandy et al., 2017). Les effets de la concentration de pH-NaCl et de la concentration de température-NaCl sont indiqués sur les figures 34b et c. L'effet quadratique est bien observé pour les paramètres étudiés. Cela indique qu'à des niveaux élevés ou faibles de ces trois facteurs, l'activité de la peroxydase est réduite ; l'augmentation de ces paramètres induit l'augmentation de la réponse, mais au-delà de niveau optimal, un effet inverse est observé et ceci est dû à l'ionisation ou à la dénaturation de l'enzyme.

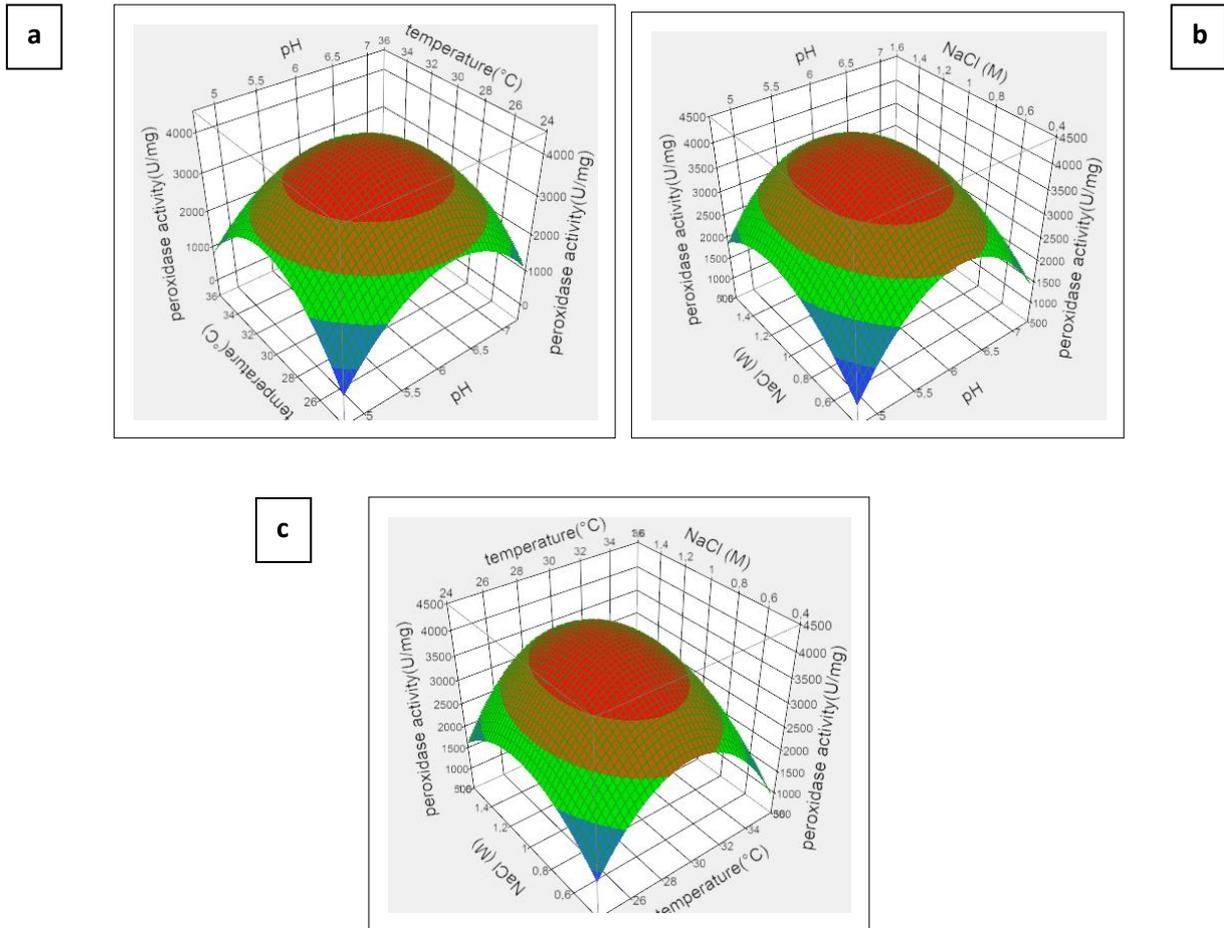


Figure 34. Présentations de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs du pH et de la température (a), du pH et de la concentration de NaCl (b), et de la température et de la concentration de NaCl (c) sur l'activité de la peroxydase. Les données et conditions expérimentales sont présentées dans le tableau XII.

### I.2.2.3. Optimisation de l'activité peroxydase et vérification du modèle prédictif

Les valeurs optimales de trois facteurs sur l'activité de la peroxydase sont obtenues par le profileur de désirabilité de JMP. Les conditions adéquates qui ont manifesté l'activité peroxydase la plus élevée du navet sont un pH de 5,9, une température de 29,8 °C et 1,07 M pour la concentration de NaCl. Dans ces conditions optimales, l'activité enzymatique prédite est de 4027,25 U/mg. Le test expérimental de ces conditions maximales ( $4031,10 \pm 23,77$  U/mg) est en accord avec la valeur prédite de l'activité peroxydase et valide le modèle quadratique développé.

### I.3 Purification et caractérisation de peroxydases d'extrait du navet blanc

Dans la présente étude, la purification de la peroxydase des racines de navet (*Brassica Rapa L.*) a été réalisée en trois étapes consistant en une précipitation au sulfate d'ammonium (10% - 80%), suivie d'une chromatographie d'échange d'anions et d'une concentration par ultrafiltration. De plus, l'ultrafiltration a non seulement amélioré la purification par élimination des sels, de certains peptides de bas poids moléculaire et des hydrates de carbone, mais a également contribué à la concentration de l'extrait brut. L'activité spécifique, le degré de purification et le rendement (%) de peroxydase de navet pour chaque étape sont résumés dans le tableau XIV.

Table XIV. Etapes de purification de la peroxydase de navet (*Brassica rapa L.*).

Etape de purification	Activité totale(U)	Protéine total (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Rendement (%)	Facteur de purification	RZ
Extrait brut	950,000± 3,895	1,250±18	760	100	1	NP
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (30-80%)	826,500±3,250	670±9	524,5	87	1,6	NP
Chromatographie sur Gel de filtration (sephacryl S-200 HR)	693,500±2,735	215±4	234	73	2,8	1,1
Chromatographie échangeuse ion (Mono Q-sepharose)	485,750±1,800	33,5±1	14,500	51,1	19	2,9

Les résultats présentés sur le tableau XIV, montrent une augmentation de l'activité spécifique de la peroxydase au fur et à mesure des étapes de purification. Les différentes étapes de purification adoptées ont permis l'obtention de l'enzyme avec un degré de pureté d'environ 19 fois que celle existante dans le surnageant brut. Le rendement de purification est de 51,1%. L'activité spécifique d'enzyme peroxydase purifiée est de l'ordre de 14,50 U/mg de protéines. Une étude similaire réalisée par Motamed et collaborateurs (Motamed et al., 2009), dans laquelle le facteur de purification est de 12,53 fois et le rendement de 82,32 %, qui ont rapporté que la différence de facteur de purification peut être due à la méthode et aux matériaux utilisés dans la purification, et la faible activité spécifique pourrait être due à un changement possible dans le site actif de l'enzyme due à des facteurs environnementaux.

### I.3.1 précipitation de l'extrait enzymatique par sulfate d'ammonium

La méthode de précipitation par sulfate d'ammonium est une technique largement utilisée pour purifier partiellement les protéines (Gülcin et Yildirim, 2005 ; Koksak et Gulcin, 2008). L'extrait de navet blanc brut contenant des peroxydases (760 U/mg de protéine) a été précipité avec du sulfate d'ammonium et diverses fractions ont été effectuées entre 10% et 80%. La figure 35 montre que l'activité spécifique de la peroxydase dans le surnageant a été diminuée lorsque du sulfate d'ammonium est ajouté à l'extrait de navet. Les fractions de POD obtenue avec 40% de sulfate d'ammonium ont l'activité spécifique la plus élevée de 524,5 U/mg, cette étape a abouti à l'élimination d'autres protéines dans l'extrait. La précipitation au  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a donné un rendement global de 87% et une purification de 1,6 (tableau XIV), ces résultats complètent plusieurs études qui ont précédemment démontré que la saturation en sulfate d'ammonium était utilisée pour la purification du POD du raifort (Lavery et al., 2010), radis noir de Turquie (Şişecioglu et al., 2010).

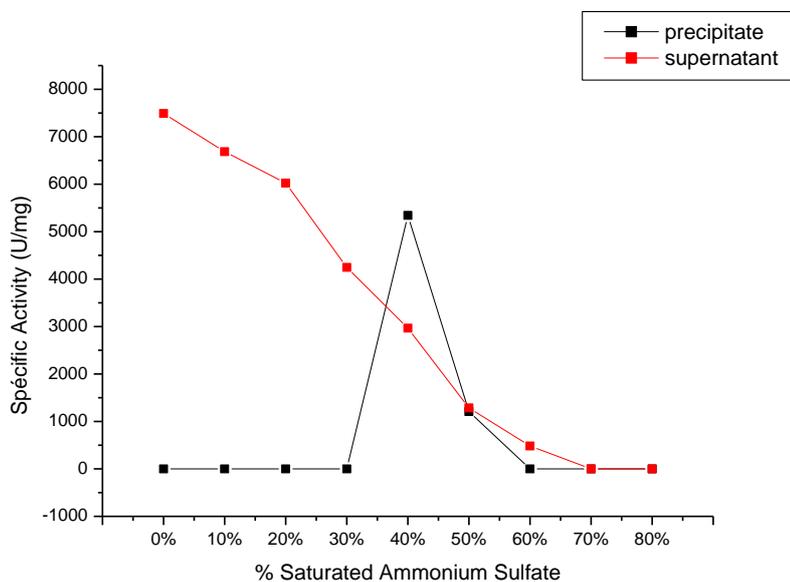


Figure 35. Précipitation au sulfate d'ammonium de la peroxydase du navet (*Brassica rapa.L.*).

### I.3.2 Chromatographie d'échange d'anions

L'enzyme peroxydase du navet blanc (*Brassica rapa L.*) (TRP) a été purifiée jusqu'à l'homogénéité, en utilisant une chromatographie de filtration sur colonne avec gel Sephacryl® S-200 HR. Les fractions contenant l'activité peroxydase ont été éluées à volume de 1,2 (Figure 36A). La purification jusqu'à l'homogénéité a été obtenue par chromatographie d'échange d'ions (Mono Q-Sepharose) (Figure 36B). Les étapes de purification de l'enzyme TRP ont été résumées dans le Tableau XIV. Le profil d'élution des protéines acquis à l'étape Mono Q-Sepharose a indiqué que le POD du navet blanc (*Brassica rapa L.*) a été éluée de 56 à 72 fractions (Figure 36B), avec une valeur RZ de 2,9 obtenue pour l'étape finale indique un niveau de pureté très élevé. Ces étapes de purification du TRP complète plusieurs études, qui ont précédemment démontré que la saturation en sulfate d'ammonium a été utilisée pour la purification de POD à partir de HRP (Thongsook et Barrett, 2005), feuilles de chou (Zeyadi, 2019) et radis noir de Turquie (Oztekin et al., 2019). De plus, la chromatographie d'addition en gradient de NaCl a donné un pic unique avec un POD purifié à partir des racines de navet indiens (Singh et Singh, 2003). L'activité spécifique du TRP (743,77 U/mg) est supérieure à celles à certaines études rapportées précédemment dans la littérature. En fait, elle est similaire avec celui obtenu à partir de racines de raifort (*Armoracia rusticana*) (772 U/mg) (Lavery et al., 2010). Cependant, il est inférieur à celui de la peroxydase de betterave rouge (10500 U/mg) (Liu et al., 2010).

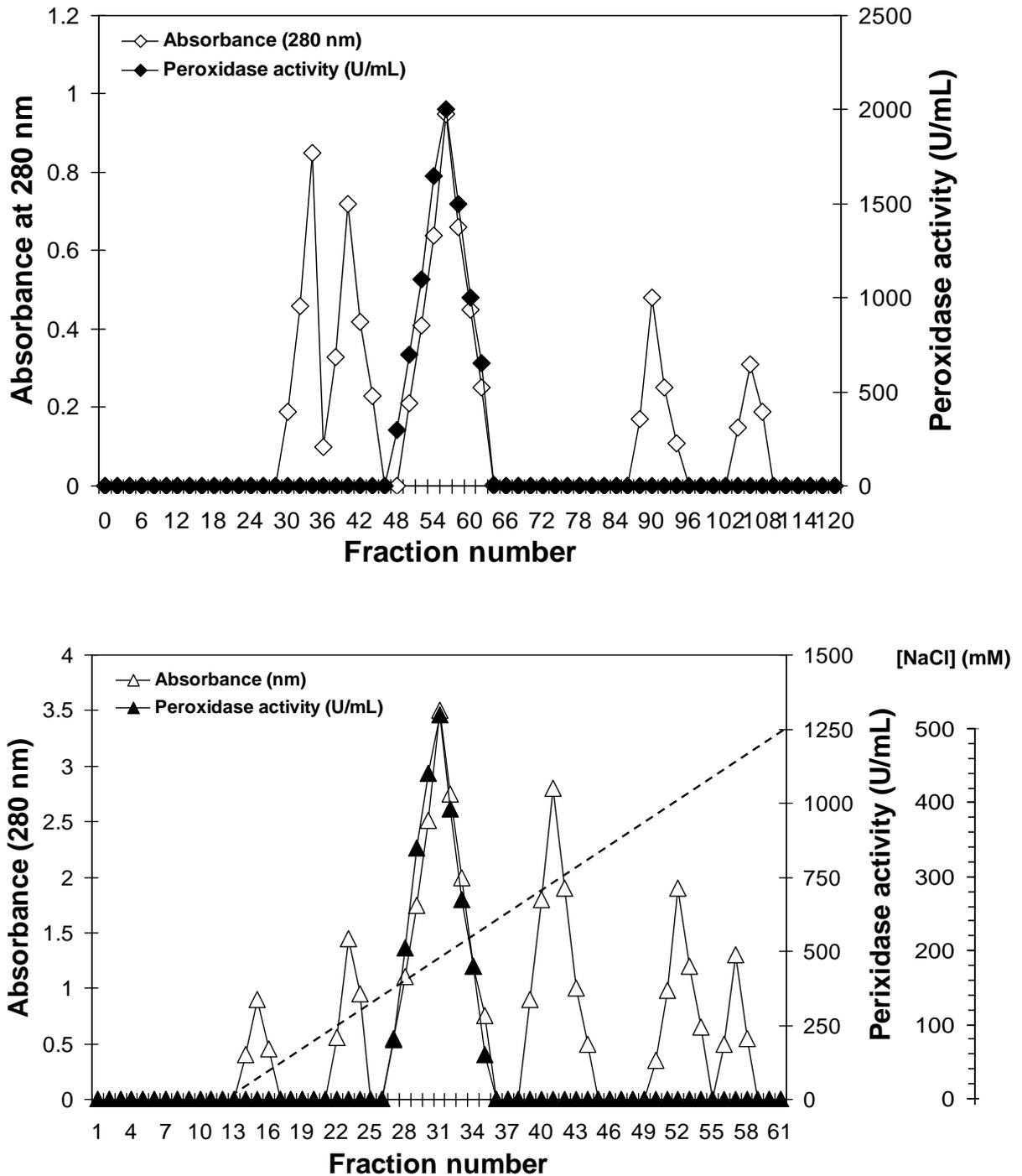


Figure 36. Purification de l'enzyme TRP à partir de racines de navet blanc (*Brassica rapa L.*). (A) Profil d'élution de TRP sur colonne Sephacryl® S-200 HR. (B) Profil de chromatographie de la peroxydase purifiée sur échangeur d'anions Mono Q-Sepharose.

### **I.3.3 Détermination du poids moléculaire et analyse zymographique de la peroxydase du navet blanc**

Afin de contrôler la pureté de l'extrait enzymatique et de déterminer le poids de l'enzyme peroxydase, les fractions enzymatiques obtenues par chromatographie d'échange d'anions ont été combinées et analysées par électrophorèse SDS-PAGE. En utilisant des marqueurs de poids moléculaire standard pour déterminer le poids moléculaire natif de la peroxydase purifiée, la figure 37A montre que la peroxydase n'a qu'une seule bande entre les marqueurs protéiques standard de 60 kDa et 35 kDa, la masse moléculaire du TRP d'environ 58 kDa. La coloration de l'activité zymogramme du TRP, avec le gaïacol comme substrat, a montré une seule bande correspondant à la position de l'activité peroxydase (figure 37B). En outre, cette préparation était une enzyme homogène de haute pureté car elle présente un pic symétrique d'élution unique au temps de rétention (Rt) à 10,2 min équivalent à une seule protéine de près de 58 kDa par chromatographie par filtration sur gel HPLC (figure 37C). Le poids moléculaire de TRP est comparable à d'autres POD ayant des poids moléculaires dans la gamme de 35 à 95 kDa. En fait, Kalin et collaborateurs ont constaté que le POD purifié à partir de racines de navet turc avait un poids moléculaire de 65,8 kDa (Kalin et al., 2014). D'autres masses moléculaires de POD à partir d'autres espèces ont été rapportées comme suit : romarin 33 kDa (Aghelan et al., 2015) ; ail 36,5 kDa (Marzouki et al., 2005) ; pois chiche 39 kDa (Bhatti et al., 2006) ; racine de raifort 40 kDa (Cb et al., 2010) ; avocat 40 kDa (Rojas-Reyes et al., 2014) ; fleur de mouron 44 kDa (Yan et al., 2015) ; palmiers à vent 50 kDa (Caramyshev et al., 2006) ; artichaut 57 kDa (Cardinali et al., 2011) ; chou rouge 69,3 kDa (Zeyadi, 2019) ; et chou noir 95 kDa (Somtürk et al., 2014).

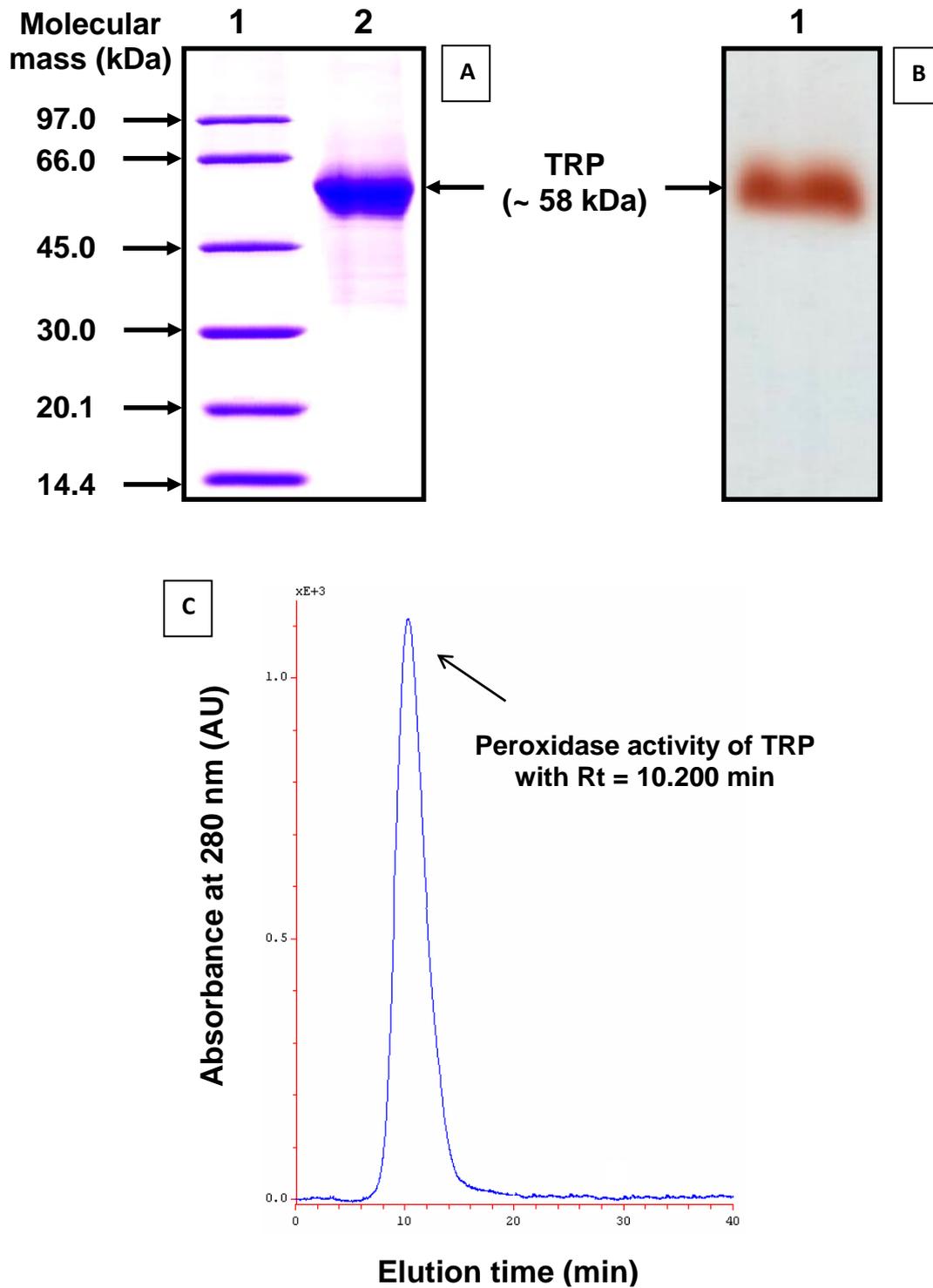


Figure 37. Profils d'électrophorèse de peroxydase de racines de navet blanc (*Brassica rapa* L.). (A) SDS-PAGE d'enzyme TRP. (B) Zymographie avec coloration au gäiäcol de l'activité de peroxydase du navet blanc. (C) Le profil de chromatographie HPLC de peroxydase purifiée.

### I.3.4 Détermination de la séquence N-terminale de peroxydase du navet blanc

Les dix-neuf résidus de séquence N-terminale ont été déterminés comme étant QLTPFTFLNNSCPNVSNIVR (Tableau XV) et ont montré une forte similitude avec les POD obtenus à partir d'*Armoracia rusticana* (88,47% d'identité). Ces résultats suggèrent fortement que l'enzyme peroxydase de navet blanc (*Brassica rapa* L.) est une nouvelle POD.

Tableau XV : Séquence N-terminale de TRP des racines de navet Algérien avec celui des séquences d'autres POD.

Peroxydase	Origine de la Plante	Séquence N-terminale d'acide amine <sup>a,b</sup>	Identité (%)
TRP (this study)	<i>Brassica rapa</i> ,	QLTPFTFLNNSCPNVSNIVR	-
HRP C1	<i>Armoracia rusticana</i>	QLTPFTFYD <small style="background-color: #cccccc;">NSCPNV</small> SNIVR	88,47
PRX33 (XP_006291394)	<i>Capsella rubella</i>	QLTPFTFYD <small style="background-color: #cccccc;">NSCPNV</small> IVR	84,21
PRX34-like (XP_013656048)	<i>Brassica napus</i>	QLTPFTFYD <small style="background-color: #cccccc;">SSCPNV</small> IVR	78,95
PRX32 (XP_002877238)	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	QLTPFTFYD <small style="background-color: #cccccc;">NTCPNV</small> IVR	73,68
PRX E5 (XP_002299152)	<i>Populus trichocarpa</i>	QLTPFTFYD <small style="background-color: #cccccc;">ETCPNV</small> SSIVR	68,42

<sup>a</sup> Les séquences d'acides aminés à comparer ont été obtenues en utilisant la base de données du programme BLASTP (NCBI, NIH, USA).

<sup>b</sup> Les résidus ne correspondant pas à l'enzyme TRP sont ombrés.

### I.3.5 Analyse par spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique analytique physico-chimique globale, sensible et hautement reproductible qui identifie les fragments structuraux des biomolécules sur la base de leur absorption IR. Parce qu'une biomolécule est déterminée par sa structure unique, chaque biomolécule présentera un spectre FT-IR unique, représentant les vibrations de ses liaisons structurales. De plus, chaque biomolécule présente dans l'échantillon présentera des pics d'absorption FT-IR plus ou moins spécifiques (Petibois et al., 2001). L'analyse FT-IR a été utilisée pour fournir des informations précieuses concernant les groupes chimiques présents dans un composé. La figure 38 montre les spectres FT-IR de la peroxydase de navet. Les pics d'intensité variable ont été trouvés autour de 1080 cm<sup>-1</sup> attribués à l'étirement du CO des acides, esters et anhydrides carboxyliques (Kong et Yu, 2007), tandis que le pic intense autour de 3250 cm<sup>-1</sup> représente l'élongation du OH et le pic à 1571 cm<sup>-1</sup> correspond à la vibration de flexion du NH<sub>2</sub> (Bai et

al., 2011), qui sont principalement générée par les protéines (Mizutani et al., 2004; Jeniffer Sylvia et al., 2015) et par rapport au pic d'intensité moyenne atteint à  $1633\text{ cm}^{-1}$  ou aux liaisons amides primaires attribuées par le déplacement de la vibration asymétrique fréquences pour les groupes carboxyliques  $\text{C}=\text{O}$  (Sahadevan et al., 2016).

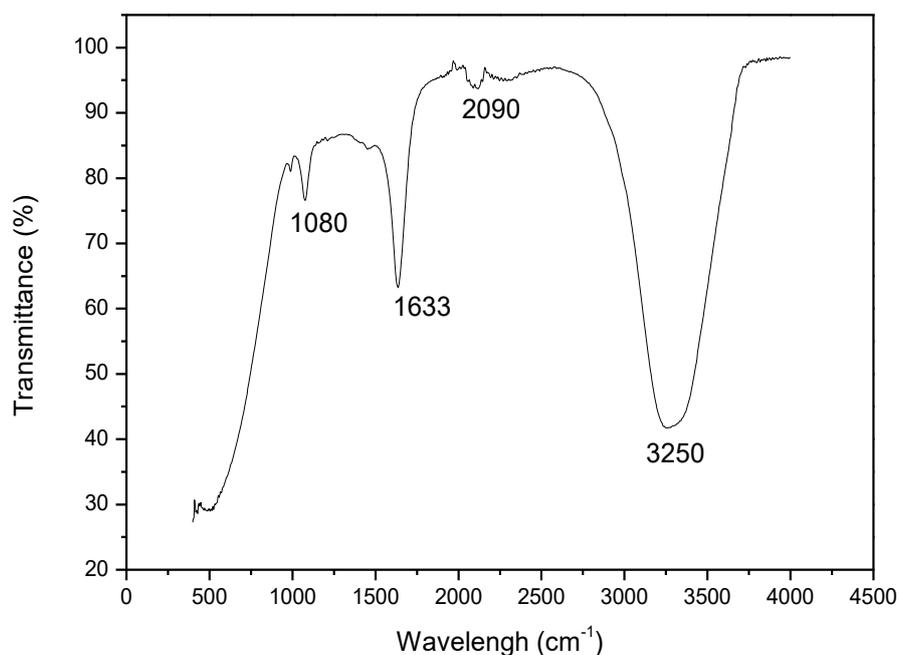


Figure 38. Spectre FT-IR de l'extrait enzymatique de navet blanc.

### I.3.6 Caractérisations biochimiques et spectrales de peroxydase du navet purifiée

#### a. Caractérisation spectrale d'un cofacteur hème

Tout au long de l'étape de purification de l'enzyme TRP, une coloration rousse a été détectée pour les fractions actives solubles et réputée pour être plus marquée dans la fraction de délution, démontrant qu'un co-facteur chromogène était lié à la peroxydase. Les caractéristiques spectrales de l'enzyme purifiée ont montré que TRP avait un pic d'acides aminés aromatiques à 280 nm et un pic de composé hème à 406 nm. Le rapport des valeurs d'absorbance représente le RZ de l'enzyme TRP à 2,9, ce qui était comparable à d'autres POD (Kalin et al., 2014 ; Dalal et Gupta, 2010). Ces résultats ont clairement indiqué que l'enzyme TRP contenait un co-facteur hème qui utilise  $\text{H}_2\text{O}_2$  comme accepteur d'électrons pour catalyser un certain nombre de réactions oxydatives.

**b. Effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur l'activité peroxydase du navet**

Les résultats ont révélé que l'activité maximale enregistrée pour l'enzyme TRP a été obtenue avec une concentration initiale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0,5 mM, ce qui est en accord avec d'autres POD (Graças et al., 2020 ; Basha et al., 2017 ; Simonetti et al., 2009). Il a été également noté que les concentrations de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont des effets inhibiteurs sur l'activité enzymatique en comparaison avec d'autres POD (Bouazizi et al., 2008). Pour le TRP purifié, l'augmentation de l'absorbance à 470 nm n'a pas été observée en l'absence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indiquant que l'activité du phénol oxydase (PhO) est négligeable.

**c. Influence de certains inhibiteurs et ions métalliques sur la peroxydase du navet**

Les résultats du tableau XVI montrent que les TRP sont totalement inhibés par KCN et NaN<sub>3</sub>, reconnus comme des inhibiteurs spécifiques des peroxydases. Ce comportement indique qu'un composant hème est impliqué dans l'activité catalytique TRP.

*Tableau XVI : Effet d'une variété d'inhibiteurs et d'ions métalliques sur le TRP des racines de navet blanc d'Algérie utilisant le gäiacol comme substrat.*

<i>Inhibiteur</i>	<i>Concentration (mM)</i>	<i>Activité résiduelle de peroxydase (%)</i>
Control	-	100 ± 2,5
KCN	10	0 ± 0,0
NaN <sub>3</sub>	10	0 ± 0,0
L-cystine	2	11 ± 0,3
Hydroxylamine	2	7 ± 0,2
DTNB	10	95 ± 2,4
NEM	2	101 ± 2,5
Iodoacetamide	5	96 ± 2,4
β-ME	5	70 ± 2,1
DL-DTT	1	65 ± 1,9

NB : Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions et ± SE sont rapportées. L'activité TRP calculée en l'absence d'inhibiteur a été considérée comme témoin (100%).

Une variété d'ions métalliques (2 mM) a été évaluée en termes de son influence sur l'activité de l'enzyme TRP (Tableau XVII). Les résultats ont indiqué que l'activité TRP est entièrement inhibée par les ions nickel, cadmium et mercure car elle est corrélée avec les groupes thiol (–SH) des résidus de cystéine et perturbe sa configuration 3D comme indiqué pour d'autres PODs (Graças et al., 2020 ; Basha et al., 2017) et peroxydases fongiques (Bouacem et al., 2018 ; Rekik et al., 2019). En outre, l'activité TRP a été améliorée par l'ajout de 2 mM d'ions

Mn<sup>2+</sup> (180%), magnésium (151%) et calcium (137%). La présence de manganèse a augmenté l'activité de la peroxydase, a suggéré que ce cation contribue à la régulation de la conformation active de l'enzyme et a ainsi amélioré l'activité TRP.

Tableau XVII : Effet de certains ions métalliques divalents sur le TRP des racines de navet blanc algérien utilisant le gaïacol.

Ion métallique à 2 mM	Origine	Activité résiduelle de peroxydase (%)
Control	-	100 ± 2,5
Mn <sup>2+</sup>	MnSO <sub>4</sub>	180 ± 3,8
Mg <sup>2+</sup>	MgSO <sub>4</sub>	151 ± 3,6
Ca <sup>2+</sup>	CaCl <sub>2</sub>	137 ± 3,1
Cu <sup>2+</sup>	CuSO <sub>4</sub>	105 ± 2,6
Ba <sup>2+</sup>	BaCl <sub>2</sub>	90 ± 2,2
Fe <sup>2+</sup>	FeSO <sub>4</sub>	77 ± 2,2
Zn <sup>2+</sup>	ZnCl <sub>2</sub>	40 ± 1,4
Co <sup>2+</sup>	CoCl <sub>2</sub>	25 ± 1,0
Ni <sup>2+</sup>	NiCl <sub>2</sub>	0 ± 0,0
Cd <sup>2+</sup>	CdCl <sub>2</sub>	0 ± 0,0
Hg <sup>2+</sup>	HgCl <sub>2</sub>	0 ± 0,0

NB : Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions et ± SE sont rapportées. L'activité de peroxydase du navet calculée en l'absence d'ions métalliques a été considérée comme témoin.

#### d. Effets de différents pH sur l'activité et la stabilité de la peroxydase du navet

L'enzyme TRP purifiée est active sur un intervalle de pH entre 2 à 11 avec une plus grande activité détectée dans l'intervalle acide à pH 6 (Figure 39A). Les activités relatives à pH de 4 et 9 ont été enregistrées à 75 et 55%, respectivement. À titre de comparaison, les POD des racines de *Barassica rapa* et *Armoracia rusticana* ont montré une activité maximale à pH de 4 et 7, respectivement. Le POD des feuilles de *Copaifera angsdorffii* a montré une activité maximale à pH de 6 (Maciel et al., 2007 ; Motamed et al., 2009). L'enzyme TRP est stable à un pH allant de 4 à 8 (Figure 39B). La demi-vie du TRP à pH de 4, 5, 6, 7 et 8 est de 12, 9, 7, 5 et 3 h, respectivement. Le profil de stabilité du pH du TRP permettra diverses applications industrielles qui nécessitent des conditions acides.

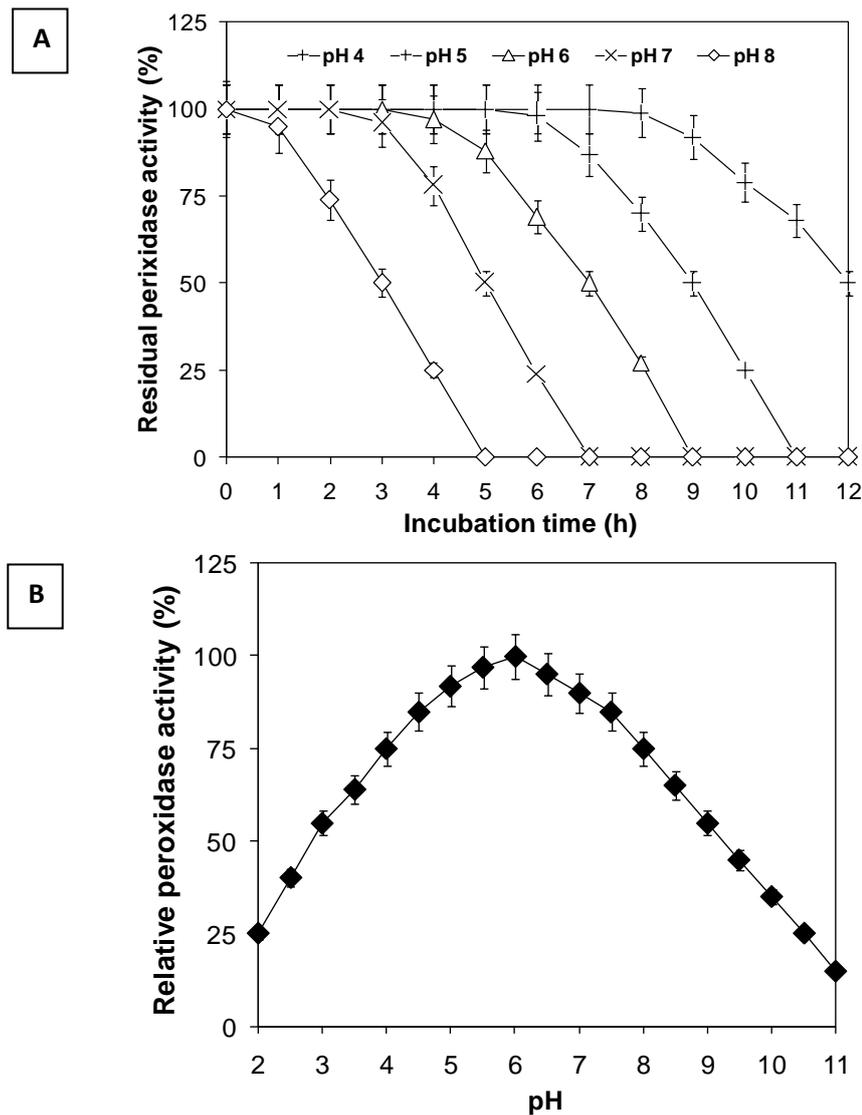


Figure 39 : Evaluation du pH sur l'activité et la stabilité de l'enzyme TRP purifiée à partir de racines de navet (*Brassica rapa* L.). (A) L'activité de pH TRP a été évaluée dans la gamme de pH de 2 à 11 en utilisant des tampons de différentes valeurs de pH avec du gaiacol. (B) La stabilité du pH TRP a été vérifiée en incubant pendant 12 h l'activité dans divers tampons à 40 °C.

#### e. Effets de différentes températures sur l'activité et la stabilité de la peroxydase du navet

La température optimale de l'activité pour l'enzyme TRP à pH 6 était de 45 °C (sans  $Mn^{2+}$ ) et de 55 °C en présence de 2 mM  $Mn^{2+}$  (Figure 40A). La température optimale du TRP enregistrée était inférieure à celle des autres POD signalés à partir de feuilles de *Copaifera angsdorffii* et de racines de *Barassica rapa* ayant une activité maximale à 35 °C (Maciel et al., 2007 ; Motamed et al., 2009). La demi-vie de la TRP peroxydase à 40, 50 et 60 °C sans  $Mn^{2+}$

était de 10, 6 et 3 h, respectivement (Figure 40B). Cependant, en présence de 2 mM Mn<sup>2+</sup>, la demi-vie du TRP a augmenté à 12, 8 et 5 h. La thermostabilité du TRP était plus élevée que celle des autres POD des racines de *Brassica rapa* et *Armoracia rusticana* (Pech-Canul et al., 2020 ; Rajhans et al., 2020 ; Lueangjaroenkit et al., 2020 ; Yang et al., 2020). Ces caractéristiques montrent que le TRP a un potentiel d'application dans l'industrie alimentaire.

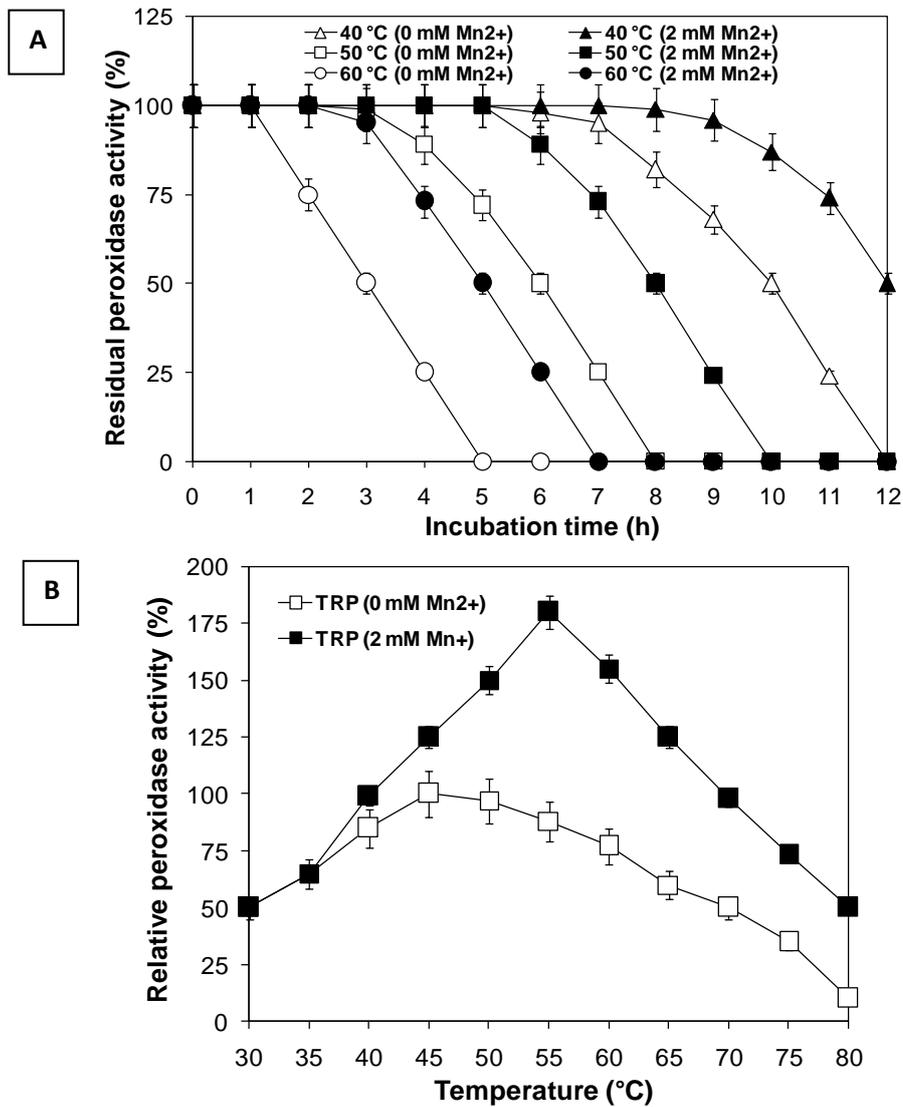


Figure 40. Evaluation de la température sur l'activité et la stabilité de peroxydase purifiée à partir de racines de navet blanc (*Brassica rapa* L.) (TRP). (A) L'effet de la température sur l'activité du TRP a été évalué pendant 5 min à 30-80 °C à pH de 6. (B) La thermostabilité du TRP a été examinée en incubant pendant 12 h.

**f. Vérification des paramètres cinétiques des peroxydes du navet**

Les résultats des analyses de paramètres cinétiques de peroxydases du navet et raifort sont résumés dans le tableau XVIII. Les enzymes POD (TRP et HRP) ont présenté la cinétique conventionnelle de Michaelis-Menten pour les substrats spécifiques utilisés pour les POD avec le gaïacol, le pyrogallol, le catéchol et l'anisole. L'ordre des valeurs  $k_{cat}/K_m$  de chaque enzyme était presque le même, c'est-à-dire  $\text{guaiacol} > \text{pyrogallol} > \text{catéchol} > \text{anisole}$ . Les valeurs  $k_{cat}/K_m$  de TRP étaient 4,28, 3,99, 2,86 et 1,97 fois plus élevées que celles de HRP pour le gaïacol, le pyrogallol, le catéchol et l'anisole, respectivement. Ces résultats suggèrent fortement que l'enzyme TRP est le candidat le plus prometteur pour l'industrie alimentaire et diverses autres applications biotechnologiques.

*Tableau XVIII. Paramètres cinétiques des peroxydes du navet (TRP) et pour l'hydrolyse du gaïacol, du pyrogallol, du catéchol et de l'anisole comme substrats.*

Substrat	Enzyme	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ (U/mg)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$ )
Gaiacol	TRP	$0,139 \pm 0,01$	$14500 \pm 210$	$9667 \pm 140$	69547
	HRP	$0,302 \pm 0,02$	$7350 \pm 107$	$4900 \pm 71$	16225
Pyrogallol	TRP	$0,195 \pm 0,01$	$13485 \pm 194$	$8990 \pm 129$	46103
	HRP	$0,388 \pm 0,03$	$6710 \pm 97$	$4473 \pm 65$	11528
Catechol	TRP	$0,250 \pm 0,02$	$12325 \pm 177$	$8217 \pm 120$	23868
	HRP	$0,447 \pm 0,03$	$5590 \pm 81$	$3727 \pm 54$	8338
Anisole	TRP	$0,406 \pm 0,04$	$8159 \pm 118$	$5439 \pm 78$	13396
	HRP	$0,491 \pm 0,05$	$4991 \pm 71$	$3327 \pm 48$	6776

*Les valeurs représentent les moyennes de trois répliques et  $\pm$  les erreurs standard sont signalées.*

**II. Activité antioxydante de l'extrait brut et de l'extrait enzymatiques du navet blanc**

Les effets bénéfiques des légumes Brassica sur l'amélioration de la santé ont été en partie attribués à leur mélange complexe de composés phytochimiques possédant une activité anti-oxydante. Pour cette raison, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer le potentiel antioxydant d'un aliment. Ces méthodes mesurent la capacité des antioxydants à piéger des radicaux spécifiques, à inhiber la peroxydation lipidique ou à chélate les ions métalliques.

## II.1. Teneurs en composés phénoliques totaux, flavonoïdes et tanins condensés de l'extrait brut du navet

La solubilité des composés phénoliques dépend de leur nature chimique dans la plante qui varie de composés simples à fortement polymérisés. Les matières végétales peuvent contenir des quantités variables d'acides phénoliques, phénylpropanoïdes, anthocyanines, et tanins (Garcia-Salas et al., 2010). Cette diversité structurale est responsable de la grande variabilité des propriétés physicochimiques influençant l'extraction des polyphénols (Koffi et al., 2010). Entre autres, la solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé. Par conséquent, il est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante (Jokic et al., 2010).

L'étude réalisée a pour objectif d'établir un dosage des composés phénoliques après leur extraction à partir de *Brassica* en utilisant quatre solvants d'extraction à différentes polarités, à savoir : l'eau distillée, le méthanol 50%, éthanol 50% et l'acétone 50% diluent avec l'eau à 50%. Ainsi qu'à la détermination de l'activité anti-oxydante des extraits obtenus.

L'analyse statistique des résultats illustrés dans la figure 41 a révélé des différences significatives ( $p < 0,01$ ) entre les différents solvants étudiés. On remarque d'après les résultats de l'histogramme que les extraits présentent une forte teneur en polyphénols et qui sont variables. Ces composés antioxydants, notamment les composés phénoliques, les flavonoïdes, sont bio-synthétisés lorsque la plante est exposée au stress environnemental (Ku et al., 2019). Dans la présente étude, l'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction des composés phénoliques à partir de variété du navet blanc présente l'ordre décroissant suivant : acétone > *ethanol* > *eau* > *methanol* (figure 41.A). Les teneurs les plus élevées en composés phénoliques sont obtenues avec l'acétone (1732 mg/100g MS) et l'éthanol (1423 mg/100g MS) (Figure 41.A), les mélanges acétone/eau sont de bons solvants pour l'extraction des antioxydants polaires, il semble qu'ils permettent la dissolution des complexes composés phénoliques-protéines (Naczki et Shahidi, 2004). Par contre, les teneurs les plus faibles sont obtenues avec l'extrait à l'eau (935,7 mg/100g MS) et méthanol 50% (1056 mg/100g MS). L'eau montre une faible capacité d'extraction des composés phénoliques en raison de leurs faibles solubilités dans l'eau. Les teneurs en polyphénols obtenues dans cette étude étaient plus élevées à ceux obtenus par Wu et

collaborateurs (Wu et al., 2004) qui ont rapporté une valeur de 254 mg/100g MS pour le chou rouge, et celles des variétés de chou frisé, brocoli, chou-fleur blanc, chou-fleur vert, chou de Bruxelles, les valeurs ont été 773; 289; 145; 144; 331 mg/100g MS respectivement (Sikora et al., 2008), et 337,0 mg/100 g MS pour le brocoli (Podsdek, 2007).

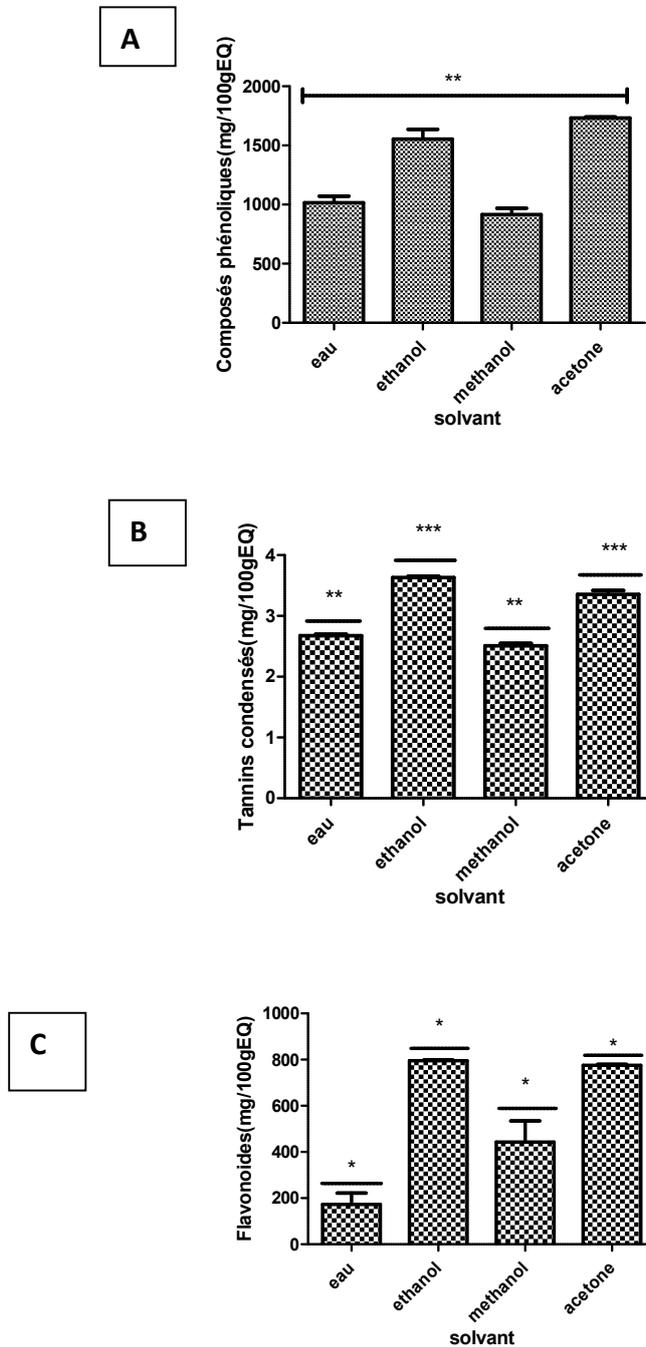


Figure 41. Effet du solvant d'extraction sur la teneur en composés phénoliques (A), en flavonoïdes (B) et en tannins condensées (C) d'extrait du navet blanc.

Les teneurs en flavonoïdes d'extrait du navet blanc analysées sont moyennement significative affectées par le type du solvant ( $p < 0,05$ ). Cependant, aucune différence significative n'a été enregistrée avec l'éthanol. Les résultats indiquent que l'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction des flavonoïdes à partir de navet présente l'ordre suivant : acétone > ethanol > methanol > eau (figure 41B). Les teneurs varient de 281 mg/100g MS (extrait à eau) à 690,4 mg/100g MS (extrait à acétone). Les résultats obtenus dans ces études sont supérieurs à ceux rapportés par De Pascale et collaborateurs (De Pascale et al., 2007) pour *Brassica. rapa L. subsp. sylvestri* (21,2–43,6 mg/100 g) et d'autres variétés de Brassica telle que le chou rouge (*Brassica oleracea var. capitata f. rubra*) de valeur 171,36 mg/100g MS rapporté par Podsedek et collaborateurs (Podsedek et al., 2006) et le chou (*Brassica oleracea*) de valeur 58,74 mg/100g (Armesto et al., 2019).

Les solvants d'extraction (éthanol et l'acétone) affectent très significativement ( $p < 0,001$ ) la teneur des tanins, par contre les solvants (eau et méthanol) affectent faiblement significativement ( $p < 0,01$ ) la teneur en tanins condensés. L'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction des tanins condensés présente l'ordre décroissant suivant : acétone > ethanol > methanol > eau (figure 41C). Les teneurs les plus élevées en tanins condensés sont obtenues avec l'acétone (3,35 mg/100g MS) et la plus faible est obtenue avec eau (2,67 mg/100g MS). Les résultats obtenus dans la présente étude s'avèrent différents de ceux rapportés par Heimler et collaborateurs (Heimler et al., 2006) pour le chou blanc (*Brassica oleracea var capitata*) de valeur (0,50 mg/100g MS), le brocoli (*Brassica oleraceavar. Italica*) de valeur (0,41 mg/100g MS) et le chou-fleur (*Brassica. oleracea L. conv botrytis*) de valeur (0,56 mg/100g MS).

*Brassica rapa* est l'une des principales espèces de Brassica et elle est utilisée contre différents types de cancer. Les différentes sous-espèces de Brassica rapa, notamment le Pak choi, le chou chinois, le Rapa et d'autres types de légumes ont des propriétés anti-oxydantes. Ses différentes parties de la plante comme la racine, les feuilles, les fruits et les graines regorgent de composés antioxydants importants, notamment les glucosinolates, les caroténoïdes, les flavonoïdes, les cétones, les aldéhydes, etc. qui sont utilisés contre de nombreux types de lignées cellulaires cancéreuses. Cependant, l'activité anti-oxydante Brassica rapa varie en fonction du type de génotype, la concentration de l'extrait et de l'intervalle de temps associé, du type de solvant utilisé pour l'extraction, de la méthode

d'extraction, de la partie de la plante utilisée, du gène expression de différents facteurs de transcription impliqués et d'autres facteurs biotiques ou abiotiques (Jan et al., 2018).

## II.2. Activités antioxydantes d'extrait brut du navet blanc

### II.2.1. Activité anti-radicalaire DPPH et ABTS

L'activité anti-radicalaire dépend de la structure des composés phénoliques contribuant à leur capacité de transfert d'électron/donneur d'hydrogène. Elle pourrait également être due aux effets synergiques entre diverses classes d'anti-oxydants présents dans les extraits (flavonoïdes, flavonols, tanins...etc.) (Hinneburg et al., 2006).

L'analyse statistique de l'activité anti-radicalaire DPPH d'extrait du navet avec différents solvants présente des différences très hautement significatives ( $p < 0,001$ ) avec les deux solvants l'éthanol et l'acétone, une différence très significative ( $p < 0,01$ ) avec l'eau et une différence significative ( $p < 0,05$ ) avec le méthanol. L'extrait à l'éthanol présente l'activité la plus élevée de 70,33%, l'activité anti-radicalaire la plus faible est celle à l'eau (14,65%) (figure 42 A). Ces résultats sont proches à ceux de Beltagy (Beltagy, 2014) pour l'extrait des racines de navet (66,93%) où il a utilisé l'éthanol comme solvant dans l'extraction. Saeed et collaborateurs (Saeed et al., 2012) utilisant le méthanol dans l'extraction, ont rapporté que l'activité de navet jaune (*Brassica rapa var. rapa*) variait entre 23,2 et 72,1% et de navet blanc variait entre 18,3 et 65,2%.

L'activité piégeant les radicaux ABTS a été largement utilisée pour tester l'activité anti-oxydante. Le mécanisme s'attribue principalement aux réactions de transfert d'électrons pour inhiber la voie d'auto-oxydation en convertissant les radicaux en produit relativement stable (Wang et al., 2016).

L'analyse statistique de l'activité anti-radicalaire ABTS d'extrait du navet avec les différents solvants révèle des différences significatives ( $p < 0,05$ ) avec les solvants (eau, éthanol et l'acétone) et une différence très significative ( $p < 0,01$ ) avec méthanol. Ces activités varient entre 76% et 93,67% (figure 42 B). Les valeurs obtenues dans cette étude sont proches à celles de Liang et collaborateurs (Liang et al., 2019), qui ont obtenu la valeur de 87,23% pour la variété de chou (*Brassica oleracea var. capitata*).

Les différences constatées entre les solvants utilisés pourraient être expliquées par les polarités variables et des anti-oxydants présents dans chaque extrait. En effet la polarité du solvant peut affecter le transfert d'atomes d'hydrogène.

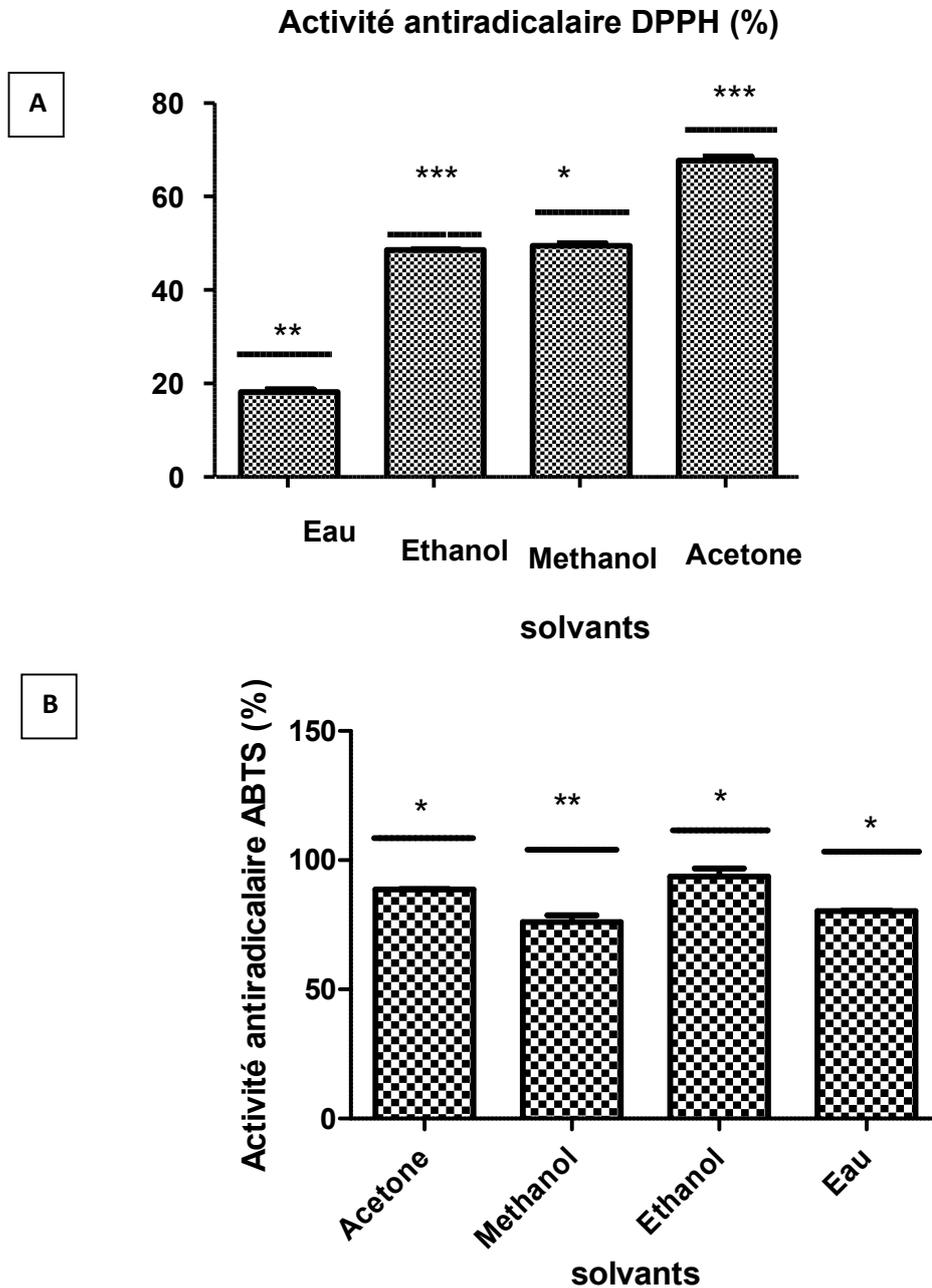


Figure 42. Effet du solvant d'extraction sur l'activité anti-radicalaire de DPPH (A) et l'activité anti-radicalaire de ABTS (B) sur l'extrait du navet blanc.

### II.2.2. Pouvoir chélateur du fer

Le fer, un métal de transition, est capable de générer des radicaux libres à partir de peroxydes par la réaction de Fenton et est produit des oxyradicaux et de la peroxydation lipidique en décomposant les hydroperoxydes lipidiques en peroxyde et alcoxyde. L'un des mécanismes importants des propriétés antioxydantes est la capacité à chélater les métaux de transition, ceci empêche la catalyse de la décomposition d'hydroperoxyde et les réactions de type Fenton. (Ryu, 2012).

L'analyse statistique révèle des différences significatives ( $p < 0,05$ ) avec les deux solvants méthanol et l'acétone, une différence très significative ( $p < 0,01$ ) avec éthanol et une différence très hautement significative ( $p < 0,001$ ) à l'eau (Figure 43). Nos résultats ont montré que les extraits de navet (*Brassica rapa.L*) a inhibé la formation de complexes ferreux et ferroziniques, suggérant qu'ils ont des grandes capacités de chélation variant entre 64,18 % et 67,73 %. Ces résultats sont similaires à ceux de Bidchol et al., 2011 pour le de Brocoli (*Brassica oleraceaL. var.italica*), utilisant les solvants l'éthanol et l'eau pour l'extraction.

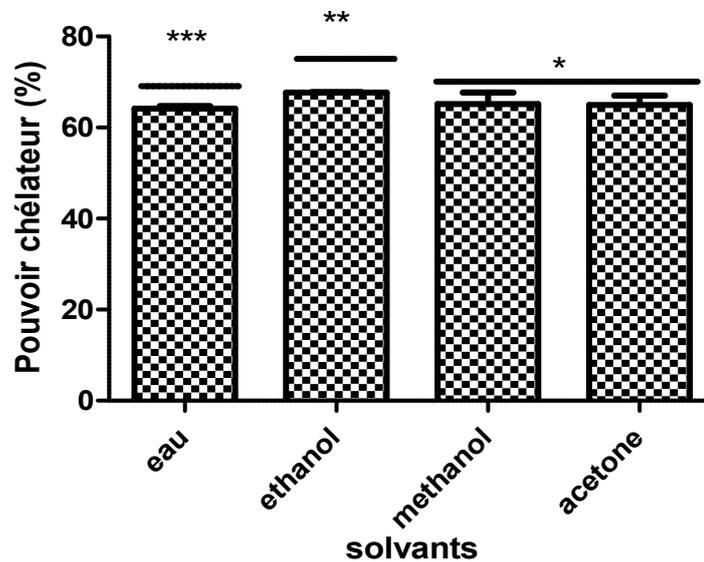


Figure 43. Effet du solvant d'extraction sur le pouvoir chélateur l'extrait du navet blanc.

### II.2.3. Pouvoir réducteur du fer

Les propriétés réductrices sont généralement associées à la présence de réducteur dont il a été démontré qu'elles exercent une action antioxydante en donnant un atome d'hydrogène et en freinant la chaîne des radicaux libres. Une absorbance plus élevée indique un pouvoir réducteur ferrique plus élevé. Cette méthode est basée sur la réduction de ( $\text{Fe}^{3+}$ ) ferricyanure (Saeed et al., 2012).

Le pouvoir réducteur des extraits de navet avec différents solvants étudiés présente des différences très hautement significatives ( $p < 0,001$ ) avec l'acétone et le méthanol et des différences très significatives ( $p < 0,01$ ) avec l'eau et l'éthanol. Les valeurs de l'activité les plus élevées sont enregistrées avec les solvants éthanol, méthanol et l'acétone (1650  $\mu\text{mol/g MS}$ , 1618,22  $\mu\text{mol/g MS}$ , 1539.71  $\mu\text{mol/g MS}$ ) respectivement. Pour l'extrait à eau, il présente le pouvoir réducteur le plus faible (862,9  $\mu\text{mol/g MS}$ ) (Figure 44). Ces résultats sont supérieurs à ceux rapporté par Rokayya et collaborateurs (Rokayya et al., 2014) pour le chou rouge (80,87  $\mu\text{mol/g MS}$ ) et par Major et collaborateurs (Major et al., 2020) pour le chou (*Brassica oleracea var.acephala*) (92,5  $\mu\text{mol/g MS}$ ).

Des études sur la réduction du pouvoir des aliments des plantes ont rapporté que le pouvoir réducteur des polyphénols des plantes est dû à la présence d'un groupe hydroxyle, qui pourrait agir comme donneur d'électrons (Pellegrini et al., 2003).

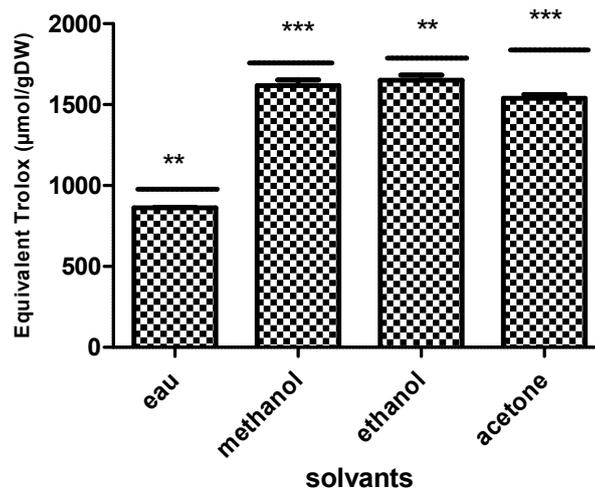


Figure 44. Effet du solvant d'extraction sur le pouvoir réducteur de l'extrait de navet blanc.

#### II.2.4. Inhibition de radical Hydroxyle OH

Le radical hydroxyle est le plus instable et le plus réactif de toutes les espèces dérivées de l'oxygène (ROS), se combinant rapidement avec presque toutes les molécules dans son voisinage immédiat (Sousa et al., 2009). Le radical hydroxyle peut entraîner plusieurs conséquences biologiques, notamment la mutation, la mort cellulaire, la cancérogenèse et le vieillissement (Ragu et al., 2007). Par conséquent, la consommation d'aliments ayant la capacité de piéger ce radical pourrait aider à contrôler ses effets nocifs.

L'analyse statistique révèle des différences très significatives ( $p < 0,01$ ) selon le solvant (eau, éthanol, méthanol) et une différence significative ( $p < 0,05$ ) à l'acétone. L'extrait qui a la valeur d'inhibition du radical d'hydroxyle (OH) la plus élevée est obtenue avec l'éthanol (77,69 %), les autres valeurs varient entre (43,53 et 37,12 %) (Figure 45). Ces valeurs sont inférieures à celles reportées par Nasir et collaborateurs (Nasir et al., 2018) utilisant l'eau comme solvant d'extraction et ont obtenu les valeurs de 67,97%, 78,81%, 71,67% pour le chou (*Brassica oleracea*), le radis (*Raphanus sativus*) et le navet (*Brassica rapa*) respectivement.

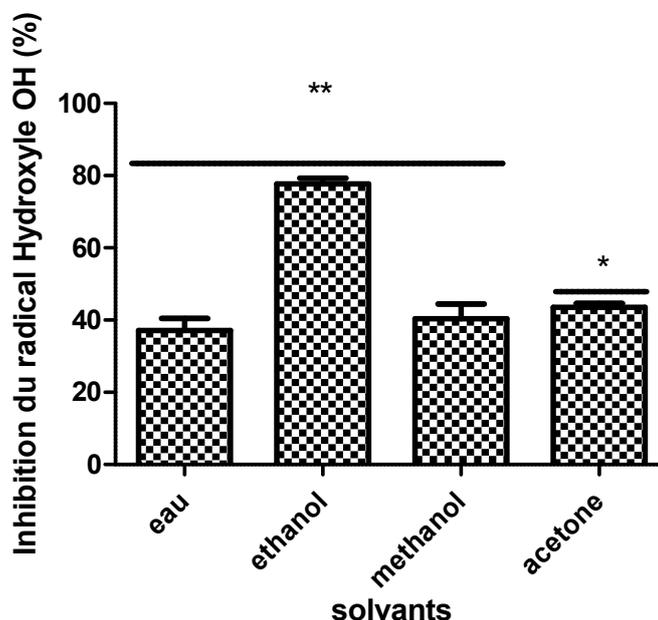


Figure 45. Effet du solvant d'extraction sur l'inhibition du radical Hydroxyle OH sur l'extrait de navet blanc.

### II.2.5. Corrélations entre les teneurs en anti-oxydants et les activités anti-oxydantes

Afin d'évaluer la contribution de la teneur en composés phénoliques totaux, en flavonoïdes totaux, tanins condensés à l'efficacité de l'activité anti-oxydante d'extrait de navet exprimée par les différents tests effectués, un coefficient de corrélation a été analysé et quelques corrélations significatives ont été trouvées (Tableau XIX).

Une corrélation significativement positive a été obtenue entre les composés phénoliques totaux et les activités anti-oxydantes évaluées par l'activité anti-radicalaire (DPPH, ABT), le pouvoir réducteur du fer, l'inhibition du radical hydroxyle et le pouvoir chélateur du fer, et leur coefficient de corrélation est (0,53 ; 0,92 ; 0,88 ; 0,99 et 0,85 respectivement). Ces résultats confirment ceux de Ryu et collaborateurs (Ryu et al., 2012) qui ont rapporté que les composés phénoliques contribuent de manière significative aux activités anti-oxydantes de navet (*Brassica rapa*).

Des coefficients similaires ont été obtenus entre les tanins condensés et les activités anti-oxydantes comme indique dans le Tableau XIX. Les corrélations entre les tanins condensés et les activités anti-oxydantes évaluées par l'activité anti-radicalaire ABTS, le pouvoir chélateur, l'inhibition du radical hydroxyle et le pouvoir réducteur sont supérieures à celles constatées avec l'activité anti-radicalaire DPPH (0,51 ; 0,93 ; 0,89 ; 0,98 et 0,83 respectivement). Cependant, les flavonoïdes représentent une corrélation très faible avec les activités anti-oxydantes évaluées par l'activité anti-radicalaire ABTS, le pouvoir réducteur du fer, l'inhibition du radical hydroxyle et le pouvoir chélateur du fer (0,39 ; 0,112 ; 0,006 ; 0,39 et 0,38 respectivement). Il convient de noter que nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Aires et collaborateurs (Aires et al., 2011) qui ont trouvé une faible corrélation entre le TFC et le DPPH (0,4580) et une corrélation positive modérée entre le TPC et le DPPH (0,64), et celles de Paula Vale et collaborateurs (Paula Vale et al., 2014) qui ont rapportés que des corrélations faibles entre les radicaux hydroxyles DPPH (0,606) et les radicaux d'hydroxyle peroxy (0,484) ont également été trouvés.

Tableau XIX. Corrélation entre les teneurs en antioxydants et les activités antioxydantes.

	DPPH	ABTS	PR	OH	PCF
<b>Composés phénoliques totaux</b>	0,53**	0,92***	0,88***	0,99***	0,85***
<b>Flavonoïdes totaux</b>	0,39*	0,112	0,006	0,39*	0,38*
<b>Tanins condensés</b>	0,51**	0,93***	0,89***	0,98***	0,83***

DPPH: activité anti-radicalaire; ABTS : activité anti-radicalaire ; PR : pouvoir réducteur du fer ; OH : inhibition du radical hydroxyle ; PCF : pouvoir chélateur du fer.

(\*) Corrélation significative à  $p < 0,05$  ; (\*\*) Corrélation très significative à  $p < 0,01$  ;

(\*\*\*) Corrélation très hautement significative à  $p < 0,001$ .

### II.3. Activité antioxydante des fractions enzymatiques du navet blanc

Les étapes de purification employées ont abouti à l'enrichissement de l'activité spécifique du TRP, qui est dû au partage différentiel du TRP et des enzymes contaminantes / protéines totales. Ainsi, les propriétés anti-oxydantes des fractions TRP préparées à différents stades de purification ont été évaluées en fonction de leur capacité à piéger les radicaux (ABTS, OH), leur effet chélatant  $Fe^{2+}$  et leur pouvoir réducteur. Pour chaque activité, le BHT a été utilisé comme référence, à l'exclusion de la capacité de chélation des ions ferreux où l'EDTA était utilisé.

#### II.3.1 Activité Anti-radicalaire ABTS

L'activité de récupération des radicaux ABTS est utilisée pour estimer l'activité anti-oxydante totale des anti-oxydants (Payet et al., 2005). D'après les résultats illustrés dans (Fig 46A), il apparaît que l'activité anti-radicalaire ABTS des fractions enzymatiques diminue significativement ( $p < 0,05$ ) en fonction des étapes de purification. Les fractions enzymatiques perdent environ 50% de leur activité anti-radicalaire ABTS par rapport à celle de l'extrait brut. Les valeurs des activités anti-oxydantes varient entre 96,54% et 46,32%. Cette différence peut être le résultat d'un effet synergique des peptides et polyphénols bioactifs présents dans l'extrait brut puisqu'on sait que les cultures de (*Brassica rapa L.*) sont une source appréciable de composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes (Cartea et al., 2010). La capacité anti-oxydante expérimentelle des fractions enzymatiques pourrait être attribuée à la présence de certains résidus d'acides aminés, tels que Met, His, Trp, Phe, Tyr, Leu, Pro et Gly22. D'autre part, l'élimination de certaines protéines et peptides de bas poids moléculaire a pour effet de réduire l'activité anti-oxydante.

### II.3.2. Pouvoir chélateur du Fer

La plupart du fer est lié à des protéines, comme le transferrin, ou conservé sous forme de ferritine dans un état un peu redox dans le corps. Une surcharge en fer dans le corps peut survenir et nécessiter la consommation de chélateurs exogènes pour empêcher l'accumulation de fer libre circulant dans le corps. De tels chélateurs exogènes peuvent être obtenus à partir de certains antioxydants dans les aliments (Mechri et al., 2020 ; Sellem et al., 2016). Les résultats de l'analyse de chélation, figure 46B, montrent que les fractions des étapes (E2-4) étaient significativement plus faibles ( $p < 0,05$ ) que celles de l'étape E1. Toutes les fractions ont montré un certain degré de pouvoir chélatant, l'activité de l'extrait brut étant la plus élevée (75,23%), la plus faible activité observée dans la fraction enzymatique pure (48,32%). Cette activité pourrait être liée aux peptides riches en Gly et His (Xu et Chance, 2007 ; Liu et al., 2016) et reflète que la nature complexe de l'extrait contenant un certain nombre de chélateurs du fer différents avec différentes affinités du fer de sorte que la diminution de l'activité chélatante des fractions protéiques est proportionnelle à leur teneur en ces acides aminés (Papuc et al., 2017).

### II.3.3. Pouvoir réducteur

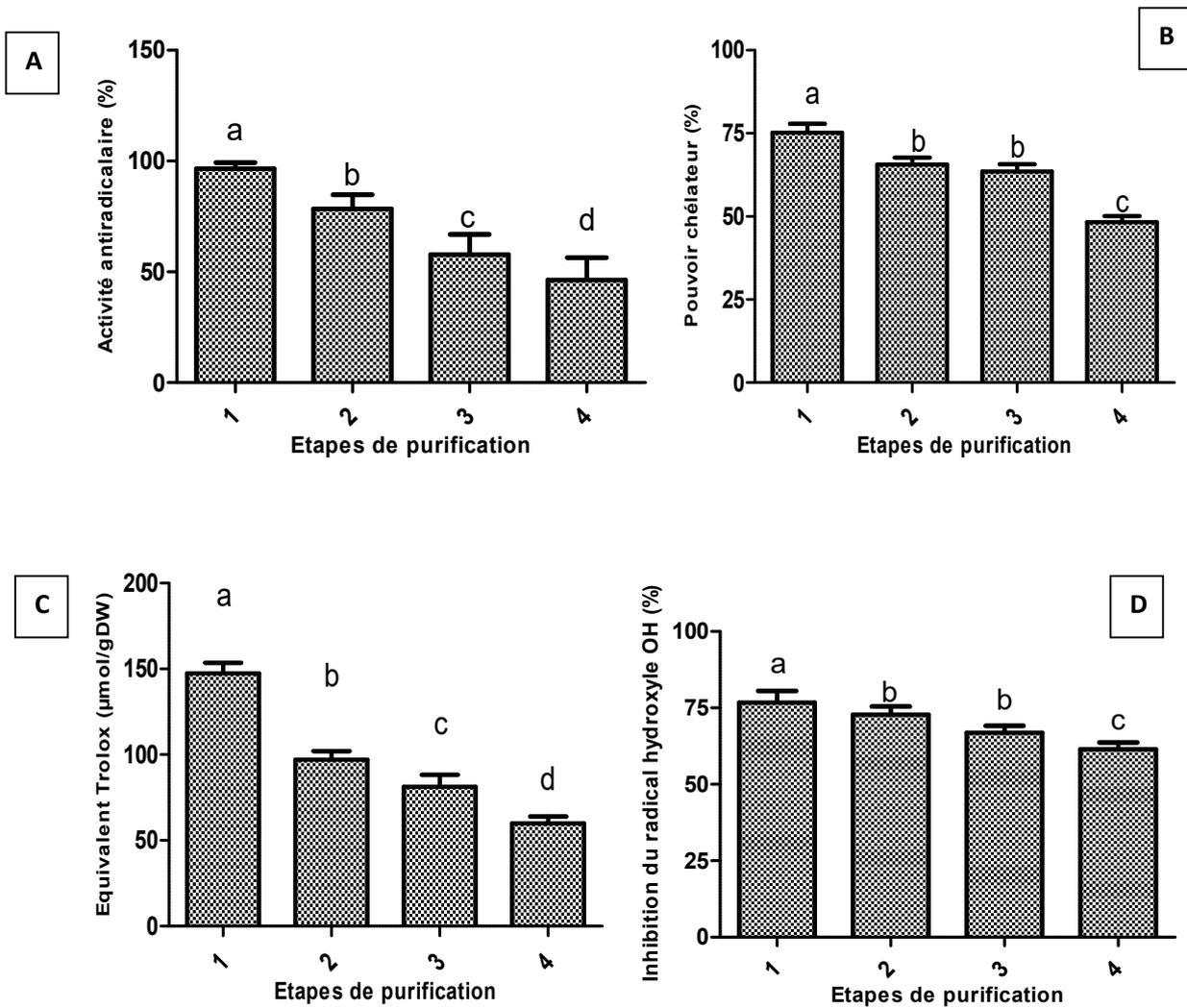
Le pouvoir réducteur a été déterminé en mesurant la réduction du complexe  $Fe_3^+$ /Ferricyanure sous forme ferreuse, a indiqué les implications des mécanismes chimiques les plus fréquemment observés, à savoir le don d'électrons / hydrogène (Mechri et al., 2020). Dans cette étude, le pouvoir réducteur dans toutes les fractions résultant de (précipitation et inhibition avec PVPP), ultrafiltration et chromatographie d'échange d'anions était significativement ( $p < 0,05$ ) inférieure à celle de l'extrait brut (Fig 46C). Les valeurs de puissance de réduction des étapes de purification varient entre 130,76% et 52,96% d'équivalents trolox ( $\mu\text{mol/g MS}$ ). Des niveaux élevés de pouvoir réducteur indiquent la présence de certains composés capables de donner des électrons aux radicaux libres, entraînant la prévention ou le retard de la propagation de l'oxydation.

### II.3.4. Inhibition du radical hydroxyle OH

Le radical hydroxyle est le radical libre le plus réactif et il peut être formé à partir d'un anion super-oxyde et de peroxyde d'hydrogène en présence d'ions métalliques (Csire et al., 2020). Le radical hydroxyle peut facilement réagir avec des biomolécules, telles que

des acides aminés, des lipides, de l'ADN et des protéines (Umeno et al., 2017). Les ROS libres jouent un rôle important dans le métabolisme et le développement des organismes aérobies ; cependant, leur production incontrôlée entraîne un stress oxydatif. En fait, il a été démontré qu'une production excessive de radicaux libres dans les cellules vivantes est responsable des mutations et de la carcinogénèse en induisant une modification de base et une rupture de brin d'ADN. L'activité piégeant les radicaux hydroxyles des fractions enzymatiques diminue de manière significative ( $p < 0,05$ ) en fonction des étapes de purification (Figure 46D). L'activité des radicaux hydroxyles ne présente pas beaucoup de différence entre les étapes de purification, les valeurs varient entre 76,71% et 61,49%. Des études similaires sur les hydrolysats de protéines de soja ont indiqué qu'ils avaient la capacité de piégeage d'hydroxyle la plus élevée (69,75%) (Zhuang et al., 2013). De plus, l'utilisation d'extraits de protéines naturelles ou de protéines purifiées comme antioxydants a été identifiée. Les protéines isolées du soja, des champignons, de la zéine de maïs, de la pomme de terre, de l'igname, des pois chiches et des haricots blancs auraient une activité anti-oxydante (John, 2009). L'activité anti-oxydante des protéines dépend remarquablement de leur composition en acides aminés. Il a été rapporté qu'une teneur élevée en acides aminés hydrophobes dans les protéines pourrait améliorer leur solubilité lipidique et donc faciliter l'admission aux radicaux libres de récupération générés dans la phase lipidique (Qian et al., 2008).

Par exemple, les activités anti-oxydantes de la tyrosine, de la phénylalanine sont dues à leur capacité à donner des protons aux radicaux libres et le tryptophane contient le groupe indole, et il peut servir de donneur d'hydrogène pour inhiber la réaction radicalaire dans la chaîne peroxydative à médiation (Qian et al., 2008). Les acides aminés lysine, arginine, acide aspartique et acide glutamique exercent une activité anti-oxydante en chélatant les ions métalliques. Les pro résidus de peptides sont également importants pour l'élimination des radicaux en raison de sa structure unique. L'histidine peut donner des protons aux radicaux déficients en électrons et améliorer les capacités de piégeage des radicaux ainsi que le chélateur des métaux en raison de son cycle imidazole (Xu et Chance, 2007 ; Liu et al., 2016). De nombreux facteurs pourraient affecter la capacité anti-oxydante des POD, tels que la teneur en acides aminés, l'affinité du substrat, les polarités et structures (Jahangoshaei et al., 2015).



**Figure 46.** Potentiels antioxydants de TRP des racines de navet blanc (*Brassica rapa*.L).

(A) Activité Anti-radicalaire ABTS, (B) Pouvoir chélateur, (C) pouvoir réducteur et (D) inhibition du radical hydroxyle OH. (1, 2, 3 et 4 correspondent aux étapes de purification). Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  écart type ( $n = 3$ ). Les lettres a, b, c et d indiquent des différences significatives pour l'échantillon donné entre les différentes étapes de purification ( $p < 0,05$ ) ; avec  $a > b > c > d$ .

### III. Microcapsulation d'extrait enzymatique du navet blanc

Cette partie de travail a pour objectif de déterminer l'effet de l'encapsulation des peroxydases de navet après la digestion gastro-intestinale *in-vitro* (libération, potentiel antioxydant et leur biodisponibilité dans l'intestin grêle). Pour ce faire, l'extrait enzymatique qui a été purifié dans la deuxième partie de travail, a été encapsulée puis

caractérisée après une optimisation par la conception Box-Behnken de la méthodologie de surface de réponse (MSR). Enfin, les extraits encapsulés et non encapsulés ont été soumis à une digestion gastro-intestinale *in-vitro*. Puis, le potentiel antioxydant a été déterminé après chaque phase de la digestion.

### III.1. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation

#### III.1.1. Analyse du modèle

La conception Box-Behnken de la méthodologie de surface de réponse (MSR) a été utilisée pour optimiser l'encapsulation de l'extrait enzymatique dans le polymère PVA et PLA par double émulsion. Les résultats énumérés dans le tableau XX ont révélé que l'efficacité d'encapsulation était comprise entre 32,89% et 57,29%. L'analyse de la variance du modèle et le manque d'ajustement ainsi que le coefficient de régression de l'efficacité d'encapsulation ont été présentés dans le tableau XX. L'ajustement global a présenté une valeur p de 0,0005 indiquant la signification du modèle développé. Le Défaut d'ajustement (0,089) non significatif ( $p < 0,05$ ), et la valeur élevée du coefficient de détermination (R<sup>2</sup>) montre que le modèle est valide. Les valeurs mesurées ont été ajustées dans un modèle quadratique afin d'établir une régression mathématique appropriée. Comme le montre le tableau XX, le coefficient de régression des termes d'interception, linéaire, quadratique et d'interaction du modèle a été calculé à l'aide de la méthode des moindres carrés. Il est indiqué que les termes linéaires et quadratiques des trois facteurs ainsi que les termes d'interaction de la concentration PVA-PLA et PLA-extrait étaient significatifs ( $p < 0,05$ ), alors que le terme d'interaction de concentration PVA-extrait n'était pas significatif. Il a également été noté que les termes linéaires affectent positivement l'efficacité d'encapsulation, mais que les termes quadratiques influencent négativement sur la réponse, ce qui indique que l'efficacité d'encapsulation augmentait avec l'augmentation des trois facteurs, mais diminuait à des valeurs élevées de ces facteurs. Le modèle polynomial de second ordre (équation 2) pour l'efficacité d'encapsulation peut être donné, en considérant les termes significatifs, comme suit.

$$EE = 46,73 + 3,81x_1 + 1,06x_2 + 3,68x_3 - 0,12x_1x_2 + 0,11x_2x_3 - 5,68x_1^2 - 0,02x_2^2 - 3,17x_3^2 \text{ (Eq. 2)}$$

Où EE : efficacité d'encapsulation (%) ;  $x_1$ , PVA (%);  $x_2$ , concentration de PLA (mg/mL);  $x_3$ , concentration d'extrait (mg/mL).

Tableau XX. Coefficient de régression, erreur standard et résultats du test t de Student de la surface de réponse pour l'efficacité de l'encapsulation.

Paramètre	Estimation	Erreurs standard	Rapport t	Prob.> t
<b>Constante</b>	56,66	0,90	62,94	<0,0001*
$x_1$	1,24	0,55	2,25	0,0744
$x_2$	-1,86	0,55	-3,39	0,0195*
$x_3$	6,00	0,55	10,90	0,0001*
$x_1-x_2$	-2,26	0,77	-2,91	0,0335*
$x_1-x_3$	-0,24	0,77	-0,31	0,7684
$x_2-x_3$	2,04	0,77	2,63	0,0468*
$x_1*x_1$	-5,68	0,81	-7,01	0,0009*
$x_2*x_2$	-9,35	0,81	-11,53	<0,0001*
$x_3*x_3$	-3,17	0,81	-3,91	0,0113*

$x_1$ , PVA (%);  $x_2$ , PLA (mg/mL);  $x_3$ , concentration d'extrait (mg/mL) ;

\* Valeurs statistiquement significatives à  $p < 0,05$

L'analyse ANOVA de la variance a été réalisée pour déterminer si le modèle quadratique est significatif ou non. Les résultats du Tableau XXI montrent qu'une bonne performance du modèle avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) pour les efficacités d'encapsulation de 0,98 et la valeur  $R^2$  ajustée correspondante était de 0,95. Le modèle de régression linéaire est hautement significatif avec une valeur de F (809,97) et la valeur de P (0,0005), Ces résultats suggèrent que ces facteurs ont une influence significative sur les valeurs de la réponse (EE) ainsi le coefficient de régression est significative, donc le modèle mathématique statistiquement est acceptable.

Tableau XXI. ANOVA pour l'effet de PVA, PLA, concentration d'extrait sur l'efficacité d'encapsulation

Source	DF	Somme des carrés	Rapport Fraction	Prob. > F
$x_1$	1	12,30080	5,0576	0,0744
$x_2$	1	27,90045	11,4715	0,0195*
$x_3$	1	288,72045	118,7103	0,0001*
$x_1-x_2$	1	20,56623	8,4560	0,0335*
$x_1-x_3$	1	0,23522	0,0967	0,7684
$x_2-x_3$	1	16,76903	6,8948	0,0468*
$x_1*x_1$	1	119,52502	49,1439	0,0009*
$x_2*x_2$	1	323,10731	132,8488	<,0001*
$x_3*x_3$	1	37,21100	15,2997	0,0113*
Model	9	797,80	88,64	36,44
Défaut d'ajustement	5	12,16		0,089
Modèle total	14	809,97		0,0005*
$R^2 = 0,98$				
Adj $R^2 = 0,95$				

$x_1$ , PVA(%);  $x_2$ , PLA (mg/mL);  $x_3$ , extract concentration (mg/mL)

DF, Degrees of freedom

\* Values statistically significant at  $p < 0,05$

### III.1.2. Analyse de la surface de réponse

Les présentations de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs des trois facteurs indépendants sur l'efficacité d'encapsulation (%) sont tracées sur la figure 47. Le tracé des surfaces de réponse 3D de la concentration de PVA ( $x_1$ ) et PLA ( $x_2$ ) sur la réponse est présenté sur la figure 47A. La concentration de PVA élève induit l'augmentation de l'efficacité d'encapsulation jusqu'au maximum (57,29%). Le rôle du PVA en tant que stabilisant dans le développement de microparticules de polymère a été largement étudié. Puisque la concentration de PVA est un facteur clé dans le contrôle de la taille des particules et de la cinétique de libération (Xie et al., 2014). Avec l'augmentation de la concentration de PVA, il est connu de réduire la tension interfaciale et peut être basé sur l'augmentation de la surface des microparticules de PLA ce qui conduit à une plus grande diffusion des molécules (Mokale et Yadava, 2014 ; Yeo et Park, 2004). Lorsque le pourcentage d'efficacité d'encapsulation diminue avec une augmentation de la quantité de polymère. Cela peut être dû au temps plus long requis pour la précipitation du polymère qui était en plus grande quantité, une autre raison pourrait être la disponibilité d'une plus grande quantité de polymère pour encapsuler le principe actif, ne provoquant ainsi pas la saturation de l'encapsulation (Budhian et al., 2005; Krishnamachari et Lin, 2007). La figure 47B représente l'effet interactif de la concentration de PVA ( $x_1$ ) et de la concentration d'extrait enzymatique ( $x_3$ ) sur l'efficacité d'encapsulation. Ce dernier augmente avec l'augmentation de la concentration de PVA de 0,1 à 1,55% celle donnant la réponse maximale, puis diminue considérablement avec l'augmentation de ce facteur. La raison est probablement que l'extrait contenu dans la microcapsule est recouvert d'une couche de PVA rendant la diffusion difficile, ce qui diminue l'efficacité d'encapsulation. Certains chercheurs ont également signalé qu'une concentration plus élevée de PVA entraîne une viscosité plus élevée dans la phase aqueuse externe, des microparticules plus petites et plus de résidus à la surface des particules (Li, Min, Zhao, Lu et Jin, 2014). L'influence combinée de la concentration de PLA ( $x_2$ ) et de la concentration d'extrait enzymatique ( $x_3$ ) est illustrée sur la figure 47C. Cependant, l'augmentation de la concentration de l'extrait enzymatique au-dessus de 55 mg/mL entraîne une diminution considérable de l'efficacité d'encapsulation et vice versa probablement en raison de la capacité de piégeage limitée de l'extrait enzymatique dans la matrice PLA. Ce résultat est conforme à la conclusion de Feczko et collaborateurs (Feczko et Gyenis 2011), qui indiquaient que dans certaines

conditions, plus la concentration de la protéine BSA dans la phase aqueuse est élevée, plus l'efficacité d'encapsulation est faible.

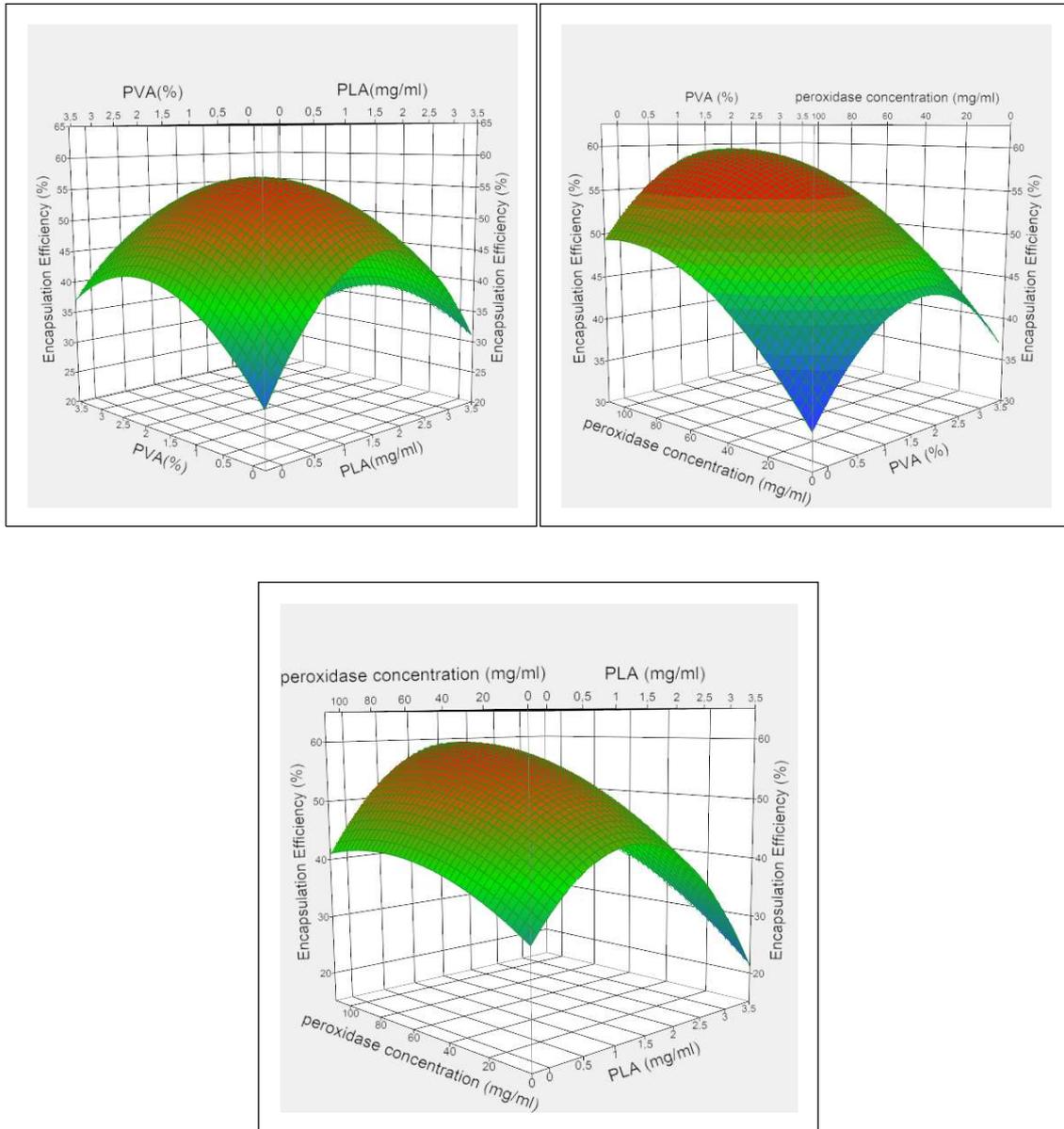


Figure 47. Présentations de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs de la concentration de PVA et de la concentration de PLA (a), de la concentration de PVA et de la concentration de peroxydase (b), et de la concentration de PLA et de la concentration de peroxydase (c) sur l'efficacité d'encapsulation.

### III.1.3. Validation du modèle

Une étude a été menée pour déterminer l'influence des variables du procédé sur l'efficacité de l'encapsulation de l'extrait enzymatique de navet dans les microcapsules de PLA produites par la méthode d'évaporation en double émulsion. Les résultats des conditions optimales pour obtenir l'efficacité d'encapsulation maximale sont une concentration de PVA de 1,55%, PLA de 30 mg/mL et une concentration d'extrait enzymatique de 55 mg/mL. L'efficacité d'encapsulation attendue dans des conditions optimales est de 56,67%. Pour valider le modèle, l'expérience a été réalisée dans des conditions optimales et la valeur d'efficacité d'encapsulation atteinte est de  $57,29 \pm 0,69\%$ . Ce résultat expérimental est statistiquement similaire à celui prédit indiquant ainsi la validation du modèle développé pour l'efficacité d'encapsulation.

## III.2 Caractérisation des microcapsules

### III.2.1. Analyse de la morphologie des microcapsules, de la distribution granulométrique et de l'humidité

La morphologie des microcapsules contenant les peroxydases obtenues dans des conditions optimisées est analysée par MEB. La figure 48A montre que les microcapsules élaborées sont de forme sphérique. D'après la figure 49, le résultat de l'analyse par diffraction laser indique que les valeurs des termes  $d(0,9)$ ,  $d(0,1)$  et  $d(0,5)$  étaient respectivement de  $332 \pm 3$  ;  $209 \pm 2$  et  $766 \pm 4$  qui calculent un intervalle de 1,22 ( $< 2$ ) indiquant une distribution granulométrique étroite autour de la taille moyenne des particules (Barboza et al., 2014).

L'observation de particules à fort grossissement (figure 48B et C) indique une surface rugueuse avec de minuscules pores qui peuvent résulter de l'évaporation de l'eau piégée dans les sphères pendant le processus de lyophilisation (Yang et al., 2001). Des résultats similaires concernant la morphologie de la microcapsule et son aspect de surface ont été observés dans d'autres études (Ahn et al., 2008).

La teneur en humidité des microcapsules élaborées est de  $2,26 \pm 0,15\%$ . Ce résultat est proche d'autres microcapsules préparées en utilisant différents supports dont le  $\beta$ -glucane, la gomme arabique, la pectine et l'inuline avec respectivement 4,97 ; 3,54 ; 3,04 et 2,80%

(Aboul-Enein et Bunaciu Fleshin, 2014). Cela peut indiquer la faible activité de l'eau qui offre une bonne conservation des microcapsules.

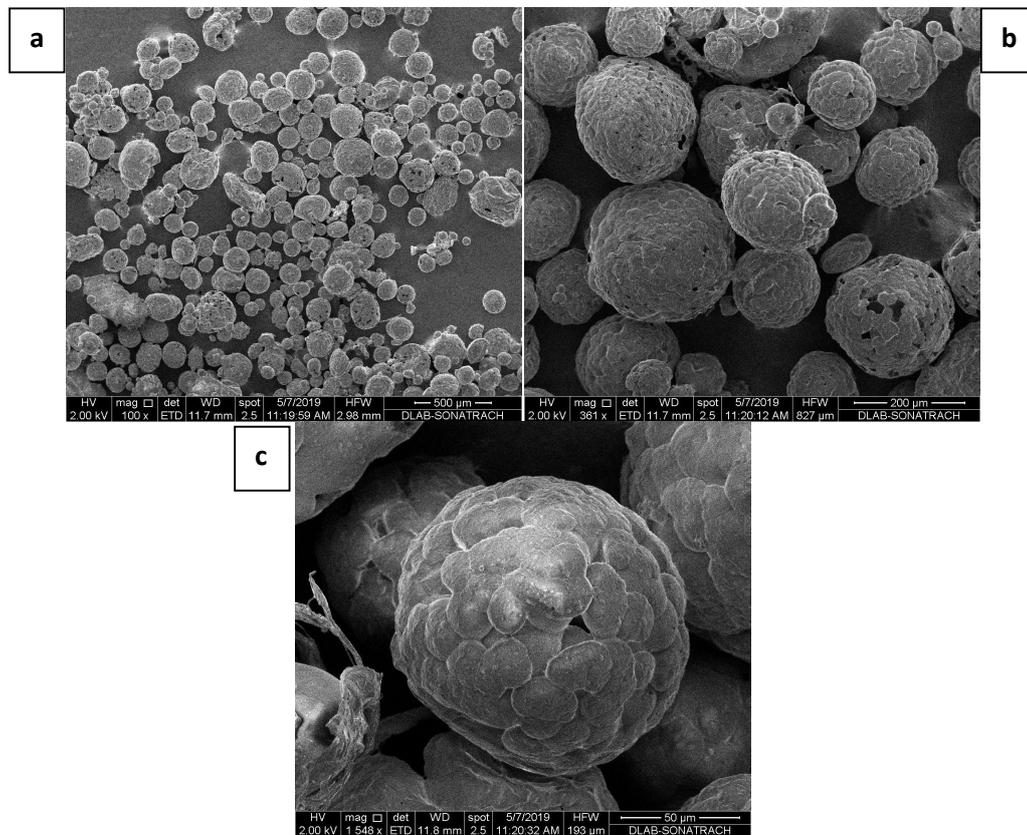


Figure 48. Images de microscopie électronique en conserve (MEB) de microparticules de PLA chargées d'extraits de protéines de peroxydase de navet : (a) La morphologie des microparticules à 500  $\mu\text{m}$  (X100) ; (b) Les microparticules de morphologie à 200  $\mu\text{m}$  (X361) (c) La morphologie des microparticules à 50  $\mu\text{m}$  (X1548).

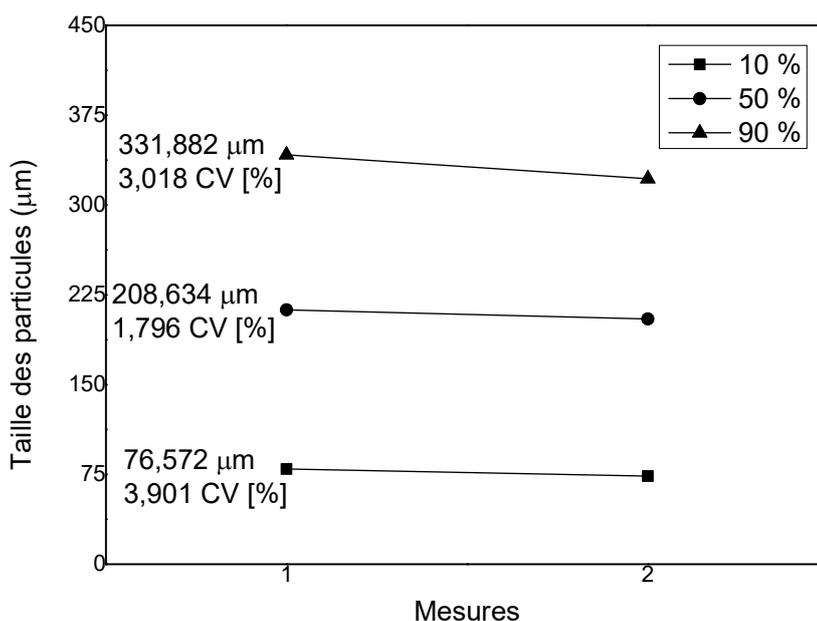


Figure 49. Distribution de la taille des particules

### III.2.2. Analyse par infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse spectrale FTIR du biopolymère PLA de l'extrait enzymatique de navet et de ses microcapsules a été réalisée pour mettre en évidence la présence de protéines dans les microcapsules PLA et pour étudier les liaisons et les groupes fonctionnels avant et après encapsulation. Les spectres de microcapsule et d'extrait enzymatique ont été comparés à ceux du biopolymère PLA. Comme le montre la figure 50, le spectre de l'extrait enzymatique encapsulé a indiqué qu'un pic fort à  $1751\text{ cm}^{-1}$  qui est attribué aux vibrations d'élongation  $\text{C}=\text{O}$  (Sahadevan, Misra et Thankamani, 2016), les pics à  $1060\text{ cm}^{-1}$  correspondent à  $\text{CN}$  étirant les vibrations de l'amine (Santhoshkumar, Rajeshkumar et Kumar, 2017). La présence de pics d'intensité variable a été remarquée autour de  $1080\text{ cm}^{-1}$  correspondant à l'étirement du  $\text{CO}$  des acides carboxyliques, des esters et des anhydrides (Kong et Yu, 2007). Les pics caractéristiques à  $3029\text{ cm}^{-1}$  et  $2869\text{ cm}^{-1}$  sont attribués respectivement à l'étirement asymétrique et symétrique du  $\text{CH}_2$  (Mizutani, Matsumura, Murakami et Mori, 2004). La diminution de l'intensité de bande observée dans le spectre de l'extrait enzymatique introduit dans le PLA peut s'expliquer par la formation de liaisons hydrogène entre les molécules protéiques de l'extrait et des groupes caractéristiques du PLA et/ou par le chevauchement. L'effet de l'encapsulation se manifeste par une

diminution de l'intensité de la bande d'excitation de l'extrait enzymatique. Les pics de transmittance caractéristiques du spectre d'extrait enzymatique et celui de l'extrait enzymatique encapsulé n'ont pas été observés au niveau du spectre PLA, ils correspondent au pic à  $3290\text{ cm}^{-1}$  représentant l'élongation NH de l'amine ou de l'amide (Barth et Zscherp, 2002). Le pic intense à  $612\text{ cm}^{-1}$  était lié à la flexion OCN et le pic à  $537\text{ cm}^{-1}$  correspond à la flexion hors plan C=O (Aboul-Enein, Bunaciu et Fleshin, 2014). Le pic à  $1571\text{ cm}^{-1}$  correspond à la vibration de flexion du  $\text{NH}_2$  (Bai et al., 2011), qui est principalement générée par les protéines (Mizutani et al., 2004). Ces résultats confirment la présence de protéines dans la matrice du biopolymère PLA et la disponibilité de leurs groupements fonctionnels qui apporteront leur réactivité potentielle.

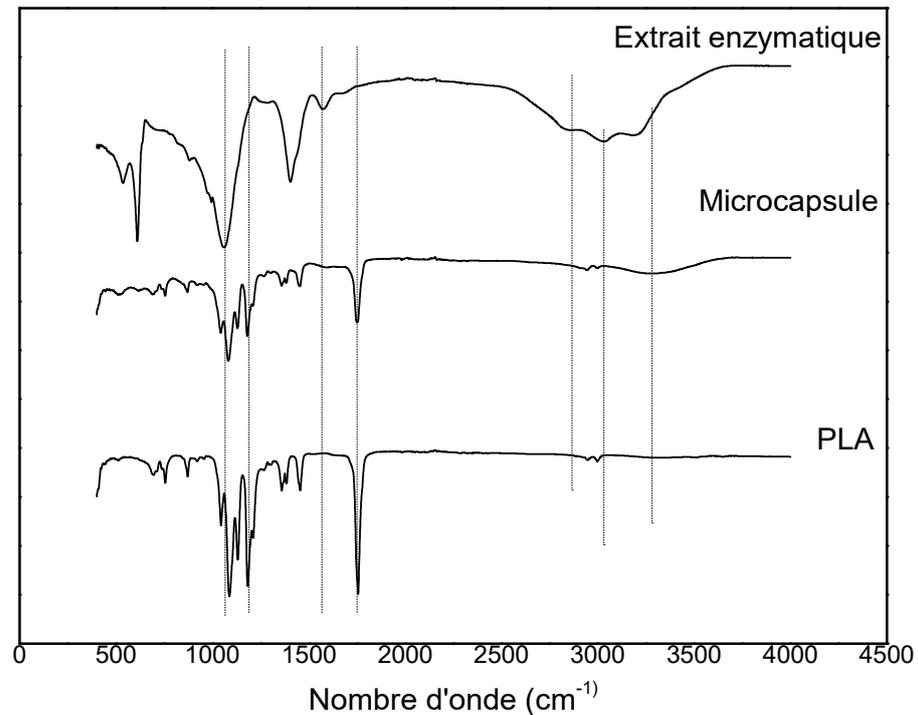


Figure 50. Spectre infra-rouge de la transformée de Fourier de polyacide lactique (PLA), extrait de protéine peroxydase de navet et microcapsules PLA chargées avec extrait de protéine peroxydase de navet.

### III.2.3. Analyse thermogravimétrique

L'analyse thermogravimétrique (ATG) réalisée sur les microcapsules a démontré une dégradation thermique en deux étapes tandis que l'analyse des données ATG pour le PLA pur a montré un mécanisme de dégradation en une étape. La courbe thermogravimétrique du PLA pur a montré une dégradation initiale à environ 300 °C. La courbe thermogravimétrique des microcapsules de PLA chargées de POD (figure 51) a révélé, pour la première étape, une dégradation initiale autour de 110 °C et dans la deuxième étape autour de 300 °C. La première phase est attribuée à la dégradation des peroxydases contenues dans les microcapsules de PLA qui présente une instabilité thermique dans cette plage de température. La deuxième phase de dégradation, similaire à celle du PLA pur, a été attribuée à celle des microcapsules de PLA.

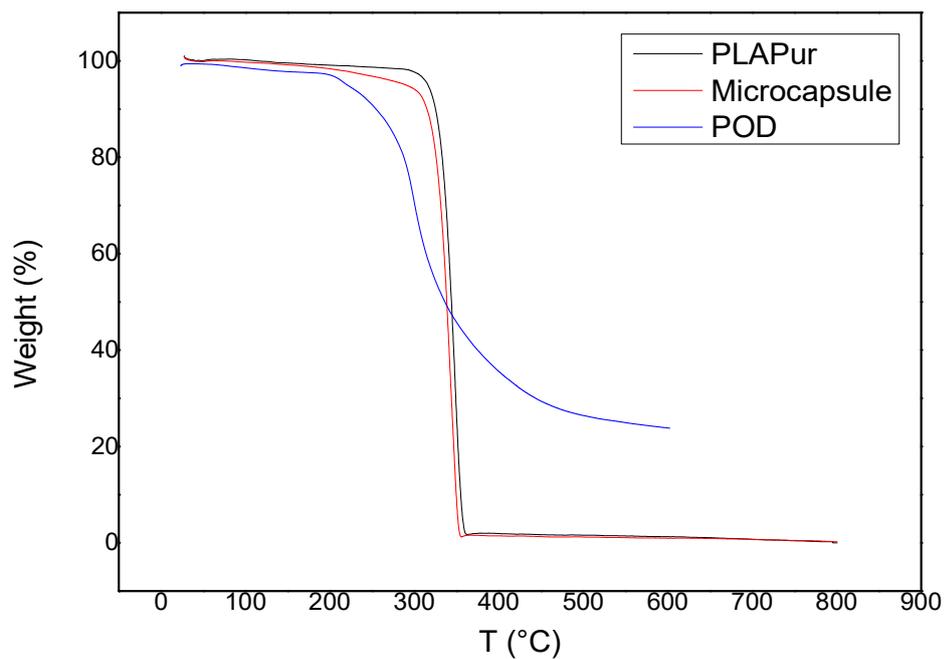


Figure 51. Analyse thermogravimétrique du PLA pur et des microcapsules.

### III.3. Activité spécifique des peroxydases avant et après encapsulation

Avant le processus d'encapsulation de l'extrait enzymatique de navet riche en peroxydases natives (POD), l'extrait brut est passé par les étapes de concentration puis de

purification afin de récupérer les principales fractions enzymatiques. Les résultats (figure 53) montrent que l'activité spécifique de la peroxydase est 4 fois plus élevée (743,77 U/mg) que l'activité de l'extrait brut (187,4 U/mg). Ceci est certainement dû à l'augmentation de la concentration de POD tout au long des étapes de purification. Plusieurs études rapportent l'augmentation des activités enzymatiques après purification et pour le POD particulièrement purifié à partir du navet (Duarte-Vázquez et al., 2000 ; Motamed et al., 2009), et des prunes (Enachi et al., 2018). Cependant, après l'encapsulation de l'extrait enzymatique, l'activité POD a diminué de près de 50% (328,62 U/mg) et ce résultat était attendu. En effet, il est largement reconnu que l'immobilisation des enzymes entraîne une diminution de leurs activités mais augmente leur stabilité et prolonge leur disponibilité (Datta et al., 2013). De toute évidence, l'activité enzymatique doit être maintenue pendant et après l'encapsulation même si dans certains cas, la stabilité de l'enzyme peut diminuer après l'immobilisation, par exemple, lorsque le support est capable d'établir des interactions indésirables avec l'enzyme (Mateo et al., 2007). Une étude similaire réalisée par Han et collaborateurs (Han et al., 2020) dans laquelle des microsphères poreuses étaient utilisées comme supports pour co-immobiliser plusieurs enzymes. Il a été rapporté que l'activité spécifique de l'enzyme libre diminuait après l'immobilisation. Un autre résultat a été rapporté par Falleiros et collaborateurs (Falleiros et al., 2017) qui ont observé que l'activité spécifique de la  $\beta$ -galactosidase libre (32,03 U/mg) diminue après immobilisation (28,56 U/mg).

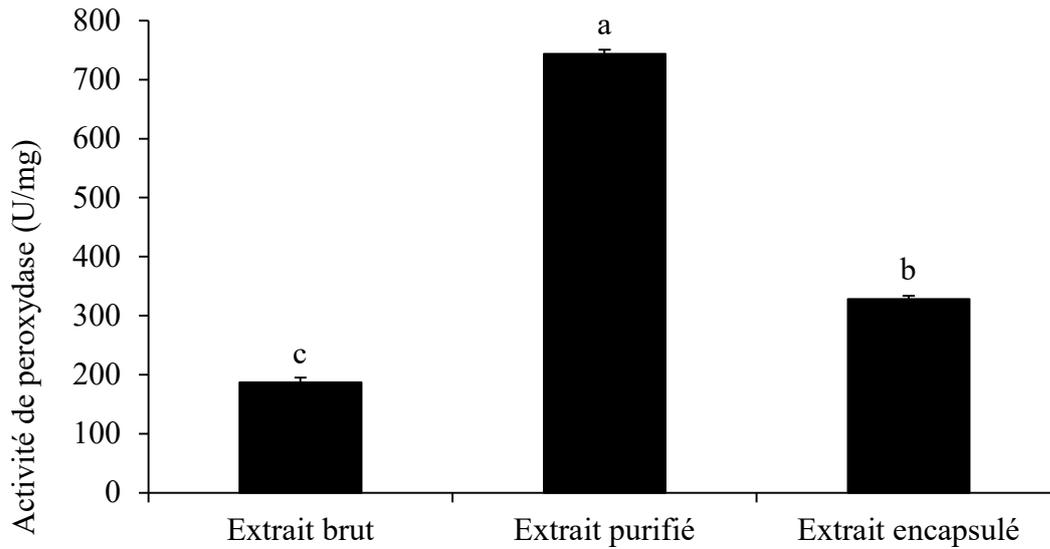


Figure 53. Activité spécifique de la peroxydase d'enzymes brutes et purifiées et d'enzymes encapsulées. Chaque valeur représente la moyenne  $\pm$  ET. Les résultats avec des lettres différentes sont statistiquement différents à  $p < 0,05$  (test ANOVA-LSD ;  $a > b > c$ ).

#### III.4. Libération d'enzymes *in vitro*

La cinétique de libération de l'extrait enzymatique protéique (protéines solubles) du navet sans et avec encapsulation, a été étudiée dans deux milieux simulés, le milieu gastrique (pH 2,5) et le milieu intestinal (pH 7,4) incubés à 37 °C (figure 54). Les résultats de cette étude ont montré que les protéines contenues dans les microcapsules de PLA préparées présentent un comportement de libération différent entre les deux milieux. En effet, la libération *in vitro* des protéines dans le milieu intestinal à pH 7,4 est plus rapide que dans le milieu gastrique à pH 2,5 en raison notamment des échanges d'ions (Simonoska Crcarevska, Glavas Dodov, & Goracinova, 2008). Les recherches menées suggèrent qu'un mécanisme alternatif, pour contrôler la rétention et la libération des protéines des particules de polymère, consiste à utiliser des interactions attractives ou répulsives spécifiques entre les protéines et les molécules du polymère (Longo et Szleifer, 2016 ; Schillemans, Hennink et van Nostrum, 2010). L'un des moyens les plus couramment utilisés pour contrôler les interactions moléculaires consiste à modifier le pH pour affaiblir ou renforcer l'interaction électrostatique au sein des particules de polymère (Rahmani et al., 2017). D'une part, à des valeurs de pH inférieures au point isoélectrique, les protéines portent une charge positive nette, en raison d'un degré élevé de protonation des groupes amino et d'un faible degré de dissociation des groupes carboxyle. Il y a donc une forte

attraction entre les protéines et les polymères, par conséquent, les protéines auront tendance à être retenues à l'intérieur des particules (Zhang et al., 2016). En revanche, à des valeurs de pH supérieures au point isoélectrique, les protéines portent une charge nette négative, en raison du degré élevé de dissociation des groupes carboxyle et du faible degré de protonation des groupes amino (Rahmani et al., 2017). Dans ce cas, les protéines et le polymère anionique ont des charges similaires (toutes deux négatives) et les protéines auront tendance à être libérées par répulsion (Xie et al., 2014). Le taux de solubilisation des protéines sans encapsulation dans les deux milieux (pH 2,5 et pH 7,4) était de 90% pendant les premières minutes avec des temps différents. Alors que le taux de libération des protéines encapsulées dans le milieu à pH 7,4 (simulant le pH dans l'intestin) était d'environ 65% au bout des 4 premières heures. De même, la libération de protéines dans le milieu acide à pH 2,5 (simulant le pH dans l'estomac), durant les 2 premières heures, environ 15% des protéines ont été libérées, suivie d'une libération lente au fil du temps restant (Fig 24A et B). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Shu et collaborateurs (Shu et al. 2010) pour la libération de BSA à partir de nanocapsules qui a été réalisée dans des solutions tampons avec pH 1,4 et 7,4, respectivement. La libération de BSA était supérieure à 60% à pH 7,4 et 10% à pH 1,4 pendant les 2 premières heures. Une autre étude, celle de Bhattarai et collaborateurs (Bhattarai et al., 2005), a suggéré qu'une libération de BSA encapsulée à partir du polymère PEG était d'environ 52 à 67% au cours des 5 premières heures à pH 7,4. Ces résultats ont montré que les protéines incorporées dans le PLA ont une vitesse de libération considérablement plus lente que les protéines non encapsulées. Les microcapsules peuvent non seulement protéger la protéine libérée de la perte en milieu acide, mais également contrôler la libération dans le tractus gastro-intestinal, c'est ce qu'on appelle l'effet retardateur, qui peut être attribué à la stabilisation des molécules de protéines dans les microcapsules (Lin et al., 2007 ; Zheng et al., 2016). Ces résultats signifient probablement que les enzymes antioxydantes de l'extrait pourraient avoir des effets protecteurs au niveau intestinal en raison de la forte solubilité et de la libération de l'extrait trouvée à pH 7,4 et correspondant au temps de transit gastro-intestinal (4h).

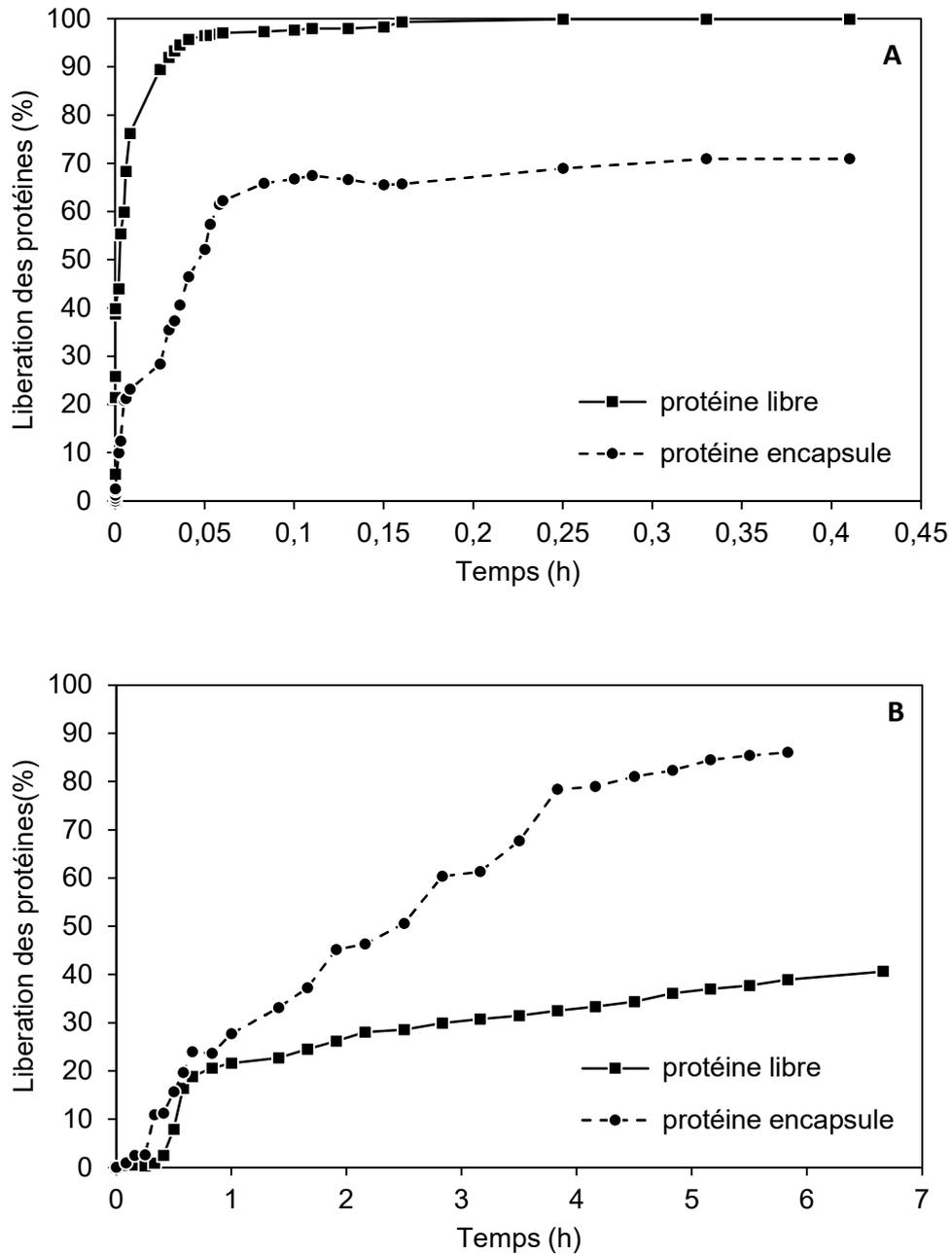


Figure 54. Profils de libération enzymatique *in vitro* à pH 7,4 (A) et pH 2,5 (B).

### III.5. Stabilité de l'extrait enzymatique libre et encapsulé pendant le stockage

Les résultats de l'étude de stabilité de l'extrait enzymatique de navet libre et encapsulé riche en peroxydases à 25, 4 et -20 °C sont représentés sur la figure 55 comme la cinétique de dégradation des activités POD au cours des 90 jours de surveillance. Les résultats montrent que l'extrait enzymatique encapsulé stocké à 25 et 4 °C, présente une activité POD résiduelle bien maintenue avec environ 60% des activités initiales pendant 80

jours de stockage, tandis que le POD libre perd son activité initiale progressivement en 15 et 30 jours à 25 et 4 °C, respectivement. Une étude similaire a été menée en utilisant des nanoparticules d'alginate pour l'immobilisation de la peroxydase de navet (Meeran et al., 2004). Les auteurs ont rapporté que l'enzyme soluble perdait près de 85% de son activité en 30 jours à 4 °C, tandis que la préparation enzymatique réticulée piégée à l'alginate conservait plus de 92% de l'activité dans des conditions expérimentales similaires. Zdarta et collaborateurs (Zdarta et al., 2017) ont rapporté que l'enzyme immobilisée se caractérise par une activité plus élevée que la cellulase libre après 30 jours de stockage à 4 et 25 °C. Elle conserve plus de 95% et 85% de son activité initiale contre 75% et moins de 40% dans le cas de l'enzyme libre. Les résultats du stockage à -20 °C montrent que l'extrait enzymatique encapsulé a conservé plus de 70% de l'activité POD initiale, tandis que les peroxydases libres ont perdu près de 60% de l'activité initiale en 60 jours et restent ensuite stables jusqu'à toute la période de stockage. Ces résultats indiquent que l'encapsulation utilisée dans cette étude a amélioré la stabilité des peroxydases pendant le stockage. Ceci prouve également que l'utilisation du polymère biodégradable PLA comme agent d'enrobage dans l'encapsulation enzymatique des peroxydases a un effet positif sur la stabilité de l'activité enzymatique. Une observation similaire a été rapportée par Swarnalatha et collaborateurs (Swarnalatha et al., 2013) qui ont observé une stabilité élevée de l' $\alpha$ -amylase après encapsulation dans l'agent de revêtement. L'immobilisation a augmenté la tolérance à la température de l'enzyme en présence d'agents d'enrobage fournissant ainsi un environnement adéquat pour la réaction des enzymes avec ses substrats (Zhou et Chen, 2001).

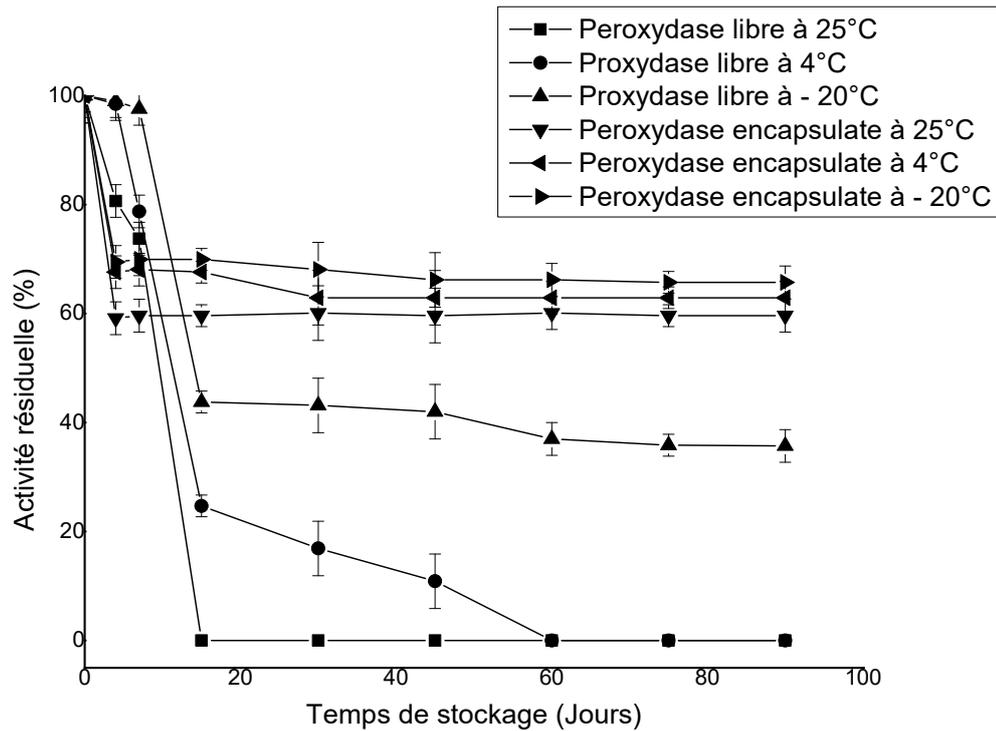


Figure 55. Dégradation cinétique des activités POD d'extrait enzymatique encapsulé et non encapsulé pendant le stockage à différentes températures.

### III.6. Effet de la digestion *in vitro* sur le potentiel antioxydant d'extrait enzymatique du navet

#### III.6.1. Activité enzymatique et la teneur en protéines totaux

Les antioxydants peuvent être affectés par ces conditions oxydantes changeantes. Ainsi, il est nécessaire d'étudier la stabilité des antioxydants dans le tractus gastro-intestinal. Les méthodes *in vitro* pour simuler le tube digestif humain sont largement utilisées car elles sont rapides, sûres et n'ont pas les mêmes restrictions éthiques que les méthodes *in vivo*.

Le tableau XXII montre les résultats de la digestion *in vitro* des extraits protéiques du navet avant et après l'encapsulation, l'analyse statistique montre que l'activité enzymatique de peroxydase de l'extrait non encapsulé diminue significativement ( $p < 0,05$ ) de la phase orale ( $9578,83 \pm 6,06$  U/mg) à la phase intestinale ( $84,21 \pm 1,91$  U/mg), tandis que l'activité de l'extrait encapsulé augmente significativement de la phase orale ( $82,42 \pm 5,64$ )

à la phase intestinale ( $416,91 \pm 8,67$ ). Concernant la teneur en protéines totaux de l'extrait non encapsule diminue significativement ( $p < 0,05$ ) de la phase orale ( $662,33 \pm 2,51$  mg/100g EQ) à la phase intestinale ( $150,13 \pm 5,62$  mg/100g EQ). Cependant, pour l'extrait encapsule, les teneurs en protéines totaux augmentent avec les phases de la digestion (*orale < gastrique < intestinale*).

### III.6.2. Activité antioxydant

Tous les composés bioactifs présents dans les aliments ne seront pas finalement absorbés par le corps humain en raison des différentes conditions physicochimiques et biochimiques au cours du processus de digestion (Gunathilake et al., 2018). Les méthodes de digestion simulées comprennent généralement les phases orale, gastrique et intestinale restreinte, et parfois une fermentation intestinale importante. Ces méthodes tentent d'imiter les conditions physiologiques *in vivo*, en tenant compte de la présence d'enzymes digestives et de leurs concentrations, du pH, du temps de digestion et des concentrations en sel (Minekus et al., 2014).

#### III.6.2.1. Activité anti radicalaire ABTS

L'activité piégeant les radicaux ABTS a été largement utilisée pour tester l'activité antioxydante. Le mécanisme s'attribue principalement aux réactions de transfert d'électrons pour inhiber la voie d'auto-oxydation en convertissant les radicaux en produit relativement stable (Wang et al., 2016).

L'activité anti-radicalaire ABTS des extraits digérés non encapsulés présente une diminution significative ( $p < 0,05$ ) au cours les phases de la digestion (tableau XXII) tandis que pour l'extrait encapsule, cette activité est diminuée dans le milieu gastrique après elle augmente dans le milieu intestinal. En effet, l'augmentation des propriétés hydrophobes des digesteurs gastro-intestinaux après traitement à la pepsine les rend moins susceptibles de réagir avec le radical  $ABTS^+$  soluble dans l'eau. Cependant, l'augmentation de la propriété hydrophile des digesteurs gastro-intestinaux après un traitement à la pancréatine favorise leur piégeage du radical  $ABTS^+$  et augmente l'activité de piégeage de radical ABTS (You et al., 2010). Le polymère des microcapsules empêche la libération des protéines dans les fluides gastriques, et favorise la libération dans les fluides intestinaux (Pablo et al., 2011), les microcapsules améliorent la solubilité des extraits dans des

solutions aqueuses et lorsqu'elles sont dispersées, elles ont une plus grande surface de contact avec le fluide, augmentant le pourcentage de libération de l'extrait dans les capsules (Zheng et al., 2011).

### **III.6.2.2. Pouvoir chélateur des ions ferriques**

Dans cette étude, le pouvoir chélateur des fractions protéiniques des extraits de navet digérés encapsulé et non encapsulé présente des différences significatives ( $p < 0,05$ ) au cours du processus de digestion. La valeur de pouvoir chélateur plus élevée est enregistrée dans la phase intestinale. L'augmentation de cette activité peut être liée à l'exposition des acides aminés présentant une capacité de liaison aux métaux (Peng et al., 2010). Tintoré et collaborateurs (Tintoré et al., 2015), dans leur étude, ont également observé une augmentation de l'activité chélatrice du fer après la digestion. En effet, Teixeira et collaborateurs (Teixeira et al., 2016), suggèrent que les hydrolysats après le GID pourraient être électromagnétiques ou hydroniques, la digestion a provoqué une augmentation de l'activité chélatrice du fer des hydrolysats de protéines de poisson.

### **III.6.2.3. Pouvoir réducteur**

La méthode de FRAP est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  grâce au don d'électrons ou d'hydrogène (AK et al., 2016). La forme réduite donne une couleur verte dont l'intensité est proportionnelle au pouvoir réducteur de l'extrait (Ladoh Yemeda et al., 2014).

Comme le montre le tableau XXII, le pouvoir réducteur des fractions protéiques des extraits de navet digérés non encapsules présente une diminution de manière significative ( $P < 0,05$ ) après traitement à la pepsine et de la pancréatine. Les valeurs de pouvoir FRAP les plus élevées ont été enregistrées dans la phase orale et gastrique par contre dans la phase intestinale a été très faible tandis que pour les fractions de l'extrait encapsule, le pouvoir réducteur augmente avec les phases de digestion. L'augmentation du pouvoir réducteur des digesteurs gastro-intestinaux montre que les microcapsules d'extrait peuvent être des donneurs d'hydrogène ou d'électrons plus efficaces après digestion *in vitro*. Ce résultat est conforme à celui de Zhu et collaborateurs (Zhu et al., 2008), qui ont constaté que le pouvoir réducteur de l'hydrolysate de zéine était considérablement augmenté après traitement par la pepsine pendant 1 h et la pancréatine pendant 2 h.

#### III.6.2.4. Activité anti-radicalaire de radical OH

Les activités d'élimination des radicaux hydroxyles des fractions protéiques digérés encapsules et non encapsules d'extrait du navet sont représentées sur tableau XXII. L'activité des radicaux hydroxyles de l'extrait non encapsulé était de  $124,10 \pm 1,73 \mu\text{molTE}/100\text{g}$  dans la phase orale, après 2h de digestion par la pepsine, l'activité radicalaire hydroxyle de la digestion gastro-intestinale a été considérablement réduite à  $76,44 \pm 0,078 \mu\text{molTE}/100\text{g}$  de manière significative ( $p < 0,05$ ). La digestion par la pancréatine pendant 2h n'a pas apporté de changement significatif à l'activité de piégeage des radicaux hydroxyles dans la phase intestinale. Cependant, une digestion plus poussée par la pancréatine pour l'extrait encapsule a porté une activité de piégeage des radicaux hydroxyles plus grands dans la phase intestinale par rapport à la phase gastrique. L'augmentation de l'activité de piégeage des radicaux montre que les protéines dans les capsules peuvent être des donneurs d'hydrogène ou d'électrons plus efficaces après digestion intestinale. D'après You et collaborateurs (You et al., 2010), la digestion des hydrolysats de protéine du loach a provoqué une faible augmentation de l'activité anti-radicalaire hydroxyle après la digestion par la pancréatine.

#### III.6.2.5. Corrélation entre les activités antioxydantes et la teneur en protéines totaux et l'activité enzymatique

L'utilisation biologique d'une protéine dépend principalement de sa digestibilité par les peptidases gastriques, pancréatiques et intestinales, ce qui permet de comprendre que la digestion peut jouer un rôle majeur dans la modulation de la fonction physiologique des protéines alimentaires (Lui et al., 2016). Le tractus gastro-intestinal (GI) est connu pour être un site d'oxydation majeur dans le corps humain (Kotamraju et al., 2001). Un certain nombre d'études ont lié les espèces réactives de l'oxygène (ROS), générées au cours du processus de digestion, aux maladies du tractus gastro-intestinal (Carrieret al., 2001). Pendant la digestion gastro-intestinale, les antioxydants sont exposés à Fe, Cu,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , à l'hème, aux peroxydes lipidiques, aux NO et aux aldéhydes d'origine alimentaire (Sannaveerappa et al., 2008).

Afin d'évaluer la contribution des anti-oxydantes enzymatiques à l'efficacité anti-oxydante d'extrait protéique de navet pendant la digestion gastro-intestinale, les coefficients de

corrélation entre les activités anti-oxydantes, la teneur en protéine et l'activité enzymatique de peroxydase ont été déterminées (tableau XXIII).

Les résultats montrent que les fractions purifiées d'extrait du navet non digère ont présentées une corrélation significative ( $p < 0,05$ ) entre la teneur en protéines totales et les activités antioxydantes (ABTS, OH, PCH), tandis que le coefficient de corrélation de l'activité de FRAP n'est pas significatif. D'autre part, l'activité enzymatique corréle significativement ( $p < 0,05$ ) avec les activités (ABTS, OH, FRAP), par contre elle présente une faible corrélation avec l'activité de pouvoir chélateur.

Pour les fractions purifiées des extraits digères encapsule et non encapsule, l'activité enzymatique et la teneur en protéine sont corrélées significativement ( $p < 0,05$ ) avec toutes les activités (ABTS, FRAP, OH, PCH) dans la phase intestinale. Tandis que dans la phase orale, l'activité du pouvoir chélateur présentée une faible corrélation avec l'activité enzymatique et la teneur en protéine pour les deux extraits encapsule et non encapsule. Ainsi, dans la phase gastrique, le coefficient de corrélation est faible entre les activités (FRAP, OH) et (la teneur en protéine et l'activité enzymatique) pour l'extrait non encapsule et encapsule respectivement.

Tableau XXII. Activité enzymatique de peroxydase, activités antioxydantes (ABTS, FRAP, OH, PCH) et teneurs en protéines totaux avant et après la digestion gastro-intestinale in vitro

Activité enzymatique ; concentration de protéines	Extrait protéique de navet						
	Extrait protéique non digéré	Non Encapsulé			Encapsulé		
		Orale	Gastrique	Intestinale	Orale	Gastrique	Intestinale
Act ( $\mu$ /mg)	21545,19 $\pm$ 23,53	9578,83 $\pm$ 36,06 <sup>a</sup>	922,44 $\pm$ 1,07 <sup>b</sup>	427,21 $\pm$ 1,91 <sup>c</sup>	82,42 $\pm$ 5,64 <sup>c</sup>	102,76 $\pm$ 2,85 <sup>b</sup>	416,91 $\pm$ 8,67 <sup>a</sup>
Prot (mg/100g EQ)	4227 $\pm$ 4,68	662,33 $\pm$ 2,51 <sup>b</sup>	277,29 $\pm$ 1,92 <sup>c</sup>	150,13 $\pm$ 5,62 <sup>a</sup>	8,41 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	180,55 $\pm$ 1,44 <sup>b</sup>	319,44 $\pm$ 1,92 <sup>a</sup>
<b>Activité antioxydantes</b>							
ABTS ( $\mu$ mol)TE/100g)	1622,22 $\pm$ 11,92	1604,66 $\pm$ 6,02 <sup>a</sup>	315,12 $\pm$ 2,77 <sup>b</sup>	148,55 $\pm$ 1,18 <sup>c</sup>	664,44 $\pm$ 3,97 <sup>a</sup>	210,21 $\pm$ 3,35 <sup>c</sup>	429,99 $\pm$ 3,33 <sup>b</sup>
FRAP ( $\mu$ mol)TE/100g)	1068,33 $\pm$ 50,52	344,33 $\pm$ 2,67 <sup>a</sup>	244,33 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup>	52,21 $\pm$ 0,019 <sup>c</sup>	513,55 $\pm$ 9,92 <sup>b</sup>	777,22 $\pm$ 12,50 <sup>a</sup>	797,88 $\pm$ 6,31 <sup>a</sup>
OH ( $\mu$ mol)TE/100g)	11455,55 $\pm$ 19,24	124,10 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>	76,44 $\pm$ 0,078 <sup>b</sup>	48,79 $\pm$ 0,055 <sup>b</sup>	361 $\pm$ 9,05 <sup>a</sup>	203,33 $\pm$ 3,33 <sup>b</sup>	278,88 $\pm$ 38,49 <sup>b</sup>
PCH (%)	85,07 $\pm$ 1,3	59,18 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	37,23 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	28,45 $\pm$ 1,5 <sup>c</sup>	42,58 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	28,03 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>	35,11 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois (n=3).

Les lettres dans la même rangée indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les phases de la digestion. Avec  $a > b > c$

Tableau XXIII. Coefficients de corrélation entre activités antioxydantes (ABTS, FRAP, OH, PCH) et activité enzymatique de peroxydase, teneurs en protéines totaux.

	Extrait protéique non digéré	Non Encapsulé			Encapsulé		
		Orale	Gastrique	Intestinale	Orale	Gastrique	Intestinale
ACT-ABTS	0,98*	0,67	0,95*	0,75	0,91*	0,95*	0,99*
ACT-FRAP	0,68	0,6	0,77	0,79	0,94*	0,58	0,87*
ACT-OH	0,98*	0,64	0,56	0,98*	0,87*	0,81*	0,72
ACT- PCH	0,45	0,53	0,67	0,98*	0,55	0,75	0,87*
Prot-ABTS	0,99*	0,81*	0,96*	0,61	0,66	0,91*	0,99*
Prot-FRAP	0,55	0,86*	0,99*	0,67	0,73	0,48	0,87*
Prot-OH	0,99*	0,83*	0,48	0,93*	0,93*	0,87*	0,96*
Prot-PCH	0,80*	0,98*	0,56	0,75	0,59	0,87*	0,95*

\* les coefficients de corrélation sont significations à  $p < 0,05$ .

# **Conclusion et Perspectives**

## Conclusion et perspectives

Le travail présenté dans cette thèse porte sur l'étude de la stabilité, la biodisponibilité et le potentiel antioxydant des peroxydases du navet (*Brassicarapa. L*), après leur encapsulation dans un polymère biodégradable PLA.

Les analyses physico-chimiques montrent que le taux de l'humidité, de cendres et de Brix de navet blanc est de  $94,28 \pm 0,31\%$ ,  $0,67 \pm 0,06\%$ ,  $7,75\%$  respectivement. Le dosage des sucres, des protéines et de l'acidité révèle des teneurs de  $401,59 \pm 3,00$  (mg/100g),  $41,32 \pm 0,12$  (mg/100g),  $1,34 \pm 0,02$  (g/L) respectivement.

Dans le but de déterminer les conditions optimales de l'activité enzymatique des peroxydases (POD) du navet (*Brassicarapa. L*), l'enzyme a été extraite à partir des racines du navet avec  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,5 M (pH 7,0) et l'activité de la peroxydase a été évaluée en surveillant l'oxydation du gaïacol en tétragaïacol en présence du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Avant l'optimisation de l'activité peroxydase du navet par la méthodologie de surface de réponse (RSM), une étape préliminaire a été menée pour chaque paramètre étudié (pH, température et concentration en NaCl). De plus, le RSM suivant la conception Box-Behnken a été utilisé afin de modéliser l'optimisation des conditions. L'analyse des résultats de la RSM a montré que les valeurs des paramètres avec l'activité peroxydase la plus élevée sont respectivement de 5,9 ;  $29,8^\circ\text{C}$  et 1,07 M pour le pH, la température et la concentration de NaCl. Dans ces conditions expérimentales, l'activité peroxydase a atteint la valeur optimale de 4027,25 U/mg. La valeur expérimentale obtenue est en accord avec celle de la valeur calculée, indiquant la pertinence du modèle développé pour l'optimisation de l'activité peroxydase.

Au cours de ce travail et dans le but de caractériser la POD extraite, nous avons purifié les peroxydases à partir des racines du navet jusqu'à homogénéité indiquant une masse moléculaire d'environ 58 kDa attestée par électrophorèse sur gel de dodécyl sulfate de sodium-polyacrylamide (SDS-PAGE) et chromatographie par filtration sur gel à haute performance (HPLC). Le facteur de purification pour le TRP purifié était de 19 avec un rendement de 51,1%. L'activité spécifique et la valeur (RZ) de l'enzyme purifiée étaient respectivement de 14 500 U/mg et 2,9. La séquence N-terminale des 19 premiers résidus d'acides aminés de TRP a montré une forte similitude avec celles des POD. Il a montré une activité optimale à pH 6 et  $55^\circ\text{C}$ . Fait intéressant, cette peroxydase était complètement

inhibée par l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) et le cyanure de potassium (KCN), suggérant la présence de composants hème dans sa structure tridimensionnelle.

Concernant l'étude des activités antioxydantes des composés phénoliques d'extrait brut du navet et des fractions enzymatiques de chaque étape de purification, l'analyse de la composition en substances antioxydantes de l'extrait brut du navet a révélé des différences significatives entre les différents solvants étudiés. Les teneurs en composés phénoliques, en flavonoïdes varient respectivement de 935,7 à 1732 mg / 100 g MS et de 281 mg / 100 g à 690,4 mg / 100 g MS, les teneurs en tanins condensés varient de 2,67 à 3,35 mg / 100 g MS. Les résultats des activités antioxydantes de l'extrait brut du navet par différents solvants indiquent que les antioxydants du navet ont des activités inhibitrices des radicaux DPPH et ABTS, l'inhibition du radical Hydroxyle OH et des aptitudes à réduire et de chélater le fer. Une corrélation significativement positive a été obtenue entre les composés phénoliques totaux, les tanins condensés et les activités antioxydantes évaluées par l'activité antiradicalaire (DPPH, ABT), le pouvoir réducteur du fer, l'inhibition du radical hydroxyle et le pouvoir chélateur du fer, par contre la concentration en flavonoïdes et les activités antioxydantes sont faiblement corrélés.

Les résultats des activités antioxydantes montrent que les fractions enzymatiques perdent leur potentiel antioxydant pendant les étapes de purification. Il apparaît que l'activité anti-radicalaire ABTS des fractions enzymatiques diminue de manière significative par les étapes de purification. Les fractions enzymatiques perdent environ 50% de leur activité anti-radicalaire ABTS par rapport à celle de l'extrait brut. Les valeurs des activités antioxydantes varient entre 46,32 et 96,54%. Les résultats de l'analyse de la propriété chélatante montrent que les fractions des étapes (E2-4) étaient significativement plus faibles ( $p < 0,05$ ) que celles de l'étape E1. Toutes les fractions ont montré un certain degré de pouvoir chélatant, l'activité de l'extrait brut étant la plus élevée (75,23 %), la plus faible activité a été observée dans la fraction enzymatique pure (48,32 %). Les valeurs du pouvoir réducteur des extraits des étapes de purification varient entre 52,96 et 130,76 % d'équivalents trolox ( $\mu\text{mol} / \text{g MS}$ ). L'activité anti-radicalaire (radicaux hydroxyles) ne présente pas beaucoup de différence entre les étapes de purification, les valeurs varient entre 61,49 et 76,71 %.

Afin d'améliorer les conditions de conservation et la stabilité des propriétés catalytiques de la peroxydase, de nombreuses techniques d'immobilisation ont été développées. Dans ce contexte, nous nous sommes fixés comme objectif, l'optimisation de la synthèse et de la stabilité des microcapsules d'extrait enzymatique de navet à l'aide d'un polymère d'acide

polylactique (PLA) avec la technique de la double émulsion. Les concentrations d'agent tensioactif, de polymère et d'extrait enzymatique étaient les paramètres optimisés. Selon les résultats obtenus en utilisant la conception Box-Behnken, les paramètres optimaux trouvés étaient 1,55 % de PVA, 55 mg / mL d'extrait enzymatique et 30 mg / mL de polymère PLA avec une efficacité d'encapsulation de 57,29 %. La caractérisation morphologique SEM des microcapsules optimisées a montré une structure sphérique régulière. La spectroscopie FTIR a identifié les groupes fonctionnels spécifiques et les liaisons chimiques avant et après la microencapsulation.

L'étude de la libération des protéines *in vitro* a confirmé que les microcapsules ont une excellente libération prolongée dans la digestion gastrique simulée. Le stockage encapsulé d'extrait enzymatique à 4 et 25 °C présente une bonne activité POD résiduelle avec environ 60 % des activités initiales pendant 80 jours de stockage alors que l'enzyme libre perd son activité initiale en 15 et 30 jours.

Outre les antioxydant non enzymatiques (polyphénols), les résultats obtenus ont mis en évidence les caractéristiques et l'intérêt de la POD extraite du navet, notamment son pouvoir antioxydant. L'encapsulation en double émulsion est prometteuse dans la mesure où le procédé a permis la préservation de l'extrait et sa conservation. Ainsi, ces résultats nous ont ouvert la voie à de nombreuses perspectives en l'occurrence :

- Elargir l'étude sur d'autres variétés de navet ;
- Evaluer les activités biologiques de l'extrait du navet, tel que l'activité anti-inflammatoire, antiproliférative et anticancéreuse ;
- Tester d'autres polymères biodégradables et d'autres solvants non toxiques pour préparer les microcapsules dans le but d'augmenter le taux d'encapsulation et leur efficacité ;
- Optimiser d'autres conditions de préparation des microcapsules comme le temps, la vitesse agitation, etc. ;
- Etudier les activités antioxydantes et anticancéreuse *in vivo* des microcapsules d'extrait enzymatique, sur des modèles animaux ;
- Etudier l'effet de la digestion gastrointestinale *in vivo* sur l'activité enzymatique des peroxydases d'extrait du navet.

# **Références Bibliographiques**

- Abbasi, S., & Azari, S. (2011). Efficiency of novel iron microencapsulation techniques : Fortification of milk. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 1927-1933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02703.x>
- Abbasi, S., Rahimi, S., & Azizi, M. (2009). Influence of microwave-microencapsulated citric acid on some sensory properties of chewing gum. *Journal of Microencapsulation*, 26(1), 90-96. <https://doi.org/10.1080/02652040802173677>
- Aboul-Enein, Y., Bunaciu, A., & Fleschin, S. (2014). Evaluation of the Protein Secondary Structures Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Gazi University Journal of Science*, 27(1), 637-644.
- Acevedo-Rodríguez, P., & Strong, M. T. (2012). *Catalogue of Seed Plants of the West Indies*. <http://repository.si.edu/xmlui/handle/10088/17551>
- Adams, J. B. (1997). Regeneration and the kinetics of peroxidase inactivation. *Food Chemistry*, 60(2), 201-206. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00320-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00320-2)
- Aebischer, P., Wahlberg, L., Tresco, P. A., & Winn, S. R. (1991). Macroencapsulation of dopamine-secreting cells by coextrusion with an organic polymer solution. *Biomaterials*, 12(1), 50-56. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(91\)90132-t](https://doi.org/10.1016/0142-9612(91)90132-t)
- Aghelan, Z., & Shariat, S. Z. S. (2015). Partial purification and biochemical characterization of peroxidase from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves. *Advanced Biomedical Research*, 4, 159-159. PubMed. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.161586>
- Agostini, E., Hernández-Ruiz, J., Arnao, M. B., Milrad, S. R., Tigier, H. A., & Acosta, M. (2002). A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures : Inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 35(1), 1-7. <https://doi.org/10.1042/ba20010049>
- Ahn, J. H., Kim, Y. P., Lee, Y. M., Seo, E. M., Lee, K. W., & Kim, H. S. (2008). Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107(1), 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.067>
- Aires, A., Fernandes, C., Carvalho, R., Bennett, R. N., Saavedra, M. J., & Rosa, E. A. S. (2011). Seasonal Effects on Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Six Economically Important Brassica Vegetables. *Molecules*, 16(8), 6816-6832. <https://doi.org/10.3390/molecules16086816>
- Akyilmaz, E., Sezgintürk, M. K., & Dinçkaya, E. (2003). A biosensor based on urate oxidase–peroxidase coupled enzyme system for uric acid determination in urine. *Talanta*, 61(2), 73-79. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00239-X](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00239-X)
- Alfonso-Prieto, M., Biarnés, X., Vidossich, P., & Rovira, C. (2009). The molecular mechanism of the catalase reaction. *Journal of the American Chemical Society*. <https://doi.org/10.1021/ja9018572>
- Allala, F., Bouacem, K., Boucherba, N., Azzouz, Z., Mechri, S., Sahnoun, M., Benallaoua, S., Hacene, H., Jaouadi, B., & Bouanane-Darenfed, A. (2019). Purification, biochemical, and

molecular characterization of a novel extracellular thermostable and alkaline  $\alpha$ -amylase from *Tepidimonas fonticaldi* strain HB23. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 558-574. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.201>

Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2009). *Contribution of honey in nutrition and human health : A review*. <https://doi.org/10.1007/S12349-009-0051-6>

Amigo, L., & Hernández-Ledesma, B. (2020). Current Evidence on the Bioavailability of Food Bioactive Peptides. *Molecules*, 25(19), 4479. <https://doi.org/10.3390/molecules25194479>

Andrieux, K., Desmaële, D., D'Angelo, J., & Couvreur, P. (2003). Nanotechnologies et nouveaux médicaments. *Actualité Chimique*, 135-139.

Anjani, K., Kailasapathy, K., & Phillips, M. (2007). Microencapsulation of enzymes for potential application in acceleration of cheese ripening. *International Dairy Journal*, 17(1), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.005>

Arise, A. K., Alashi, A. M., Nwachukwu, I. D., Ijabadeniyi, O. A., Aluko, R. E., & Amonsou, E. O. (2016, mai 18). *Antioxidant activities of bambara groundnut (Vigna subterranea) protein hydrolysates and their membrane ultrafiltration fractions*. *Food & Function; Food Funct.* <https://doi.org/10.1039/c6fo00057f>

Armesto, J., Gomez-Limia, L., Carballo, J., & Martinez, S. (2019, mars). *Effects of different cooking methods on the antioxidant capacity and flavonoid, organic acid and mineral contents of Galega Kale (Brassica oleracea var. Acephala cv. Galega)*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition; Int J Food Sci Nutr.* <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1482530>

Arnnok, P., Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techawongstien, S., & Chanthai, S. (2010). Optimization and determination of polyphenol oxidase and peroxidase activities in hot pepper ( *Capsicum annuum L.*) pericarb. *International Food Research Journal*, 17, 385-392.

Augustin, M. A., & Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912. <https://doi.org/10.1039/b801739p>

Ayaz, F. A., Glew, R. H., Millson, M., Huang, H. S., Chuang, L. T., Sanz, C., & Hayırlıoglu-Ayaz, S. (2006). Nutrient contents of kale (*Brassica oleraceae L. var. Acephala DC.*). *Food Chemistry*, 96(4), 572-579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.011>

Bai, C., Peng, H., Xiong, H., Liu, Y., Zhao, L., & Xiao, X. (2011). Carboxymethylchitosan-coated proliposomes containing coix seed oil: Characterisation, stability and in vitro release evaluation. *Food Chemistry.* <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.033>

Baldrian, P., & Šnajdr, J. (2006). Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(5), 1023-1029. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.011>

Baliga, M. S., Baliga, B. R. V., Kandathil, S. M., Bhat, H. P., & Vayalil, P. K. (2011). A review of the chemistry and pharmacology of the date fruits (*Phoenix dactylifera L.*). *Food Research International*, 44(7), 1812-1822. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.07.004>

- Bangham, A. D., Standish, M. M., & Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-277. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)
- Barboza, F. M., Machado, W., Junior, L. R. O., Paula, J. P. de, Zawadzki, S. F., Fernandes, D., & Farago, P. (2014). PCL/PHBV Microparticles as Innovative Carriers for Oral Controlled Release of Manidipine Dihydrochloride. *TheScientificWorldJournal*. <https://doi.org/10.1155/2014/268107>
- Barenholz, Y. (2001). Liposome application : Problems and prospects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6(1), 66-77. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00090-X)
- Barth, A., & Zscherp, C. (2002). What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(4), 369-430. <https://doi.org/10.1017/s0033583502003815>
- Basha, S. A., & Prasada Rao, U. J. (2017). Purification and characterization of peroxidase from sprouted green gram (*Vigna radiata*) roots and removal of phenol and p-chlorophenol by immobilized peroxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(10), 3249-3260. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8173>
- Bekhit, A. E. D., Lingming, K., Mason, S. L., Zhou, J. H., & Sedcole, J. R. (2013). Upgrading the utilization of brassica wastes : Physicochemical properties and sensory evaluation of fermented brassica stalks. *International Food Research Journal*, 20(4), 1961-1969.
- Beltagy, A. (2014). Investigation of new antimicrobial and antioxidant activities of Brassica rapa L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6, 19-25.
- Beltagy, A. M. (2014). *INVESTIGATION OF NEW ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF BRASSICA RAPA L* Original Article. Undefined. </paper/INVESTIGATION-OF-NEW-ANTIMICROBIAL-AND-ANTIOXIDANT-Beltagy/3b25c64b0643f6ebbcd1dc59d49b5761a74eaa67>
- Benita, S., Hoffman, A., & Donbrow, M. (1985). Microencapsulation of paracetamol using polyacrylate resins (Eudragit Retard), kinetics of drug release and evaluation of kinetic model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37(6), 391-395. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1985.tb03021.x>
- Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., & Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, 417(6887), 463-468. <https://doi.org/10.1038/417463a>
- Bewtra, J. K., Biswas, N., Henderson, W. D., & Nicell, J. A. (1995). Recent Advances in Treatment of Selected Hazardous Wastes. *Water Quality Research Journal*, 30(1), 115-126. <https://doi.org/10.2166/wqrj.1995.016>
- Bhattacharai, N., Ramay, H. R., Gunn, J., Matsen, F. A., & Zhang, M. (2005). PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 103(3), 609-624. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.12.019>

- Bhatti, H. N., Najma, A., Asgher, M., Hanif, M. A., & Zia, M. A. (2006). Purification and thermal characterization of a novel peroxidase from a local chick pea cultivar. *Protein and Peptide Letters*, 13(8), 799-804. <https://doi.org/10.2174/092986606777841271>
- Bhunja, A., Durani, S., & Wangikar, P. P. (2001). Horseradish peroxidase catalyzed degradation of industrially important dyes. *Biotechnology and Bioengineering*, 72(5), 562-567. [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010305\)72:5<562::AID-BIT1020>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010305)72:5<562::AID-BIT1020>3.0.CO;2-S)
- Bidchol, A. M., Wilfred, A., Abhijna, P., & Harish, R. (2011). Free Radical Scavenging Activity of Aqueous and Ethanolic Extract of Brassica oleracea L. var. Italica. *Food and Bioprocess Technology*, 4(7), 1137-1143. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0196-9>
- Bingham, G., Gunning, R., Gorman, K., Field, L., & Moores, G. (2007). Temporal synergism by microencapsulation of piperonyl butoxide and  $\alpha$ -cypermethrin overcomes insecticide resistance in crop pests. *Pest management science*, 63, 276-281. <https://doi.org/10.1002/ps.1336>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, 91 Spec No, 179-194. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf118>
- Boivin, D., Lamy, S., Lord-Dufour, S., Jackson, J., Beaulieu, E., Côté, M., Moghrabi, A., Barrette, S., Gingras, D., & Béliveau, R. (2009). Antiproliferative and antioxidant activities of common vegetables: A comparative study. *Food Chemistry*, 112(2), 374-380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.084>
- Bouacem, K., Rekik, H., Jaouadi, N. Z., Zenati, B., Kourdali, S., El Hattab, M., Badis, A., Annane, R., Bejar, S., Hacene, H., Bouanane-Darenfed, A., & Jaouadi, B. (2018). Purification and characterization of two novel peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta* strain CX-9. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 636-646. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.061>
- Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., & El Ferjani, E. (2008). Effect of copper excess on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and peroxidase activities in bean roots. *Acta Biologica Hungarica*, 59(2), 233-245. <https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.2.9>
- Bouzerzour, K., Morgan, F., Cuinet, I., Bonhomme, C., Jardin, J., Huërou-Luron, I. L., & Dupont, D. (2012). In vivo digestion of infant formula in piglets: Protein digestion kinetics and release of bioactive peptides. *British Journal of Nutrition*, 108(12), 2105-2114. <https://doi.org/10.1017/S000711451200027X>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Budhian, A., Siegel, S., & Winey, K. (2005). Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. *Journal of microencapsulation*, 22, 773-785. <https://doi.org/10.1080/02652040500273753>
- Butler, S. M., Tracy, M. A., & Tilton, R. D. (1999). Adsorption of serum albumin to thin films of poly(lactide-co-glycolide). *Journal of Controlled Release*, 58(3), 335-347. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(98\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(98)00173-4)
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.-G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.-L., & Sauvaigo, S. (2002). Recent aspects of oxidative DNA damage : Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biological Chemistry*, 383(6), 933-943. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.100>
- Cai, F., OuYang, C., Duan, P., Gao, S., Xu, Y., & Chen, F. (2012). Purification and characterization of a novel thermal stable peroxidase from *Jatropha curcas* leaves. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 77, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.12.002>
- Calderó, G., García-Celma, M. J., & Solans, C. (2011). Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353(2), 406-411. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.09.073>
- Cao, H., Pauff, J. M., & Hille, R. (2010). Substrate orientation and catalytic specificity in the action of xanthine oxidase : The sequential hydroxylation of hypoxanthine to uric acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 28044-28053. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.128561>
- Caramyshev, A. V., Firsova, Y. N., Slastya, E. A., Tagaev, A. A., Potapenko, N. V., Lobakova, E. S., Pletjushkina, O. Y., & Sakharov, I. Y. (2006). Purification and characterization of windmill palm tree (*Trachycarpus fortunei*) peroxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9888-9894. <https://doi.org/10.1021/jf0615193>
- Cardinali, A., Tursi, N., Ligorio, A., Giuffrida, M. G., Napolitano, L., Caliandro, R., Sergio, L., Di Venere, D., Lattanzio, V., & Sonnante, G. (2011). Purification, biochemical characterization and cloning of a new cationic peroxidase isoenzyme from artichoke. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 49(4), 395-403. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.028>
- Carrier, J., Aghdassi, E., Platt, I., Cullen, J., & Allard, J. P. (2001). Effect of oral iron supplementation on oxidative stress and colonic inflammation in rats with induced colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15(12), 1989-1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2001.01113.x>
- Carrière, A., Galinier, A., Fernandez, Y., Carmona, M.-C., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2006). Les espèces actives de l'oxygène : Le yin et le yang de la mitochondrie. *médecine/sciences*, 22(1), 47-53. <https://doi.org/10.1051/medsci/200622147>
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2010). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 16(1), 251-280. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>

- Casero, E., Darder, M., Pariente, F., & Lorenzo, E. (2000). Peroxidase enzyme electrodes as nitric oxide biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 403(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00555-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00555-3)
- Chiou, A. H.-J., Cheng, H.-C., & Wang, D.-P. (2006). Micronization and microencapsulation of felodipine by supercritical carbon dioxide. *Journal of Microencapsulation*, 23(3), 265-276. <https://doi.org/10.1080/02652040500435071>
- Chivukula, M., Spadaro, J. T., & Renganathan, V. (1995). Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation of Sulfonated Azo Dyes Generates Novel Sulfophenyl Hydroperoxides. *Biochemistry*, 34(23), 7765-7772. <https://doi.org/10.1021/bi00023a024>
- Chung, N., & Aust, S. D. (1995). Veratryl alcohol-mediated indirect oxidation of pentachlorophenol by lignin peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 322(1), 143-148. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1446>
- Cie, V.-A. et. (1883). *Les Plantes potagères : Description et culture des principaux légumes des climats tempérés*. Vilmorin-Andrieux.
- Clarke, J. R., Marquardt, R. R., Oosterveld, A., Frohlich, A. A., Madrid, F. J., & Dawood, M. (1993). Development of a quantitative and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for ochratoxin A using antibodies from the yolk of the laying hen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(10), 1784-1789. <https://doi.org/10.1021/jf00034a050>
- Conesa, A., Punt, P. J., & van den Hondel, C. A. M. J. J. (2002). Fungal peroxidases : Molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*, 93(2), 143-158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00394-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00394-7)
- Corrêa-Filho, L. C., Lourenço, M. M., Moldão-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Microencapsulation of  $\beta$ -Carotene by Spray Drying : Effect of Wall Material Concentration and Drying Inlet Temperature. *International Journal of Food Science*, 2019, 8914852. <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>
- Csire, G., Canabady-Rochelle, L., Averlant-Petit, M.-C., Selmeczi, K., & Stefan, L. (2020). Both metal-chelating and free radical-scavenging synthetic pentapeptides as efficient inhibitors of reactive oxygen species generation. *Metallomics*, 12(8), 1220-1229. <https://doi.org/10.1039/D0MT00103A>
- Cullen, D. (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology*, 53(2-3), 273-289. [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(97\)01684-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(97)01684-2)
- Curey, T. E., Salazar, M. A., Oliveira, P., Javier, J., Dennis, P. J., Rao, P., & Shear, J. B. (2002). Enzyme-Based Sensor Arrays for Rapid Characterization of Complex Disaccharide Solutions. *Analytical Biochemistry*, 303(1), 42-48. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5551>
- Daas Amiour, S., Hambaba, L., & TEBBANE, Z. (2016). Effect of pH, temperature and some chemicals on polyphenoloxidase and peroxidase activities in harvested Deglet Nour and Ghars dates. *Postharvest Biology and Technology*, 111. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.07.027>

- Dahmoune, F., Boulekbache, L., Moussi, K., Aoun, O., Spigno, G., & Madani, K. (2013). Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction. *Industrial Crops and Products*, 50, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.013>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dalal, S., & Gupta, M. N. (2010). Purification and characterization of a peroxidase isozyme from Indian turnip roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5545-5552. <https://doi.org/10.1021/jf904431t>
- Damgé, C., Vranckx, H., Balschmidt, P., & Couvreur, P. (1997). Poly(alkyl cyanoacrylate) Nanospheres for Oral Administration of Insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86(12), 1403-1409. <https://doi.org/10.1021/js970124i>
- Danial, E. N., & Alkhalaf, M. I. (2020). Co-immobilisation of superoxide dismutase and catalase using an in vitro encapsulation protocol. *Journal of King Saud University - Science*, 32(4), 2489-2494. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.04.003>
- Dardelle, G., Normand, V., Steenhoudt, M., Bouquerand, P.-E., Chevalier, M., & Baumgartner, P. (2007). Flavour-encapsulation and flavour-release performances of a commercial yeast-based delivery system. *Food Hydrocolloids*, 21(5), 953-960. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.12.013>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization : An overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Davda, J., & Labhasetwar, V. (2002). Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 233(1), 51-59. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00923-1](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00923-1)
- De Avellar, I. G. J., Magalhães, M. M. M., Silva, A. B., Souza, L. L., Leitão, A. C., & Hermes-Lima, M. (2004). Reevaluating the role of 1,10-phenanthroline in oxidative reactions involving ferrous ions and DNA damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1675(1), 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.08.006>
- De Moffarts, B., Kirschvink, N., Pincemail, J., & Lekeux, P. (2005). Impact physiologique et pathologique du stress oxydant chez le cheval. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 149(1). <https://orbi.uliege.be/handle/2268/6737>
- De Pascale, S., Maggio, A., Pernice, R., Fogliano, V., & Barbieri, G. (2007). Sulphur fertilization may improve the nutritional value of Brassica rapa L. subsp. Sylvestris. *European Journal of Agronomy*, 26(4), 418-424. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.12.009>
- Delannoy, É., Marmey, P., Penel, C., & Nicole, M. (2004). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Botanica Gallica*, 151(4), 353-380. <https://doi.org/10.1080/12538078.2004.10515440>

- Diao, M., Kone, O., Ouédraogo, N., Bayili, G., Bassolé, I., & Dicko, M. (2011). Comparison of peroxidase activities from *Allium sativum*, *Ipomoea batatas*, *Raphanus sativus* and *Sorghum bicolor* grown in Burkina Faso. *African Journal of Biochemistry Research*, 5, 124-128.
- Dicko, M., Gruppen, H., Hilhorst, R., Voragen, A., & Berkel, W. (2006). Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase. *The FEBS journal*, 273, 2293-2307. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05243.x>
- Dixon, G. R. (2006). Origins and diversity of Brassica and its relatives. *Vegetable Brassicas and Related Crucifers*, 1-33.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Donato, L. J., & Noy, N. (2005). Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid : Proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Research*, 65(18), 8193-8199. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1177>
- Dröge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological reviews*, 82, 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Duarte-Vázquez, M. A., García-Almendárez, B., Regalado, C., & Whitaker, J. R. (2000). Purification and partial characterization of three turnip (*Brassic napus* L. var. *Esculenta* D.C.) peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1574-1579. <https://doi.org/10.1021/jf990454j>
- Dubey, R., Shami, T. C., & Rao, K. U. (2009). Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal*, 59, 82-95. <https://doi.org/10.14429/dsj.59.1489>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Dunford, H. B. (1999). *Heme Peroxidases* (1st edition). Wiley-VCH.
- Eker, B., Zagorevski, D., Zhu, G., Linhardt, R. J., & Dordick, J. S. (2009). Enzymatic polymerization of phenols in room-temperature ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1), 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.02.018>
- El Mansouri, I., Mansouri, I. E., Mercado, J. A., Santiago-Domenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V., & Quesada, M. A. (s. d.). Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum*, 106(4), 355-362.
- El-Agamey, A., Lowe, G. M., McGarvey, D. J., Mortensen, A., Phillip, D. M., Truscott, T. G., & Young, A. J. (2004). Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.03.007>

- El-Zawahry, M. M., El-Shami, S., & El-Mallah, M. H. (2007). Optimizing a wool dyeing process with reactive dye by liposome microencapsulation. *Dyes and Pigments*, 74(3), 684-691. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2006.04.014>
- Enachi, E., Grigore-Gurgu, L., Aprodu, I., Stănciuc, N., Dalmadi, I., Bahrim, G., Râpeanu, G., & Croitoru, C. (2018). Extraction, purification and processing stability of peroxidase from plums (*Prunus domestica*). *International Journal of Food Properties*, 21(1), 2744-2757. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1560311>
- Espelie, K. E., Franceschi, V. R., & Kolattukudy, P. E. (1986). Immunocytochemical Localization and Time Course of Appearance of an Anionic Peroxidase Associated with Suberization in Wound-Healing Potato Tuber Tissue. *Plant Physiology*, 81(2), 487-492. <https://doi.org/10.1104/pp.81.2.487>
- Estevinho, B. N., Damas, A. M., Martins, P., & Rocha, F. (2014). Microencapsulation of  $\beta$ -galactosidase with different biopolymers by a spray-drying process. *Food Research International*, 64, 134-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.057>
- Evans, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 647S-652S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.647S>
- Faguy, D. M., & Doolittle, W. F. (2000). Horizontal transfer of catalase-peroxidase genes between Archaea and pathogenic bacteria. *Trends in Genetics*, 16(5), 196-197. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02007-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02007-2)
- Fang, L., Jiang, B., & Zhang, T. (2008). Effect of combined high pressure and thermal treatment on kiwifruit peroxidase. *Food Chemistry*, 109(4), 802-807. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.01.017>
- Favier, A. (2003). Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité Chimique*, 108-115.
- Feczko, T., Tóth, J., Dósa, G., & Gyenis, J. (2011). Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(8), 757-765. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2011.06.008>
- Ferguson, J. L. (1964). Liquid crystals. *Scientific American*, 211(2), 76-85. JSTOR.
- Filizola, M., & Loew, G. H. (2000). Role of Protein Environment in Horseradish Peroxidase Compound I Formation : Molecular Dynamics Simulations of Horseradish Peroxidase-HOOH Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 122(1), 18-25. <https://doi.org/10.1021/ja992793z>
- Finch, C. A., & Bodmeier, R. (2000). Microencapsulation. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. American Cancer Society. [https://doi.org/10.1002/14356007.a16\\_575](https://doi.org/10.1002/14356007.a16_575)
- Folkes, L. K., Greco, O., Dachs, G. U., Stratford, M. R. L., & Wardman, P. (2002). 5-Fluoroindole-3-acetic acid : A prodrug activated by a peroxidase with potential for use in targeted cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, 63(2), 265-272. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00868-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00868-1)

- Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T., & Poulos, T. L. (1997). Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature Structural Biology*, 4(12), 1032-1038. <https://doi.org/10.1038/nsb1297-1032>
- Gan, C.-Y., Cheng, L.-H., & Easa, A. M. (2008). Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(4), 563-569. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.04.004>
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(12), 8813-8826. <https://doi.org/10.3390/molecules15128813>
- Gaskell, E. E., Hobbs, G., Rostron, C., & Hutcheon, G. A. (2008). Encapsulation and release of  $\alpha$ -chymotrypsin from poly(glycerol adipate-co- $\omega$ -pentadecalactone) microparticles. *Journal of Microencapsulation*, 25(3), 187-195. <https://doi.org/10.1080/02652040701848775>
- Gasper, M. M., Blanco, D., Cruz, M. E., & Alonso, M. J. (1998). Formulation of L-asparaginase-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles : Influence of polymer properties on enzyme loading, activity and in vitro release. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 52(1-2), 53-62. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(97\)00196-x](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(97)00196-x)
- Gazaryan, I. G., Lagrimini, L. M., Ashby, G. A., & Thorneley, R. N. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases : Anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *The Biochemical Journal*, 313 ( Pt 3), 841-847. <https://doi.org/10.1042/bj3130841>
- Ge, X., Wan, Z., Song, N., Fan, A., & Wu, R. (2009). Efficient methods for the extraction and microencapsulation of red pigments from a hybrid rose. *Journal of Food Engineering*, 94(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.02.021>
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370-1373. <https://doi.org/10.1021/jf048396b>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Beney, L., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2012). Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes : Roles of interfacial interactions and water. *Food Chemistry*, 132(4), 1713-1720. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.028>
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients : An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>
- Ghedira, K. (2005). Les flavonoïdes : Structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*. <https://doi.org/10.1007/s10298-005-0096-8>
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry : A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50(3), 213-224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>

- Given, P. S. (2009). Encapsulation of Flavors in Emulsions for Beverages. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(1), 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.007>
- Glenn, J. K., Akileswaran, L., & Gold, M. H. (1986). Mn(II) oxidation is the principal function of the extracellular Mn-peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 251(2), 688-696. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90378-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90378-4)
- Goleniowski, M., Cusido, R., & Palazon, J. (2013). Phenolic Acids. In *Natural Products : Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (p. 1951-1973). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_64](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_64)
- Gong, Z., Li, D., Liu, C., Cheng, A., & Wang, W. (2015). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from chestnut kernel. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2, Part 2), 1095-1099. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.10.012>
- Graças, J. P., Ranocha, P., Vitorello, V. A., Savelli, B., Jamet, E., Dunand, C., & Burlat, V. (2020). The Class III Peroxidase Encoding Gene AtPrx62 Positively and Spatiotemporally Regulates the Low pH-Induced Cell Death in *Arabidopsis thaliana* Roots. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7191. <https://doi.org/10.3390/ijms21197191>
- Gross, R., Kumar, and, & Kalra, B. (2001). Polymer Synthesis by In Vitro Enzyme Catalysis. *Chemical reviews*, 101, 2097-2124. <https://doi.org/10.1021/cr0002590>
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591-600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- Gülçin, I., & Yildirim, A. (2005). Purification and characterization of peroxidase from *Brassica oleracea* var. *Acephala*. *Asian Journal of Chemistry*, 17, 2175-2183.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kıręcçı, E., & Küfrevioğlu, Ö. İ. (2003). Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83(3), 371-382. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00098-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00098-0)
- Gunathilake, K. D. P. P., Ranaweera, K. K. D. S., & Rupasinghe, H. P. V. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of selected edible green leaves. *Food Chemistry*, 245, 371-379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.096>
- Guo, Y., Chen, S., Li, Z., & Cowling, W. (2014). Center of Origin and Centers of Diversity in an Ancient Crop, *Brassica rapa* (Turnip Rape). *Journal of Heredity*, 105, 555-565. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu021>
- Hammerschmidt, R., & Kuć, J. (1982). Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological Plant Pathology*, 20(1), 61-71. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(82\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0048-4059(82)90024-8)
- Han, P., Zhou, X., & You, C. (2020). Efficient Multi-Enzymes Immobilized on Porous Microspheres for Producing Inositol From Starch. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00380>

- Hanif, R., Iqbal, Z., Iqbal, M., Hanif, S., & Rasheed, M. (2006). USE OF VEGETABLES AS NUTRITIONAL FOOD: ROLE IN HUMAN HEALTH. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1(1), 18-22.
- Haschke, R. H., & Friedhoff, J. M. (1978). Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 80(4), 1039-1042. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(78\)91350-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(78)91350-5)
- Hassan, B. (2019). Plants and Cancer Treatment. *Medicinal Plants - Use in Prevention and Treatment of Diseases*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90568>
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M. G., Vincieri, F. F., & Romani, A. (2006). Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties. *Food Chemistry*, 99(3), 464-469. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.057>
- Herr, I., & Büchler, M. W. (2010). Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: Implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 36(5), 377-383. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2010.01.002>
- Hildebrand, G. E., & Tack, J. W. (2000). Microencapsulation of peptides and proteins. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2), 173-176. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00415-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00415-9)
- Hinneburg, I., Damien Dorman, H. J., & Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97(1), 122-129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.028>
- Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhashi, I., Matsui, H., Honma, M., & Ohashi, Y. (2000). An HR-Induced Tobacco Peroxidase Gene Is Responsive to Spermine, but Not to Salicylate, Methyl Jasmonate, and Ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 13(2), 210-216. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.210>
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5), 462-468. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>
- Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T., & Ohashi, Y. (2000). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Letters*, 471(2), 245-250. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01409-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01409-5)
- Hirech, K., Payan, S., Carnelle, G., Brujes, L., & Legrand, J. (2003). Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerisation. *Powder Technology*, 130(1), 324-330. [https://doi.org/10.1016/S0032-5910\(02\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S0032-5910(02)00211-5)
- Honiger, J., Sarkis, R., Baudrimont, M., Delelo, R., Chafai, N., Benoist, S., Sarkis, K., Ballardur, P., Capeau, J., & Nordlinger, B. (2000). Semiautomatic macroencapsulation of large numbers of porcine hepatocytes by coextrusion with a solution of AN69 polymer. *Biomaterials*, 21(12), 1269-1274. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00012-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00012-0)
- Horst, M. A., Ong, T. P., Jordão Jr., A. A., Vannucchi, H., Moreno, F. S., & Lajolo, F. M. (2010). Water extracts of cabbage and kale inhibit ex vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA damage but not rat

- hepatocarcinogenesis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(3), 242-248. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2009007500038>
- Howes, B. D., Feis, A., Raimondi, L., Indiani, C., & Smulevich, G. (2001). The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 40704-40711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107489200>
- Huang, H.-Y., Appel, L. J., Croft, K. D., Miller, E. R., Mori, T. A., & Puddey, I. B. (2002). Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation : Results of a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(3), 549-555. <https://doi.org/10.1093/ajcn/76.3.549>
- Huang, Y.-I., Cheng, Y.-H., Yu, C.-C., Tsai, T.-R., & Cham, T.-M. (2007). Microencapsulation of extract containing shikonin using gelatin-acacia coacervation method : A formaldehyde-free approach. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 58, 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.04.013>
- Husain, Q. (2006). Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water : A Review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26(4), 201-221. <https://doi.org/10.1080/07388550600969936>
- Hüttermann, A., Mai, C., & Kharazipour, A. (2001). Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4), 387-394. <https://doi.org/10.1007/s002530000590>
- Ignatov, A., Artem'eva, A., & Hida, K. (2008). Origin and Expansion of Cultivated Brassica rapa in Eurasia : Linguistic Facts. *V International Symposium on Brassicas and XVI International Crucifer Genetics Workshop, Brassica 2008* 867, 867, 81-88. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2010.867.9>
- Imabayashi, S., Kong, Y.-T., & Watanabe, M. (2001). Amperometric Biosensor for Polyphenol Based on Horseradish Peroxidase Immobilized on Gold Electrodes. *Electroanalysis*, 13(5), 408-412. [https://doi.org/10.1002/1521-4109\(200104\)13:5<408::AID-ELAN408>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1521-4109(200104)13:5<408::AID-ELAN408>3.0.CO;2-2)
- Ishige, F., Mori, H., Yamazaki, K., & Imaseki, H. (1993). Identification of a Basic Glycoprotein Induced by Ethylene in Primary Leaves of Azuki Bean as a Cationic Peroxidase. *Plant Physiology*, 101(1), 193-199. <https://doi.org/10.1104/pp.101.1.193>
- Jahangir, M., Kim, H., Choi, Y., & Verpoorte, R. (2009). Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 31-43. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2008.00065.x>
- Jahangoshaei, P., Hassani, L., Mohammadi, F., Hamidi, A., & Mohammadi, K. (2015). Investigating the effect of gallium curcumin and gallium diacetylcurcumin complexes on the structure, function and oxidative stability of the peroxidase enzyme and their anticancer and antibacterial activities. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 20(7), 1135-1146. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1295-x>

- Jan, S., Shinwari, Z., Malik, M., & Ilyas, M. (2018). MOJ Biology and Medicine Antioxidant and anticancer activities of Brassica rapa : A review 176. *MOJ Biology and Medicine*, 3, 175-178. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2018.03.00094>
- Jansen, M. A. K., van den Noort, R. E., Tan, M. Y. A., Prinsen, E., Lagrimini, L. M., & Thorneley, R. N. F. (2001). Phenol-Oxidizing Peroxidases Contribute to the Protection of Plants from Ultraviolet Radiation Stress. *Plant Physiology*, 126(3), 1012-1023.
- Jaouadi, B., Rekik, H., Badis, A., Jaouadi, N. Z., Belhoul, M., Hmidi, M., Kourdali, S., Fodil, D., & Bejar, S. (2014). Production, purification, and characterization of a highly thermostable and humic acid biodegrading peroxidase from a decolorizing *Streptomyces albidoflavus* strain TN644 isolated from a Tunisian off-shore oil field. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 90, 36-44. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.02.001>
- Jia, J., Wang, B., Wu, A., Cheng, G., Li, Z., & Dong, S. (2002). A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor : Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol-Gel Network. *Analytical chemistry*, 74, 2217-2223. <https://doi.org/10.1021/ac011116w>
- Jiang, G., Woo, B. H., Kang, F., Singh, J., & DeLuca, P. P. (2002). Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *Journal of Controlled Release*, 79(1), 137-145. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00533-8](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00533-8)
- John, P. (2009). Thomas S. C. Li Vegetables and Fruits : Nutritional and Therapeutic Values Boca Raton, FL. *British Journal of Nutrition - BRIT J NUTR*, 101. <https://doi.org/10.1017/S0007114509220861>
- Jokić, S., Velić, D., Bilić, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., & Tomas, S. (2010). Modelling of solid-liquid extraction process of total polyphenols from soybeans. *Czech Journal of Food Sciences*, 28 (2010)(No. 3), 206-212. <https://doi.org/10.17221/200/2009-CJFS>
- Judde, A. (2004). *Prévention de l'oxydation des acides gras dans un produit cosmétique : Mécanismes, conséquences, moyens de mesure, quels antioxydants pour quelles applications ?* <https://doi.org/10.1051/OCL.2004.0414>
- Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3(2), 39-48.
- Kalin, R., Atasever, A., & Özdemir, H. (2014). Single-step purification of peroxidase by 4-aminobenzohydrazide from Turkish blackradish and Turnip roots. *Food Chemistry*, 150, 335-340. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.125>
- Kang, F., Jiang, G., Hinderliter, A., DeLuca, P. P., & Singh, J. (2002). Lysozyme stability in primary emulsion for PLGA microsphere preparation : Effect of recovery methods and stabilizing excipients. *Pharmaceutical Research*, 19(5), 629-633. <https://doi.org/10.1023/a:1015354028908>
- Kapuśniak, J., & Tomasik, P. (2006). Lipid microencapsulation in starch. *Journal of Microencapsulation*, 23(3), 341-348. <https://doi.org/10.1080/02652040600687571>

- Kapusta-Duch, J., Kopec, A., Piatkowska, E., Borczak, B., & Leszczynska, T. (2012). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 63(4). <http://agro.icm.edu.pl/agro/element/bwmeta1.element.agro-3f2915f5-e4b9-46de-bd6f-2cd454c08036>
- Karam, J., & Nicell, J. A. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 69(2), 141-153. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4660\(199706\)69:2<141::AID-JCTB694>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4660(199706)69:2<141::AID-JCTB694>3.0.CO;2-U)
- Kawaoka, A., Kawamoto, T., Ohta, H., Sekine, M., Takano, M., & Shinmyo, A. (1994). Wound-induced expression of horseradish peroxidase. *Plant Cell Reports*, 13(3), 149-154. <https://doi.org/10.1007/BF00239882>
- Kawatsu, K., Hamano, Y., Sugiyama, A., Hashizume, K., & Noguchi, T. (2002). Development and Application of an Enzyme Immunoassay Based on a Monoclonal Antibody against Gonyautoxin Components of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1304-1308. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1304>
- Khan, M. N., AlZuaibr, F. M., Al-Huqail, A. A., Siddiqui, M. H., M. Ali, H., Al-Muwayhi, M. A., & Al-Haque, H. N. (2018). Hydrogen Sulfide-Mediated Activation of O-Acetylserine (Thiol) Lyase and l/d-Cysteine Desulphydrase Enhance Dehydration Tolerance in *Eruca sativa* Mill. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijms19123981>
- Khindaria, A., Yamazaki, I., & Aust, S. D. (1996). Stabilization of the Veratryl Alcohol Cation Radical by Lignin Peroxidase. *Biochemistry*, 35(20), 6418-6424. <https://doi.org/10.1021/bi9601666>
- Kiefer, M., Schmickl, R., German, D. A., Mandáková, T., Lysak, M. A., Al-Shehbaz, I. A., Franzke, A., Mummenhoff, K., Stamatakis, A., & Koch, M. A. (2014). BrassiBase : Introduction to a Novel Knowledge Database on Brassicaceae Evolution. *Plant and Cell Physiology*, 55(1), e3-e3. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct158>
- Kim, D.-O., Jeong, S., & Lee, C. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, 81, 321-326. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00423-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00423-5)
- Kim, M. K., & Park, J. H. Y. (2009). Cruciferous vegetable intake and the risk of human cancer : Epidemiological evidence: Conference on 'Multidisciplinary approaches to nutritional problems' Symposium on 'Nutrition and health'. *Proceedings of the Nutrition Society*, 68(1), 103-110. <https://doi.org/10.1017/S0029665108008884>
- Kjalke, M., Andersen, M. B., Schneider, P., Christensen, B., Schülein, M., & Welinder, K. G. (1992). Comparison of structure and activities of peroxidases from *Coprinus cinereus*, *Coprinus macrorrhizus* and *Arthromyces ramosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1120(3), 248-256. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90244-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90244-8)
- Koch, M., German, D., Kiefer, M., & Franzke, A. (2018). Database Taxonomics as Key to Modern Plant Biology. *Trends in Plant Science*, 23, 4-6. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.10.005>

- Koch, M., Kiefer, M., German, D., Al-Shehbaz, I., Franzke, A., Mummenhoff, K., & Schmickl, R. (2012). BrassiBase: Tools and biological resources to study characters and traits in the Brassicaceae—version 1.1. *Taxon*, *61*, 1001-1009. <https://doi.org/10.1002/tax.615007>
- Koffi, E., Sea, T., Dodehe, Y., & Soro, S. (2010). Effect of solvent type on extraction of polyphenols from twenty three Ivorian plants. *Journal of Animal and Plant Sciences (JAPS)*, *5*(3), 550-558.
- Köksal, E., & Gülçin, I. (2008). Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis*) buds. *Protein and Peptide Letters*, *15*(4), 320-326. <https://doi.org/10.2174/092986608784246506>
- Kong, J., & Yu, S. (2007). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *39*(8), 549-559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Kotamraju, S., Nair, K., Subramanian, R., & Singotamu, L. (2001). Singotamu L Oral repletion of iron induces free radical mediated alterations in the gastrointestinal tract of rat. *Molecular and cellular biochemistry*, *219*, 91-98. <https://doi.org/10.1023/A:1011023111048>
- Krishnamachari, Y., Madan, P., & Lin, S. (2007). Development of pH- and time-dependent oral microparticles to optimize budesonide delivery to ileum and colon. *International Journal of Pharmaceutics*, *338*(1-2), 238-247. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.015>
- Krishnamurthy, P., & Wadhvani, A. (2012). Antioxidant Enzymes and Human Health. *Antioxidant Enzyme*. <https://doi.org/10.5772/48109>
- Krishnan, S., Bhosale, R., & Singhal, R. S. (2005). Microencapsulation of cardamom oleoresin : Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. *Carbohydrate Polymers*, *61*(1), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.02.020>
- Kröber, H., & Teipel, U. (2005). Microencapsulation of particles using supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, *44*(2), 215-219. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2004.02.014>
- Kuang, S. S., Oliveira, J. C., & Crean, A. M. (2010). Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *50*(10), 951-968. <https://doi.org/10.1080/10408390903044222>
- Kunishima, N., Fukuyama, K., Matsubara, H., Hatanaka, H., Shibano, Y., & Amachi, T. (1994). Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases. *Journal of molecular biology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80037-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80037-3)
- Kwon, Y. M., Baudys, M., Knutson, K., & Kim, S. W. (2001). In situ study of insulin aggregation induced by water-organic solvent interface. *Pharmaceutical Research*, *18*(12), 1754-1759. <https://doi.org/10.1023/a:1013334916162>
- Ladoh Yemeda, C. F., SD, D., Nyegue, M., RP, D., Lenta, B., E, M., J., Y., & Wansi, J. (2014). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis* Antioxidant activity of methanolic extract of *Phragmanthera*

- capitata (Loranthaceae) from *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84, 7636-7643. <https://doi.org/10.4314/jab.v84i1.9>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagrimini, L. M., & Rothstein, S. (1987). Tissue Specificity of Tobacco Peroxidase Isozymes and Their Induction by Wounding and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiology*, 84(2), 438-442. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.438>
- Larkindale, J., & Huang, B. (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology*, 161(4), 405-413. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01239>
- Lavery, C. B., MacInnis, M. C., MacDonald, M. J., Williams, J. B., Spencer, C. A., Burke, A. A., Irwin, D. J. G., & D’Cunha, G. B. (2010). Purification of Peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8471-8476. <https://doi.org/10.1021/jf100786h>
- Lazko, J., Popineau, Y., Renard, D., & Legrand, J. (2004). Microcapsules based on glycinin–sodium dodecyl sulfate complex coacervation. *Journal of Microencapsulation*, 21(1), 59-70. <https://doi.org/10.1080/02652040310001619785>
- Legrand, P., Benoit, J.-P., Briançon, S., Fattal, E., Fessi, H., & Passirani, C. (2007). *Sphéroïdes et formes vectorisées*. 221-250.
- Ley, S. V., Ramarao, C., Lee, A.-L., Østergaard, N., Smith, S. C., & Shirley, I. M. (2003). Microencapsulation of Osmium Tetroxide in Polyurea. *Organic Letters*, 5(2), 185-187. <https://doi.org/10.1021/ol020225+>
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation : State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1), 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>
- Li, X., Min, S., Zhao, X., Lu, Z., & Jin, A. (2014). Optimization of entrapping conditions to improve the release of BMP-2 from PELA carriers by response surface methodology. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 10(1), 015002. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015002>
- Liang, Y., Li, Y., Zhang, L., & Liu, X. (2019). Phytochemicals and antioxidant activity in four varieties of head cabbages commonly consumed in China. *Food Production, Processing and Nutrition*, 1(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s43014-019-0003-6>
- Lin, Y.-H., Mi, F.-L., Chen, C.-T., Chang, W.-C., Peng, S.-F., Liang, H.-F., & Sung, H.-W. (2007). Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules*, 8(1), 146-152. <https://doi.org/10.1021/bm0607776>
- Linossier, M. G. (1898). Contribution à l’étude des ferments oxydants sur la peroxydase du pus. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 50, 373-375.

- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G., & Zhang, W. (2016). A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>
- Liu, X., Gao, Y., Xu, H., Hao, Q., Liu, G., & Wang, Q. (2010). Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with continuous high pressure carbon dioxide. *Food Chemistry*, 119(1), 108-113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.002>
- Liu, Y., Wang, Z., Li, H., Liang, M., & Yang, L. (2016). In vitro antioxidant activity of rice protein affected by alkaline degree and gastrointestinal protease digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(15), 4940-4950. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7877>
- Lo Scalzo, R., Bianchi, G., Genna, A., & Summa, C. (2007). Antioxidant properties and lipidic profile as quality indexes of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. Botrytis) in relation to harvest time. *Food Chemistry*, 100(3), 1019-1025. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.054>
- Łobarzewski, J., Brzyska, M., Wójcik, A., & Kolarz, B. (1990). The influence of metal ions on the soluble and immobilized cytoplasmic cabbage peroxidase activity and its kinetics. *Journal of Molecular Catalysis*, 59(3), 373-383. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(90\)85109-U](https://doi.org/10.1016/0304-5102(90)85109-U)
- Loksuwan, J. (2007). Characteristics of microencapsulated  $\beta$ -carotene formed by spray drying with modified tapioca starch, native tapioca starch and maltodextrin. *Food Hydrocolloids*, 21(5), 928-935. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2006.10.011>
- Longo, G. S., & Szleifer, I. (2016). Adsorption and protonation of peptides and proteins in pH responsive gels. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49(32), 323001. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/32/323001>
- Lou, P., Zhao, J., Kim, J. S., Shen, S., Del Carpio, D. P., Song, X., Jin, M., Vreugdenhil, D., Wang, X., Koornneef, M., & Bonnema, G. (2007). Quantitative trait loci for flowering time and morphological traits in multiple populations of *Brassica rapa*. *Journal of Experimental Botany*, 58(14), 4005-4016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm255>
- Lovrekovich, L., Lovrekovich, H., & Stahmann, M. A. (1968). Tobacco mosaic virus-induced resistance to *Pseudomonas tabaci* in tobacco. *Phytopathology*, 58(7), 1034-1035.
- Lubos, E., Handy, D., & Loscalzo, J. (2008). Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. <https://doi.org/10.2741/3084>
- Lucke, A., Kiermaier, J., & Göpferich, A. (2002). Peptide acylation by poly(alpha-hydroxy esters). *Pharmaceutical Research*, 19(2), 175-181. <https://doi.org/10.1023/a:1014272816454>
- Lueangjaroenkit, P., Kunitake, E., Sakka, M., Kimura, T., Teerapatsakul, C., Sakka, K., & Chitradon, L. (2020). Light Regulation of Two New Manganese Peroxidase-Encoding Genes in *Trametes polyzona* KU-RNW027. *Microorganisms*, 8(6), 852. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060852>

- Maciel, H. P. F., Gouvêa, C. M. C. P., & Pastore, G. M. (2007). Extração e caracterização parcial de peroxidase de folhas de *Copaifera langsdorffii* Desf. *Food Science and Technology*, 27(2), 221-225. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000200002>
- Maciel, H. P. F., Gouvêa, C. M. C. P., Toyama, M., Smolka, M., Marangoni, S., & Pastore, G. M. (2007). Extraction, purification and biochemical characterization of a peroxidase from *Copaifera langsdorffii* leaves. *Química Nova*, 30(5), 1067-1071. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500003>
- Madoui, S., Charef, N., Arrar, L., Baghianni, A., & Khenouf, S. (2018). *In vitro* Antioxidant Activities of Various Extracts from Flowers-Leaves Mixture of Algerian *Cytisus triflorus*. <https://imsear.searo.who.int/jspui/handle/123456789/187852>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols : Food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Manchali, S., Chidambara Murthy, K. N., & Patil, B. S. (2012). Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 94-106. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.08.004>
- Mandal, S. M., Chakraborty, D., & Dey, S. (2010). Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior*, 5, 359-368. <https://doi.org/10.4161/psb.5.4.10871>
- Mao, L., & Yamamoto, K. (2000). Amperometric Biosensor for Glutathione Based on Osmium-Polyvinylpyridine Gel Polymer and Glutathione Sulfhydryl Oxidase. *Electroanalysis*, 12(8), 577-582. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4109\(200005\)12:8<577::AID-ELAN577>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4109(200005)12:8<577::AID-ELAN577>3.0.CO;2-9)
- Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Debeaufort, F., & Voilley, A. (2010). Encapsulation of aroma compounds in biopolymeric emulsion based edible films to control flavour release. *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 984-988. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.016>
- Marouf, A., Tremblin, G., & ScholarVox (Cyberlibris). (2016). *Abrégé de biochimie appliquée* (Nouvelle édition). EDP Sciences. <https://cyberlibris-bdeb.proxy.collecto.ca/catalog/book/88840757>
- Martínez, S., Olmos, I., Carballo, J., & Franco, I. (2010). Quality parameters of Brassica spp. Grown in northwest Spain. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(4), 776-783. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02198.x>
- Marzouki, S. M., Limam, F., Smaali, M. I., Ulber, R., & Marzouki, M. N. (2005). A New Thermostable Peroxidase From Garlic *Allium Sativum* : Purification, Biochemical Properties, Immobilization, and Use in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Detection in Milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127, 101-114. <https://doi.org/10.1385/abab:127:3:201>
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems : Involvement of glutathione and

glutathione-related enzymes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(10), 577-586. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.05.013>

Mashkevich, B. O. (2007). *Drug Delivery Research Advances*. Nova Publishers.

Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>

Mechri, S., Sellem, I., Bouacem, K., Jabeur, F., Chamkha, M., Hacene, H., Bouanane-Darenfed, A., & Jaouadi, B. (2020). Antioxidant and Enzyme Inhibitory Activities of *Metapenaeus monoceros* By-Product Hydrolysates Elaborated by Purified Alkaline Proteases. *Waste and Biomass Valorization*, 11(12), 6741-6755. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-00942-5>

Mechri, S., Sellem, I., Bouacem, K., Jabeur, F., Laribi-Habchi, H., Mellouli, L., Hacène, H., Bouanane-Darenfed, A., & Jaouadi, B. (2020). A biological clean processing approach for the valorization of speckled shrimp *Metapenaeus monoceros* by-product as a source of bioactive compounds. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(13), 15842-15855. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08076-w>

Meeran, S. M., Akhtar, S., Khan, A., & Husain, Q. (2004). An economical, simple and high yield procedure for the immobilization/ stabilization of peroxidases from turnip roots. *Journal of scientific and industrial research*, 63.

Melton, R. G., & Sherwood, R. F. (1996). Antibody-enzyme conjugates for cancer therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(3-4), 153-165. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.3-4.153>

Metz, J., Ribbers, K., Tielbörger, K., & Müller, C. (2014). Long- and medium-term effects of aridity on the chemical defence of a widespread Brassicaceae in the Mediterranean. *Environmental and Experimental Botany*, 105, 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.04.007>

Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27, 405-412. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011274405>

Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunteun, S. L., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02312-9)

Mizutani, Y., Matsumura, Y., Murakami, H., & Mori, T. (2004). Effects of heating on the interaction of lipid and zein in a dry powder system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3570-3576. <https://doi.org/10.1021/jf030677g>

- Mohammadi-Samani, S., & Taghipour, B. (2015). PLGA micro and nanoparticles in delivery of peptides and proteins; problems and approaches. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(4), 385-393. <https://doi.org/10.3109/10837450.2014.882940>
- Mokale, V., Jb, N., Patil, J., Yadava, S., & Verma, U. (2014). Preparation and Characterization of Biodegradable Glimepiride Loaded PLA Nanoparticles by o/w Solvent Evaporation Method Using High Pressure Homogenizer : A Factorial Design Approach Introduction. *SAJ Pharmacy and Pharmacology*, 1. <https://doi.org/10.18875/2375-2262.1.104>
- Moody, M. D., Van Arsdell, S. W., Murphy, K. P., Orencole, S. F., & Burns, C. (2001). Array-based ELISAs for high-throughput analysis of human cytokines. *BioTechniques*, 31(1), 186-190, 192-194. <https://doi.org/10.2144/01311dd03>
- Morlock, M., Koll, H., Winter, G., & Kissel, T. (1997). Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(d,l-lactide-co-glycolide): Protein stability and the effects of stabilizing excipients. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 43(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(96\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(96)00017-3)
- Motamed, S., Ghaemmaghami, F., & Alemzadeh, I. (2009). Turnip (*Brassica rapa*) Peroxidase : Purification and Characterization. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48. <https://doi.org/10.1021/ie801997e>
- Mourtas, S., Fotopoulou, S., Duraj, S., Sfika, V., Tsakiroglou, C., & Antimisiaris, S. G. (2007). Liposomal drugs dispersed in hydrogels. Effect of liposome, drug and gel properties on drug release kinetics. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 55(2), 212-221. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.12.005>
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W. F., Salminen, J.-P., Sköt, L., Smith, L., Thamsborg, S., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, A., Azuhnwi, B., Baert, N., Grosse Brinkhaus, A., & Waghorn, G. (2017). Benefits of Condensed Tannins in Forage Legumes Fed to Ruminants : Importance of Structure, Concentration, and Diet Composition. *Crop Science*, 59. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0369>
- Naczka, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.059>
- Nesterenko, A. (2012). *Etude et fonctionnalisation de protéines végétales en vue de leur application en microencapsulation* [Phd]. <http://ethesis.inp-toulouse.fr/archive/00002112/>
- Nguyen, G. T., Green, E. R., & Meccas, J. (2017). Neutrophils to the ROScue : Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00373>
- Nicell, J. A., Bewtra, J. K., Taylor, K. E., Biswas, N., & St. Pierre, C. (1992). Enzyme Catalyzed Polymerization and Precipitation of Aromatic Compounds from Wastewater. *Water Science and Technology*, 25(3), 157-164. <https://doi.org/10.2166/wst.1992.0088>
- Niizuma, H., Nakamura, Y., Ozaki, T., Nakanishi, H., Ohira, M., Isogai, E., Kageyama, H., Imaizumi, M., & Nakagawara, A. (2006). Bcl-2 is a key regulator for the retinoic acid-induced

- apoptotic cell death in neuroblastoma. *Oncogene*, 25(36), 5046-5055. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209515>
- Niles, R. M. (2004). Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutation Research*, 555(1-2), 81-96. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.05.020>
- Nordstierna, L., Abdalla, A. A., Masuda, M., Skarnemark, G., & Nydén, M. (2010). Molecular release from painted surfaces : Free and encapsulated biocides. *Progress in Organic Coatings*, 69(1), 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2010.05.002>
- Normanly, J. (1997). Auxin metabolism. *Physiologia Plantarum*, 100(3), 431-442. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb03047.x>
- Noudogbessi, J.-P., Gary-Bobo, M., Adomou, A., Adjalian, E., Alitonou, G. A., Avlessi, F., Garcia, M., Sohounhloue, D. C. K., & Menut, C. (2014). Comparative chemical study and cytotoxic activity of *Uvariadendron angustifolium* essential oils from Benin. *Natural Product Communications*, 9(2), 261-264.
- Nouette-Gaulain, K., Quinart, A., Letellier, T., & Sztark, F. (2007). La mitochondrie : Rôles et implications en anesthésie-réanimation. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 26(4), 319-333. <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2007.01.012>
- Nour, S. A., Abdelmalak, N. S., & Naguib, M. J. (2015). Bumadizone calcium dihydrate microspheres compressed tablets for colon targeting : Formulation, optimization and in vivo evaluation in rabbits. *Drug Delivery*, 22(3), 286-297. <https://doi.org/10.3109/10717544.2014.889779>
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 12(5), 913-922. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Oztekin, A., Almaz, Z., Gerni, S., Erel, D., Kocak, S. M., Sengül, M. E., & Ozdemir, H. (2019). Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. *Journal of Chromatography B*, 1114-1115, 86-92. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.035>
- Pablo S., A., Lorena, D., Alba S., N., Javier I., A., & Miriam N., M. (2011). Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems : Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 2011. <https://doi.org/10.4236/jeas.2011.14011>
- Padilla, G., Cartea, M. E., Velasco, P., de Haro, A., & Ordás, A. (2007). Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica rapa*. *Phytochemistry*, 68(4), 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.017>

- Paillard-Giteau, A., Tran, V. T., Thomas, O., Garric, X., Coudane, J., Marchal, S., Chourpa, I., Benoît, J. P., Montero-Menei, C. N., & Venier-Julienne, M. C. (2010). Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.005>
- Pandey, V. P., Awasthi, M., Singh, S., Tiwari, S., & Dwivedi, U. N. (2017). A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 6(1), 1-16. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>
- Papuc, C., Goran, G., Predescu, C., Nicorescu, V., & Ștefan, G. (2017). Plant Polyphenols as Antioxidant and Antibacterial Agents for Shelf-Life Extension of Meat and Meat Products : Classification, Structures, Sources, and Action Mechanisms. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12298>
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24(5), 255-265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>
- Passardi, F., Longet, D., Penel, C., & Dunand, C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 65(13), 1879-1893. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.06.023>
- Pastor, I., Esquembre, R., Micol, V., Mallavia, R., & Mateo, C. R. (2004). A ready-to-use fluorimetric biosensor for superoxide radical using superoxide dismutase and peroxidase immobilized in sol-gel glasses. *Analytical Biochemistry*, 334(2), 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.08.012>
- Payet, B., Shum Cheong Sing, A., & Smadja, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays : Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 10074-10079. <https://doi.org/10.1021/jf0517703>
- Pech-Canul, A. D. L. C., Carrillo-Campos, J., Ballinas-Casarrubias, M. de L., Solis-Oviedo, R. L., Hernández-Rascón, S. K., Hernández-Ochoa, L. R., Gutiérrez-Méndez, N., & García-Triana, A. (2020). Functional Expression and One-Step Protein Purification of Manganese Peroxidase 1 (rMnP1) from *Phanerochaete chrysosporium* Using the *E. coli*-Expression System. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020416>
- Pellegrineschi, A., Kis, M., Dix, I., Kavanagh, T. A., & Dix, P. J. (1995). Expression of horseradish peroxidase in transgenic tobacco. *Biochemical Society Transactions*, 23(2), 247-250. <https://doi.org/10.1042/bst0230247>
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819. <https://doi.org/10.1093/jn/133.9.2812>
- Petibois, C., Cazorla, G., Cassaigne, A., & Déléris, G. (2001). Plasma protein contents determined by Fourier-transform infrared spectrometry. *Clinical Chemistry*, 47(4), 730-738.

- Pierre, P. S., Jansen, J. J., Hordijk, C. A., van Dam, N. M., Cortesero, A.-M., & Dugravot, S. (2011). Differences in Volatile Profiles of Turnip Plants Subjected to Single and Dual Herbivory Above- and Belowground. *Journal of Chemical Ecology*, 37(4), 368-377. <https://doi.org/10.1007/s10886-011-9934-3>
- Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M., & Rocha-Leão, M. H. M. (2006). New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, 23(6), 654-662. <https://doi.org/10.1080/02652040600776523>
- Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63(7), 1035-1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., & Defraigne, J.-O. (2002). Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique Et Metabolisme - NUTR CLIN METAB*, 16, 233-239. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(02\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(02)00166-8)
- Pisoschi, A. (2016). Potentiometric Biosensors : Concept and Analytical Applications-An Editorial. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 5. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000e164>
- Podsedek, A., Sosnowska, D., Redzynia, M., & Anders, B. (2006). Antioxidant capacity and content of Brassica oleracea dietary antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*, 41(s1), 49-58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.01260.x>
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P. R., Fanciullino, A.-L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., & Urban, L. (2010). Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12065-12082. <https://doi.org/10.1021/jf1037745>
- Polidoro, J. (2008). Introduction, Scientific Classification and etymology, and Botanical description. *College Seminar*, 235. [https://academics.hamilton.edu/foodforthought/our\\_research\\_files/turnips.pdf](https://academics.hamilton.edu/foodforthought/our_research_files/turnips.pdf)
- Prabhakar, R., Vreven, T., Morokuma, K., & Musaev, D. G. (2005). Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen peroxide reduction by two glutathione molecules: A density functional study. *Biochemistry*, 44(35), 11864-11871. <https://doi.org/10.1021/bi050815q>
- Prasad, K. V. S. K., Paradha Saradhi, P., & Sharmila, P. (1999). Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in Brassica juncea. *Environmental and Experimental Botany*, 42(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00013-1)
- Qian, Z.-J., Jung, W.-K., & Kim, S.-K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. *Bioresource Technology*, 99(6), 1690-1698. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.005>
- Quiroga, M., Guerrero, C., Botella, M. A., Barceló, A., Amaya, I., Medina, M. I., Alonso, F. J., Forchetti, S. M. de, Tigier, H., & Valpuesta, V. (2000). A Tomato Peroxidase Involved in the Synthesis of Lignin and Suberin. *Plant Physiology*, 122(4), 1119-1128. <https://doi.org/10.1104/pp.122.4.1119>

- Rabeau, S. (2009). *Étude d'un procédé continu de microencapsulation basé sur un micromélangeur*.
- Ragu, S., Faye, G., Iraqui, I., Masurel-Heneman, A., Kolodner, R. D., & Huang, M.-E. (2007). Oxygen metabolism and reactive oxygen species cause chromosomal rearrangements and cell death. *Proceedings of the National Academy of Science*, 104, 9747-9752. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703192104>
- Rahmani, V., Elshereef, R., & Sheardown, H. (2017). Optimizing electrostatic interactions for controlling the release of proteins from anionic and cationically modified alginate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 117, 232-243. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.025>
- Rajhans, G., Sen, S., Barik, A., & Raut, S. (2020). Elucidation of fungal dye-decolorizing peroxidase (DyP) and ligninolytic enzyme activities in decolorization and mineralization of azo dyes. *Journal of Applied Microbiology*, 129. <https://doi.org/10.1111/jam.14731>
- Rascón, M. P., Beristain, C. I., García, H. S., & Salgado, M. A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 549-557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>
- Ré, D. B., Nafia, I., Nieoullon, A., Le Goff, L. K., & Had-Aissouni, L. (2005). Stress oxydatif cérébral : Les astrocytes sont-ils vulnérables aux faibles concentrations intracellulaires de glutamate ? Implications sur la survie neuronale. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 24(5), 502-509. <https://doi.org/10.1016/j.annfar.2005.03.004>
- Rekik, H., Zaraï Jaouadi, N., Bouacem, K., Zenati, B., Kourdali, S., Badis, A., Annane, R., Bouanane-Darenfed, A., Bejar, S., & Jaouadi, B. (2019). Physical and enzymatic properties of a new manganese peroxidase from the white-rot fungus *Trametes pubescens* strain i8 for lignin biodegradation and textile-dyes biodecolorization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.053>
- Ren, L.-L., Liu, Y.-J., Liu, H.-J., Qian, T.-T., Qi, L.-W., Wang, X.-R., & Zeng, Q.-Y. (2014). Subcellular Relocalization and Positive Selection Play Key Roles in the Retention of Duplicate Genes of Populus Class III Peroxidase Family. *The Plant Cell*, 26(6), 2404-2419. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.124750>
- Rezaei, S., Shahverdi, A. R., & Faramarzi, M. (2017). Isolation, one-step affinity purification, and characterization of a polyextremotolerant laccase from the halophilic bacterium *Aquasalibacillus elongatus* and its application in the delignification of sugar beet pulp. *Bioresource Technology*, 230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.036>
- Roberts, E., Kutchan, T., & Kolattukudy, P. E. (1988). Cloning and sequencing of cDNA for a highly anionic peroxidase from potato and the induction of its mRNA in suberizing potato tubers and tomato fruits. *Plant Molecular Biology*, 11(1), 15-26. <https://doi.org/10.1007/BF00016010>
- Rocha-Selmi, G. A., Theodoro, A. C., Thomazini, M., Bolini, H. M. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation

of sweetener sucralose. *Journal of Food Engineering*, 119(1), 28-32. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.002>

Rodrigues, S. N., Fernandes, I., Martins, I. M., Mata, V. G., Barreiro, F., & Rodrigues, A. E. (2008). Microencapsulation of Limonene for Textile Application. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(12), 4142-4147. <https://doi.org/10.1021/ie800090c>

Rojas-Reyes, J. O., Robles-Olvera, V., Carvajal-Zarrabal, O., Castro Matinez, C., Waliszewski, K. N., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2014). Purification and characterization of peroxidase from avocado (Persea americana Mill, cv. Hass). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(9), 1844-1853. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6503>

Rokayya, S., Li, C.-J., Zhao, Y., Li, Y., & Sun, C.-H. (2014). Cabbage (Brassica oleracea L. var. Capitata) phytochemicals with antioxidant and anti-inflammatory potential. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(11), 6657-6662. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.11.6657>

Ryu, J. (2012). Antioxidant potential of ethanol extract of Brassica rapa L. root. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.1068>

Saeed, M., Anjum, S., Ahmad, I., Alim-un-Nisa, Ali, S., & Zia, A. (2012). Nutritional facts and free radical scavenging activity of turnip (Brassica rapa) from Pakistan. *World Applied Sciences Journal*, 19, 370-375. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2012.19.03.691>

Sáez, L., Murphy, E., FitzGerald, R. J., & Kelly, P. (2019). Exploring the Use of a Modified High-Temperature, Short-Time Continuous Heat Exchanger with Extended Holding Time (HTST-EHT) for Thermal Inactivation of Trypsin Following Selective Enzymatic Hydrolysis of the  $\beta$ -Lactoglobulin Fraction in Whey Protein Isolate. *Foods (Basel, Switzerland)*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/foods8090367>

Sahadevan, L. D. M., Misra, C. S., & Thankamani, V. (2016). Characterization of lignin-degrading enzymes (LDEs) from a dimorphic novel fungus and identification of products of enzymatic breakdown of lignin. *3 Biotech*, 6(1), 56. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0384-z>

Saihi, D., Vroman, I., Giraud, S., & Bourbigot, S. (2006). Microencapsulation of ammonium phosphate with a polyurethane shell. Part II. Interfacial polymerization technique. *Reactive and Functional Polymers*, 66(10), 1118-1125. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.02.001>

Saito, T. (2008). Antihypertensive Peptides Derived from Bovine Casein and Whey Proteins. In Z. Bösze (Éd.), *Bioactive Components of Milk* (p. 295-317). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4_12)

Salaün, F., Bedek, G., Devaux, E., Dupont, D., & Gengembre, L. (2011). Microencapsulation of a cooling agent by interfacial polymerization : Influence of the parameters of encapsulation on poly(urethane-urea) microparticles characteristics. *Journal of Membrane Science*, 370(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2010.11.033>

- Sánchez, L., Sánchez, P., de Lucas, A., Carmona, M., & Rodríguez, J. F. (2007). Microencapsulation of PCMs with a polystyrene shell. *Colloid and Polymer Science*, 285(12), 1377-1385. <https://doi.org/10.1007/s00396-007-1696-7>
- Sanlier, & Saban, G. (2018). *The Benefits of Brassica Vegetables on Human Health*. [/paper/The-Benefits-of-Brassica-Vegetables-on-Human-Health-Sanlier-Saban/c7e3ab5286aeb8f539d8ca5d3fa9656a2b02c1d0](https://doi.org/10.1007/978-98-1-4-388-8)
- Sannaveerappa, T., Westlund, S., Sandberg, A.-S., & Undeland, I. (2008). Changes in the Antioxidative Property of Herring (*Clupea harengus*) Press Juice during a Simulated Gastrointestinal Digestion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55, 10977-10985. <https://doi.org/10.1021/jf0721904>
- Santhoshkumar, J., Rajeshkumar, S., & Venkat Kumar, S. (2017). Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles – A review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 11, 46-57. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.06.004>
- Santos, F. M., dos Santos, R. M., Melo, M., Alvarez, H., Lima, Á., Soares, C. M., & Fricks, A. (2014). Horseradish peroxidase encapsulation in alginate microspheres in the presence of imidazolium ionic liquids. *BMC Proceedings*, 8(4), P191. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-P191>
- Saraiva, J. A., Nunes, C. S., & Coimbra, M. A. (2007). Purification and characterization of olive (*Olea europaea* L.) peroxidase – Evidence for the occurrence of a pectin binding peroxidase. *Food Chemistry*, 101(4), 1571-1579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.04.012>
- Sarawong, C., Schoenlechner, R., Sekiguchi, K., Berghofer, E., & Ng, P. K. W. (2014). Effect of extrusion cooking on the physicochemical properties, resistant starch, phenolic content and antioxidant capacities of green banana flour. *Food Chemistry*, 143, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.081>
- Scalbert, A., Monties, B., & Janin, G. (1989). Tannins in wood : Comparison of different estimation methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1324-1329. <https://doi.org/10.1021/jf00089a026>
- Scalia, S., Coppi, G., & Iannuccelli, V. (2011). Microencapsulation of a cyclodextrin complex of the UV filter, butyl methoxydibenzoylmethane : In vivo skin penetration studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 54(2), 345-350. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.09.018>
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 38(7), 995-1014. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700003>
- Schachschal, S., Adler, H.-J., Pich, A., Wetzel, S., Matura, A., & van Pee, K.-H. (2011). Encapsulation of enzymes in microgels by polymerization/cross-linking in aqueous droplets. *Colloid and Polymer Science*, 289(5), 693-698. <https://doi.org/10.1007/s00396-011-2392-1>

- Scher, H. B., Rodson, M., & Lee, K.-S. (1998). Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization utilizing isocyanate or aminoplast chemistry†. *Pesticide Science*, 54(4), 394-400. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199812\)54:4<394::AID-PS829>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199812)54:4<394::AID-PS829>3.0.CO;2-S)
- Schillemans, J., Hennink, W., & Nostrum, C. (2010). The effect of network charge on the immobilization and release of proteins from chemically crosslinked dextran hydrogels. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 76, 329-335. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.08.001>
- Sellem, I., Kaaniche, F., Chakchouk-Mtibaa, A., & Mellouli, L. (2016). Anti-oxidant, antimicrobial and anti-acetylcholinesterase activities of organic extracts from aerial parts of three Tunisian plants and correlation with polyphenols and flavonoids contents. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11, 531. <https://doi.org/10.3329/bjp.v11i2.26001>
- Sergeyeva, T. A., Lavrik, N. V., Rachkov, A. E., Kazantseva, Z. I., Piletsky, S. A., & El'skaya, A. V. (1999). Hydrogen peroxide – sensitive enzyme sensor based on phthalocyanine thin film. *Analytica Chimica Acta*, 391(3), 289-297. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00203-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00203-2)
- Shaikh, J., Bhosale, R., & Singhal, R. (2006). Microencapsulation of black pepper oleoresin. *Food Chemistry*, 94(1), 105-110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.056>
- Shao, P. G., & Bailey, L. C. (2000). Porcine Insulin Biodegradable Polyester Microspheres : Stability and In Vitro Release Characteristics. *Pharmaceutical Development and Technology*, 5(1), 1-9. <https://doi.org/10.1081/PDT-100100513>
- Shigeto, J., & Tsutsumi, Y. (2016). Diverse functions and reactions of class III peroxidases. *The New Phytologist*, 209(4), 1395-1402. <https://doi.org/10.1111/nph.13738>
- Shih, J. H. C., Shannon, L. M., Kay, E., & Lew, J. Y. (1971). Peroxidase Isoenzymes from Horseradish Roots IV. STRUCTURAL RELATIONSHIPS. *Journal of Biological Chemistry*, 246(14), 4546-4551.
- Shu, S., Sun, C., Zhang, X., Wu, Z., Wang, Z., & Li, C. (2009). Hollow and degradable polyelectrolyte nanocapsules for protein drug delivery. *Acta Biomaterialia*, 6(1), 210-217. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.06.020>
- Sikora, E., Cieřlik, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz, A., & Pisulewski, P. M. (2008). The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, 107(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.023>
- Simonetti, E., Veronico, P., Melillo, M. T., Delibes, A., Andrés, M. F., & López-Braña, I. (2009). Analysis of class III peroxidase genes expressed in roots of resistant and susceptible wheat lines infected by *Heterodera avenae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 22(9), 1081-1092. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-9-1081>
- Simonoska Crcarevska, M., Glavas Dodov, M., & Goracinova, K. (2008). Chitosan coated Calcium alginate microparticles loaded with budesonide for delivery to the inflamed colonic mucosa. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of*

*Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 68(3), 565-578.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.007>

Simons, T. J., & Ross, A. F. (1970). Enhanced peroxidase activity associated with induction of resistance to Tobacco mosaic virus in hypersensitive Tobacco. *Phytopathology*, 60(2), 383-384.

Singh, B. K., Sharma, S. R., & Singh, B. (2010). Antioxidant enzymes in cabbage : Variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae*, 124(1), 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.12.011>

Singh, N., & Singh, J. (2003). A Method for Large Scale Purification of Turnip Peroxidase and Its Characterization. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 33(2), 125-135. <https://doi.org/10.1081/PB-120021437>

Singh, S., Singh, A. N., Verma, A., & Dubey, V. K. (2013). Biodegradable polycaprolactone (PCL) nanosphere encapsulating superoxide dismutase and catalase enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(7), 1545-1558. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0427-4>

Şişecioglu, M., Guuml, İ., lccedil, Ccedil, M., ankaya, Atasever, A., Şehitoğlu, M. H., Kaya, H. B., Ouml, H., & zdemir. (2010). Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Medicinal Plant Research*, 4(12), 1187-1196. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.071>

Smulevich, G., Jakopitsch, C., Droghetti, E., & Obinger, C. (2006). Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(4), 568-585. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2006.01.033>

Somchue, W., Sermsri, W., Shiwatana, J., & Siripinyanond, A. (2009). Encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Research International*, 42(8), 909-914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.021>

Someya, S., Yoshiki, Y., & Okubo, K. (2002). Antioxidant compounds from bananas (*Musa Cavendish*). *Food Chemistry*, 79(3), 351-354. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00186-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00186-3)

Somtürk, B., Kalın, R., & Özdemir, N. (2014). Purification of peroxidase from red cabbage (*Brassica oleracea* var. *Capitata* f. *Rubra*) by affinity chromatography. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 173(7), 1815-1828. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0968-1>

Song, J., Kahveci, D., Chen, M., Guo, Z., Xie, E., Xu, X., Besenbacher, F., & Dong, M. (2012). Enhanced Catalytic Activity of Lipase Encapsulated in PCL Nanofibers. *Langmuir*, 28(14), 6157-6162. <https://doi.org/10.1021/la300469s>

Sottomayor, M., López-Serrano, M., DiCosmo, F., & Barceló, A. R. (1998). Purification and characterization of  $\alpha$ -3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *FEBS Letters*, 428(3), 299-303. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00551-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00551-1)

Sousa, C., Pereira, D. M., Valentão, P., Ferreres, F., Pereira, J. A., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2009). *Pieris brassicae* inhibits xanthine oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2288-2294. <https://doi.org/10.1021/jf803831v>

- Stelinski, L. L., McGhee, P., Haas, M., Il'ichev, A. L., & Gut, L. J. (2007). Sprayable microencapsulated sex pheromone formulations for mating disruption of four tortricid species : Effects of application height, rate, frequency, and sticker adjuvant. *Journal of Economic Entomology*, 100(4), 1360-1369. [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2007\)100\[1360:smspff\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2007)100[1360:smspff]2.0.co;2)
- Sturesson, C., & Carlfors, J. (2000). Incorporation of protein in PLG-microspheres with retention of bioactivity. *Journal of Controlled Release*, 67(2), 171-178. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00205-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00205-4)
- Subtil, S. F., Rocha-Selmi, G. A., Thomazini, M., Trindade, M. A., Netto, F. M., & Favaro-Trindade, C. S. (2014). Effect of spray drying on the sensory and physical properties of hydrolysed casein using gum arabic as the carrier. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2014-2021. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0722-z>
- Sun, R. (2015). Economic/Academic Importance of Brassica rapa. In X. Wang & C. Kole (Éds.), *The Brassica rapa Genome* (p. 1-15). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-47901-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-47901-8_1)
- Supsakulchai, A., Ma, G. H., Nagai, M., & Omi, S. (2003). Preparation of uniform titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) polystyrene-based composite particles using the glass membrane emulsification process with a subsequent suspension polymerization. *Journal of Microencapsulation*, 20(1), 1-18. <https://doi.org/10.3109/02652040309178045>
- Suzuki, S., & Umezawa, T. (2010). Biosynthesis of lignans and norlignans. *Journal of Wood Science*, 53, 273-284. <https://doi.org/10.1007/s10086-007-0892-x>
- Svalheim, Ø., & Robertsen, B. (1990). Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. *Physiologia Plantarum*, 78(2), 261-267. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1990.tb02090.x>
- Swarnalatha, V., Aluri Esther, R., & Dhamodharan, R. (2013). Immobilization of  $\alpha$ -amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 96, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.05.022>
- Sylvia, J., Lakshmi, J. R. D., & Devi, R. (2015). Purification and Characterization of Manganese Peroxidase from Musa Acuminata Stem and Its Effect on Degradation of Dye Effluent. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(5), 2981-2987. <https://doi.org/10.15680/IJIRSET.2015.0405066>
- Szigeti, K., Smeller, L., Osváth, S., Majer, Z., & Fidy, J. (2008). The structure of horseradish peroxidase C characterized as a molten globule state after Ca<sup>2+</sup> depletion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(12), 1965-1974. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.08.015>
- Takuo, O., & Hideyuki, I. (2011). Tannins of Constant Structure in Medicinal and Food Plants—Hydrolyzable Tannins and Polyphenols Related to Tannins. *Molecules*, 16. <https://doi.org/10.3390/molecules16032191>

- Tatsumi, K., Wada, S., & Ichikawa, H. (1996). Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 51(1), 126-130. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960705\)51:1<126::AID-BIT15>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960705)51:1<126::AID-BIT15>3.0.CO;2-O)
- Taveira, M., Fernandes, F., Guedes de Pinho, P., Andrade, P. B., Pereira, J. A., & Valentão, P. (2009). Evolution of Brassica rapa var. Rapa L. volatile composition by HS-SPME and GC/IT-MS. *Microchemical Journal*, 93(2), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.05.011>
- Teekamp, N., Duque, L. F., Frijlink, H. W., Hinrichs, W. L. J., & Olinga, P. (2015). Production methods and stabilization strategies for polymer-based nanoparticles and microparticles for parenteral delivery of peptides and proteins. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12(8), 1311-1331. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1003807>
- Teixeira, B., Pires, C., Nunes, M., & Batista, I. (2016). Effect of in vitro gastrointestinal digestion on the antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from Cape hake by-products. *International Journal of Food Science & Technology*, 51. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13233>
- Tenore, G. C., Troisi, J., Fiore, R. D., Basile, A., & Novellino, E. (2012). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of Rapa Catozza Napoletana (Brassica rapa L. var. Rapa DC.) seed meal, a promising protein source of Campania region (southern Italy) horticultural germplasm. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(8), 1716-1724. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5537>
- Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005-L1028. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005>
- Thongsook, T., & Barrett, D. M. (2005). Purification and Partial Characterization of Broccoli (Brassica oleracea Var. Italica) Peroxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3206-3214. <https://doi.org/10.1021/jf048162s>
- Tiarks, F., Landfester, K., & Antonietti, M. (2001). Preparation of Polymeric Nanocapsules by Miniemulsion Polymerization. *Langmuir*, 17(3), 908-918. <https://doi.org/10.1021/la001276n>
- Tintoré, S., Torres-Fuentes, C., Solorza-Feria, J., Alaiz, M., Calle, J., Martínez-Ayala, A., Guerrero, L., & Vioque, J. (2015). Antioxidant and Chelating Activity of Nontoxic Jatropha curcas L. Protein Hydrolysates Produced by In Vitro Digestion Using Pepsin and Pancreatin. *Journal of Chemistry*, 2015, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2015/190129>
- Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. *Gene*, 288(1-2), 129-138. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(02\)00465-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(02)00465-1)
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.885>
- Tran, V.-T., Karam, J.-P., Garric, X., Coudane, J., Benoît, J.-P., Montero-Menei, C. N., & Venier-Julienne, M.-C. (2012). Protein-loaded PLGA-PEG-PLGA microspheres: A tool for cell

- therapy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 128-137. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.10.030>
- Tsai, T., Mehta, R. C., & Deluca, P. P. (1996). Adsorption of peptides to poly(D,L-lactide-co-glycolide): 2. Effect of solution properties on the adsorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 127(1), 43-52. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04112-5](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04112-5)
- Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246. <https://doi.org/10.3390/nu2121231>
- Umeno, A., Biju, V., & Yoshida, Y. (2017). In vivo ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes. *Free Radical Research*, 51(4), 413-427. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1315114>
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
- Valli, K., Wariishi, H., & Gold, M. H. (1990). Oxidation of monomethoxylated aromatic compounds by lignin peroxidase : Role of veratryl alcohol in lignin biodegradation. *Biochemistry*, 29(37), 8535-8539. <https://doi.org/10.1021/bi00489a005>
- Van de Weert, M., Hoehstetter, J., Hennink, W. E., & Crommelin, D. J. A. (2000). The effect of a water/organic solvent interface on the structural stability of lysozyme. *Journal of Controlled Release*, 68(3), 351-359. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00277-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00277-7)
- Van Deurzen, M. P. J., Van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (1997). Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron*, 53(39), 13183-13220. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(97\)00477-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(97)00477-8)
- Van Gijlswijk, R. P. M., Talman, E. G., Peekel, I., Bloem, J., van Velzen, M. A., Heetebrij, R. J., & Tanke, H. J. (2002). Use of horseradish peroxidase- and fluorescein-modified cisplatin derivatives for simultaneous labeling of nucleic acids and proteins. *Clinical Chemistry*, 48(8), 1352-1359.
- Van Loon, L. C. (1975). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' : IV. Similarity of qualitative changes of specific proteins after infection with different viruses and their relationship to acquired resistance. *Virology*, 67(2), 566-575. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(75\)90456-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(75)90456-0)
- Varela, E., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2000). Southern blot screening for lignin peroxidase and aryl-alcohol oxidase genes in 30 fungal species. *Journal of Biotechnology*, 83(3), 245-251. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00323-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00323-0)
- Veitch, N. C. (2004). Horseradish peroxidase : A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>

- Vianello, F., Zennaro, L., Paolo, M. L. D., Rigo, A., Malacarne, C., & Scarpa, M. (2000). Preparation, morphological characterization, and activity of thin films of horseradish peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(5), 488-495. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000605\)68:5<488::AID-BIT2>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000605)68:5<488::AID-BIT2>3.0.CO;2-Q)
- Vijaya Kumar Reddy, C., Sreeramulu, D., & Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43(1), 285-288. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.10.006>
- Villatoro-Pulido, M., Font, R., Obregón-Cano, S., Moreno-Rojas, R., Amaro-López, M. Á., Anter, J., Muñoz-Serrano, A., De Haro Bailón, A., Alonso-Moraga, A., & Del Río-Celestino, M. (2013). Cytotoxic and genotoxic effects of metal(oid)s bioactivated in rocket leaves (*Eruca vesicaria* subsp. *Sativa* Miller). *Chemosphere*, 93(10), 2554-2561. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.071>
- Villatoro-Pulido, M., Font, R., Saha, S., Obregón-Cano, S., Anter, J., Muñoz-Serrano, A., De Haro-Bailón, A., Alonso-Moraga, A., & Del Río-Celestino, M. (2012). In vivo biological activity of rocket extracts (*Eruca vesicaria* subsp. *Sativa* (Miller) Thell) and sulforaphane. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(5), 1384-1392. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.017>
- Wagner, M., & Nicell, J. (2002). Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water research*, 36, 4041-4052. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00133-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00133-1)
- Wagner, M., & Nicell, J. A. (2001). Peroxidase-catalyzed removal of phenols from a petroleum refinery wastewater. *Water Science and Technology*, 43(2), 253-260. <https://doi.org/10.2166/wst.2001.0097>
- Wang, R., Tian, Z., & Chen, L. (2011). A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International*, 44(9), 2735-2741. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.013>
- Wang, S. Y., & Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5677-5684. <https://doi.org/10.1021/jf000766i>
- Wang, W., Wang, X., Ye, H., Hu, B., Zhou, L., Jabbar, S., Zeng, X., & Shen, W. (2016). Optimization of extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 979-988. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.051>
- Wang, Y., Li, P., Peng, Z., She, F. H., & Kong, L. X. (2013). Microencapsulation of nanoparticles with enhanced drug loading for pH-sensitive oral drug delivery for the treatment of colon cancer. *Journal of Applied Polymer Science*, 129(2), 714-720. <https://doi.org/10.1002/app.38582>
- Welinder, K. G. (1979). Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some

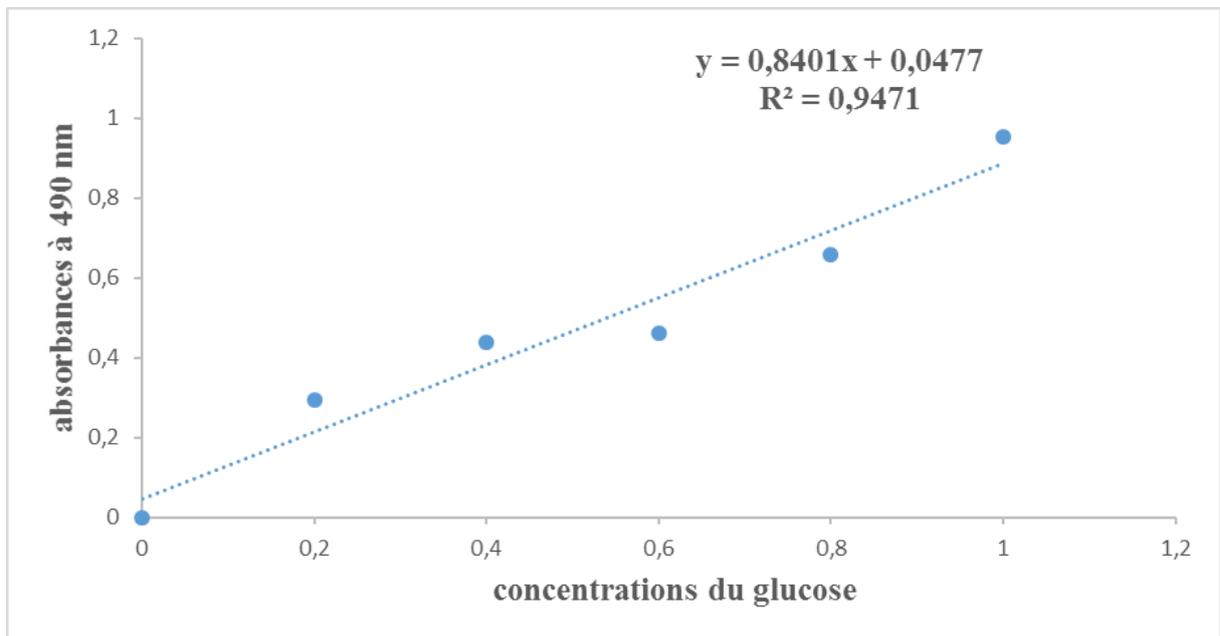
- structural characteristics of horseradish peroxidase C. *European Journal of Biochemistry*, 96(3), 483-502. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13061.x>
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2(3), 388-393. [https://doi.org/10.1016/0959-440X\(92\)90230-5](https://doi.org/10.1016/0959-440X(92)90230-5)
- Wilson, N., & Shah, N. (2007). Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food Journal*, 14.
- Wischke, C., & Schwendeman, S. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 364, 298-327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.04.042>
- Wright, H., & Nicell, J. A. (1999). Characterization of soybean peroxidase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresource Technology*, 70(1), 69-79. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00007-3)
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037. <https://doi.org/10.1021/jf049696w>
- Xie, X., Yang, Y., Chi, Q., Li, Z., Zhang, H., Li, Y., & Yang, Y. (2014). Controlled Release of Dutasteride from Biodegradable Microspheres: In Vitro and In Vivo Studies. *PLOS ONE*, 9(12), e114835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114835>
- Xu, G., & Chance, M. R. (2007). Hydroxyl radical-mediated modification of proteins as probes for structural proteomics. *Chemical Reviews*, 107(8), 3514-3543. <https://doi.org/10.1021/cr0682047>
- Yakovleva, J., Davidsson, R., Lobanova, A., Bengtsson, M., Eremin, S., Laurell, T., & Emnéus, J. (2002). Microfluidic Enzyme Immunoassay Using Silicon Microchip with Immobilized Antibodies and Chemiluminescence Detection. *Analytical Chemistry*, 74(13), 2994-3004. <https://doi.org/10.1021/ac015645b>
- Yan, J., Yuan, S.-S., Jiang, L.-L., Ye, X.-J., Ng, T. B., & Wu, Z.-J. (2015). Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(12), 4961-4981. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6654-6>
- Yang, S., Yang, J., Wang, T., Li, L., Yu, S., Jia, R., & Chen, P. (2020). Construction of a combined enzyme system of graphene oxide and manganese peroxidase for efficient oxidation of aromatic compounds. *Nanoscale*, 12(14), 7976-7985. <https://doi.org/10.1039/D0NR00408A>
- Yang, Y.-Y., Chung, T.-S., & Ping Ng, N. (2001). Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*, 22(3), 231-241. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00178-2)
- Yeo, Y., & Park, K. (2004). Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Archives of Pharmacal Research*, 27(1), 1. <https://doi.org/10.1007/BF02980037>

- Yoo, S.-H., Song, Y.-B., Chang, P.-S., & Lee, H. G. (2006). Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 38(1), 25-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.12.013>
- Yumoto, I., Ichihashi, D., Iwata, H., Istokovics, A., Ichise, N., Matsuyama, H., Okuyama, H., & Kawasaki, K. (2000). Purification and Characterization of a Catalase from the Facultatively Psychrophilic Bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1T Exhibiting High Catalase Activity. *Journal of Bacteriology*, 182(7), 1903-1909. <https://doi.org/10.1128/JB.182.7.1903-1909.2000>
- Zambaux, M. F., Bonneaux, F., Gref, R., Dellacherie, E., & Vigneron, C. (1999). Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 60(2-3), 179-188. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(99\)00073-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(99)00073-5)
- Zámocký, M., Janeček, Š., & Koller, F. (2000). Common phylogeny of catalase-peroxidases and ascorbate peroxidases. *Gene*, 256(1), 169-182. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00358-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00358-9)
- Zdarta, J., Jędrzak, A., Kłapiszewski, Ł., & Jesionowski, T. (2017). Immobilization of Cellulase on a Functional Inorganic–Organic Hybrid Support : Stability and Kinetic Study. *Catalysts*, 7(12), 374. <https://doi.org/10.3390/catal7120374>
- Zeyadi, M. (2019). Purification and characterization of peroxidase from date palm cv. Agwa fruits. *International Journal of Food Properties*, 22(1), 1910-1919. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1691589>
- Zeyadi, M., & Almulaiky, Y. Q. (2020). A novel peroxidase from *Ziziphus jujuba* fruit : Purification, thermodynamics and biochemical characterization properties. *Scientific Reports*, 10(1), 8007. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64599-9>
- Zhang, X., & Shao, X. (2015). Characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase and the role in browning of loquat fruit. *Czech Journal of Food Sciences*, 33 (2015)(No. 2), 109-117. <https://doi.org/10.17221/384/2014-CJFS>
- Zhang, Y., He, P., & Hu, N. (2004). Horseradish peroxidase immobilized in TiO<sub>2</sub> nanoparticle films on pyrolytic graphite electrodes : Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis. *Electrochimica Acta*, 49(12), 1981-1988. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2003.12.028>
- Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., & McClements, D. (2016). Protein encapsulation in alginate hydrogel beads : Effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. *Food Hydrocolloids*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.015>
- Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., & Sun, J. (2011). Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose : Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, 104(1), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.11.031>
- Zheng, S., Luo, L., Bo, R., Liu, Z., Xing, J., Niu, Y., Hu, Y., Liu, J., & Wang, D. (2016). Evaluation of optimum conditions for pachyman encapsulated in poly(D,L-lactic acid) nanospheres by response surface methodology and results of a related in vitro study. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4891-4904. <https://doi.org/10.2147/IJN.S115742>

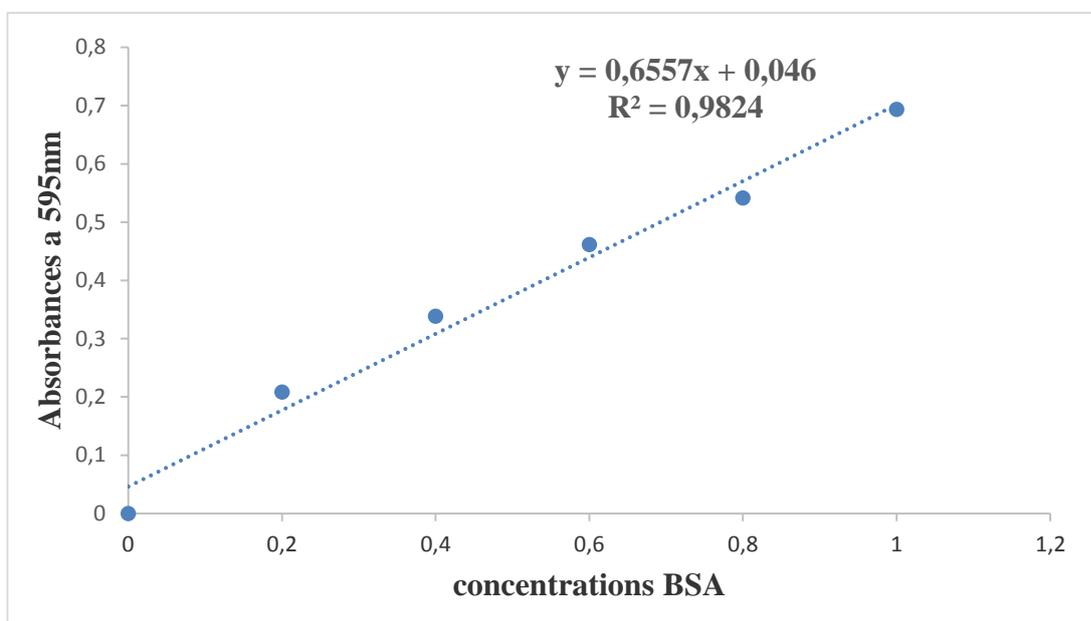
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)
- Zhou, K., Sun, S., & Canning, C. (2012). Production and functional characterisation of antioxidative hydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 135(3), 1192-1197. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.063>
- Zhou, Q. Z. K., & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9(1), 33-40. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00118-8)
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714-2721. <https://doi.org/10.1021/jf703697e>
- Zhuang, H., Tang, N., & Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1810-1821. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.013>
- Zimmer, N., & Cordesse, R. (1996). Influence des tanins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRAE Productions Animales*, 9(3), 167-179. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.1996.9.3.4044>

# **Annexes**

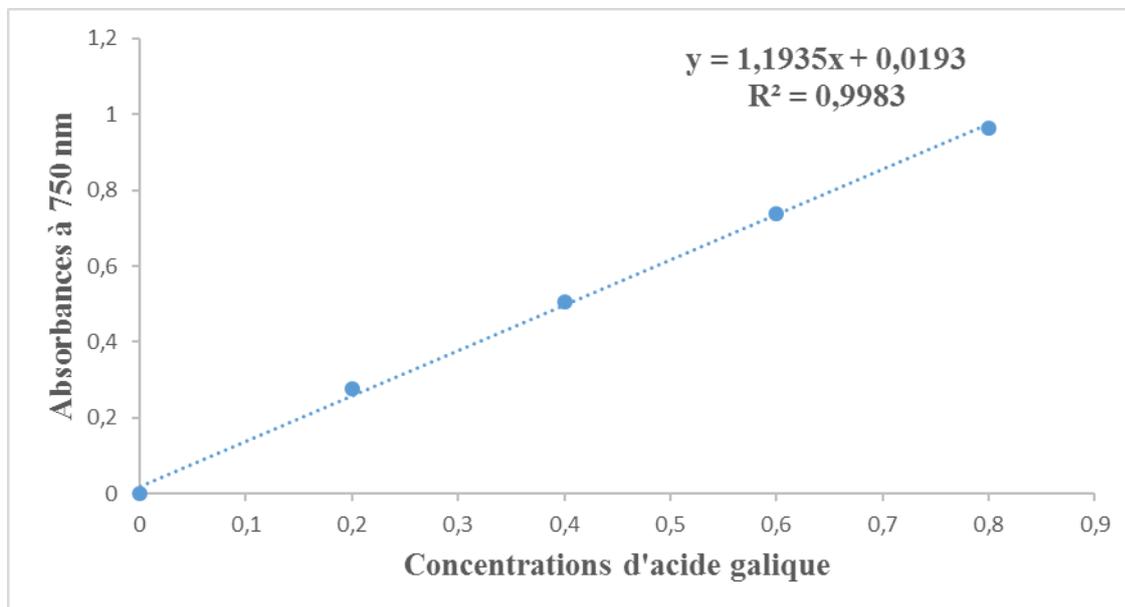
**Annexe N°1 : Courbe d'étalonnage des sucres totaux.**



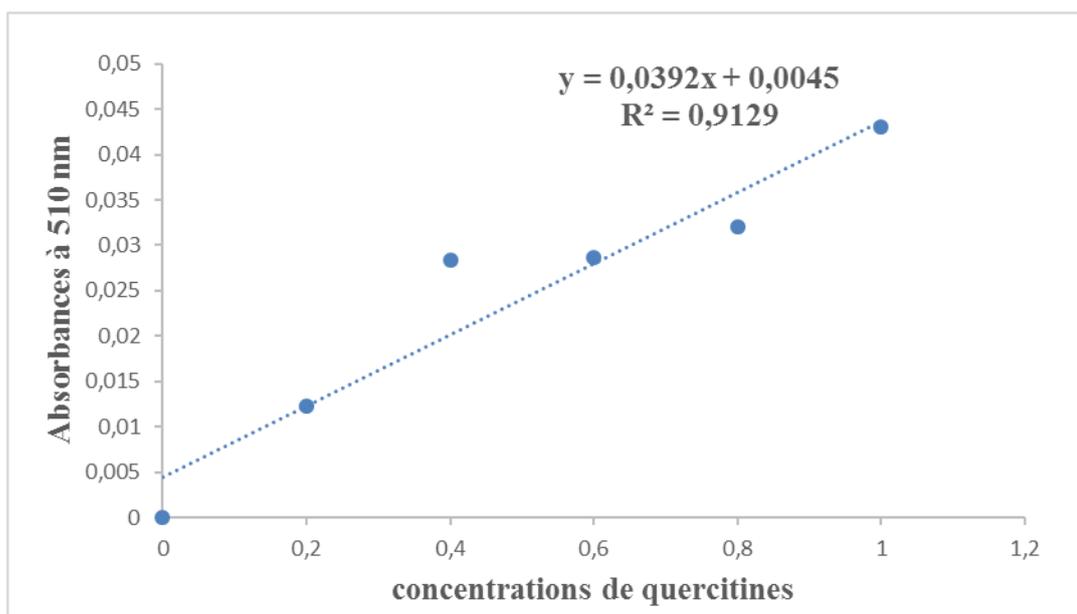
**Annexe N°2 : Courbe d'étalonnage des protéines.**



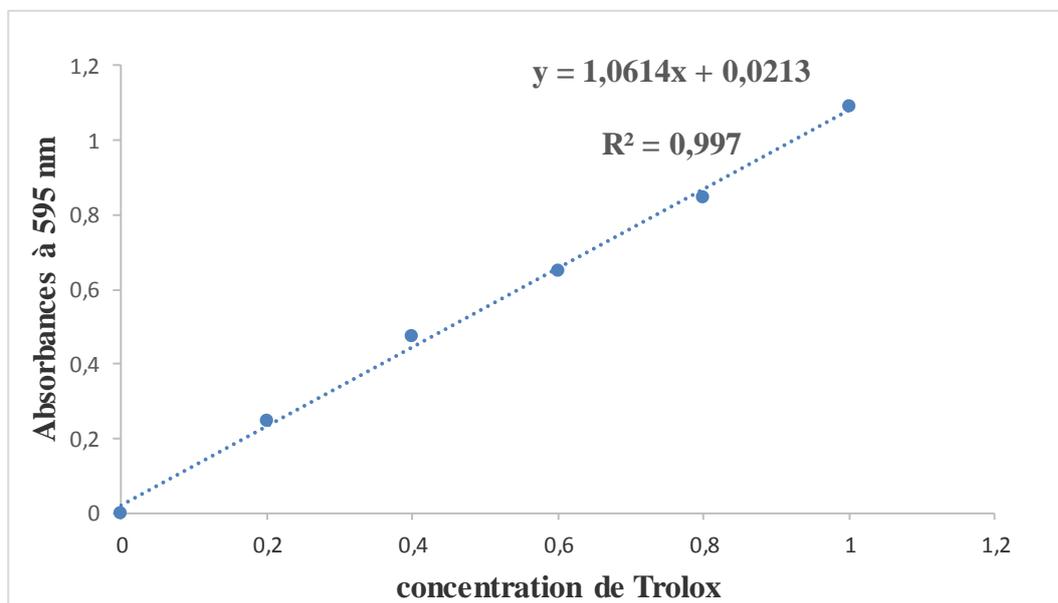
**Annexe N° 3:** Courbe d'étalonnage des polyphénols.



**Annexe N°4 :** Courbe d'étalonnage des flavonoïdes



## Annexe N° 5 : Courbe d'étalonnage du pouvoir réducteur



### Préparation de la solution Bradford

- 50 ml de Ethanol à 95%
- 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 85%
- 100 mg de Bleu de coomassie

Le mélange a été ajusté jusqu'à un litre avec de l'eau distillé. Le tout a été agité puis filtré.

### Composition de tampon réactionnel :

- 50ml de tampon citrate-phosphate
- 100  $\mu$ l de gaiacol
- 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## Production scientifique

### Publications

Amel DAHDOUH, Mostapha BACHIR-BEY, Djamel Edine KATI (2020) **Optimization of peroxidase activity of turnip (*brassica rapa*) using response surface methodology.** Acta Universitatis Cibiniensis Series E: FOOD TECHNOLOGY. 24(2): 186-194.

Amel DAHDOUH, Djamel Edine KATI, Mostapha BACHIR-BEY, Ali AKSAS, Farouk REZGUI (2021) **Deployment of response surface methodology to optimize microencapsulation of peroxidases from turnip roots (*Brassica rapa* L.) by double emulsion in PLA polymer.** Journal of Food Science 86 (5) :1893-1906.

Amel DAHDOUH, Nawel BOUCHERBA, Khelifa BOUACEM, Sondes MECHRI, Adel AMIROUCHE, Ali AKSAS, Bassem JAOUADI, Djamel Edine KATI (2021) **A new peroxidase from the roots of the Algerian white turnip (*Brassica rapa*, variety *rapa*) : extraction, purification, characterization, and antioxidant potential.** Biocatalysis and Biotransformation : 1-18

### Communications

Dahdouh Amel, Zeghibib Walid, Kouchah Lylia, Amessis Tinhinane, Kati Djamel Edine, Aksas Ali. **Effet du solvant d'extraction sur l'activité antioxydante du navet (*Brassica rap.L*).** Séminaire International Avancée sur les Antioxydants Naturels : Sources, mécanismes d'action et valorisation en santé et alimentation. 16 et 17 octobre 2019. Université de Bejaia, Algérie.

Aksas Ali, Zeghibib Walid, Dahdouh Amel, Kouchah Lylia, Amessis Tinhinane, Kati Djamel Edine, **Etude de l'activité antioxydante d'extrait du navet (racine et tige) (*Brassica rapa.L*)** Séminaire National Alimentation, Santé et Environnement: Avancées et Perspectives. 25 et 26 Septembre 2019. Université de Bejaia. Algérie.

## Résumé

Les racines de navet (*Brassicarapa.L*) possèdent un fort potentiel bioactif (antioxydants enzymatique et non enzymatique). Les enzymes étant des molécules bioactives aux propriétés catalytiques spécifiques, leur exploitation nécessite une conduite particulière visant le maintien de leurs activités et leur efficacité pendant leur manipulation et lors de l'utilisation finale, notamment dans le cas de la prise par voie orale. Les environnements gastro-intestinaux pourraient inhiber l'activité catalytique ou dénaturer l'enzyme. Dans ce contexte, nos travaux de thèse ont eu pour objectif l'étude des conditions optimales de l'activité enzymatique antioxydante des Peroxydases (POD) (pH, température et concentration en NaCl), en utilisant la méthodologie des surfaces de réponse (RSM). Après purification de l'extrait enzymatique, une microencapsulation par le polymère PLA afin de maintenir ses propriétés antioxydante a été développé. Ainsi, la caractérisation des microcapsules a été réalisée et leur digestion gastro-intestinale *in vitro* évaluée. La libération contrôlée de la POD et l'effet des conditions de stockage des microcapsules ont été étudié. Enfin, afin d'évaluer les propriétés antioxydante des extraits, plusieurs tests ont été utilisés.

La protéine purifiée de l'extrait de navet (TRP) a montré une masse moléculaire d'environ 58 kDa avec une activité spécifique de 14 500 U / mg et des caractéristiques similaires à celles des POD, notamment la présence de composants hème dans sa structure 3D. La TRP a montré une efficacité catalytique supérieure à celle de la peroxydase de raifort (HRP) du commerce. L'optimisation par RSM de la microencapsulation (facteurs : concentrations d'agent tensioactif PVA, de polymère et d'extrait enzymatique) avec des valeurs de 1,55% de PVA, 30 mg / ml de polymère PLA et 55 mg/ml d'extrait enzymatique avec une efficacité d'encapsulation de 57,29%. Les microcapsules optimisées sont de structure sphérique régulière. L'étude de la libération des protéines *in vitro* a confirmé que les microcapsules ont une excellente libération prolongée durant la digestion gastrique simulée. La conservation des capsules à 25 et 4 ° C affiche une activité POD résiduelle avec environ 60% des activités initiales pendant 80 jours de stockage. Enfin, les propriétés antioxydantes des extraits enzymatique et non enzymatique (polyphénolique) varient en fonction des traitements et des tests antioxydants utilisés.

**Mots clés :** *Brassica rapa L.* ; Peroxydases ; Activité antioxydante ; activité enzymatique ; Microencapsulation ; PLA ; Optimisation ; Purification ; Méthodologie de Surface de Réponse (RSM).

## Abstract:

Turnip roots (*Brassica rapa. L.*) have a strong bioactive potential (enzymatic and non-enzymatic antioxidants). Enzymes being bioactive molecules with specific catalytic properties, their exploitation requires a particular care aiming at the preservation of their activities and their effectiveness during their handling and at the time of the final use, in particular in the case of oral uptake. Gastrointestinal environments could inhibit the catalytic activity or denature the enzyme. In this context, the objective of our work was to study the optimal conditions for the antioxidant enzymatic activity of Peroxidases (POD) (pH, temperature and NaCl concentration), using the response surface methodology (RSM). After purification of the enzymatic extract, a microencapsulation by PLA polymer in order to maintain its antioxidant properties was developed. Thus, the characterization of the microcapsules was performed and their gastrointestinal digestion *in vitro* was evaluated. The controlled release of POD and the effect of storage conditions of the microcapsules were also studied. Finally, in order to evaluate the antioxidant properties of the extracts, several tests were used.

The purified turnip extract protein (TRP) showed a molecular weight of 58 kDa with a specific activity of 14,500 U/mg and characteristics were similar to those of POD, including the presence of heme components in its 3D structure. TRP showed higher catalytic efficiency than commercial horseradish peroxidase (HRP). RSM optimization of microencapsulation (concentrations of surfactant PVA, polymer and enzyme extract) with values of 1.55% PVA, 30 mg/ml PLA polymer and 55 mg/ml enzyme extract with an encapsulation efficiency of 57.29%. The optimized microcapsules showed a regular spherical structure. The *in vitro* protein release study confirmed that the microcapsules have excellent sustained release during simulated gastric digestion. Storage of the capsules at 25 and 4°C showed a residual POD activity with about 60% of the initial activities during 80 days of storage. Finally, the antioxidant properties of the enzymatic and non-enzymatic (polyphenolic) extracts vary according to the treatments and antioxidant tests used.

**Keywords :** *Brassica rapa L.*; Peroxidases; Antioxidant activity; enzymatic activity; Microencapsulation; PLA; Optimization; Purification; Response Surface Methodology (RSM).

ملخص :

تم استخدام جذور الفلفت (*Brassicarapa.L*) في الطب الشعبي كعلاج لمحفزاته الحيوية وأنشطته القوية المضادة للسرطان ومضادات الأكسدة. تحتوي هذه المجموعة من الخضروات على مضادات الأكسدة المعروفة ، مثل البوليفينول ، والفلافونويد ، والإنزيمات المضادة للأكسدة مثل الكاتالاز ، والأكسيد الفائق ديسموتاز (SOD) ، والبيروكسيداز. نظرًا لأن الإنزيمات عبارة عن جزيئات نشطة بيولوجيًا لها خصائص تحفيزية ، فإن استخدامها في العديد من التطبيقات يتطلب عناية خاصة تؤدي إلى الحفاظ على أنشطتها وكفاءتها أثناء العلاج وبعد الاستخدام النهائي. في عملنا ، يمكن أن تمنع البنية المعدية المعوية النشاط التحفيزي أو تفسد الإنزيم. في هذا السياق ، من أجل حمايتها ، تم استخدام تقنية الكبسولة الدقيقة بواسطة بوليمر متعدد حمض اللينيك (PLA) ، لأنها تحمي المواد الحساسة من ظروف المعالجة أو التخزين وتوفر للمنتجات مدة صلاحية أطول. تتيح هذه التقنية أيضًا إمكانية إطلاق المكونات النشطة بطريقة خاضعة للرقابة في الوقت المناسب. أولاً يركز هذا العمل على تحديد شروط نشاط بيروكسيداز (POD) المحسن للفلفت (*Brassicarapa*). يتم تقييم نشاط البيروكسيداز من خلال مراقبة أكسدة الجايكول إلى تترأغوايكول في وجود بيروكسيد الهيدروجين ( $H_2O_2$ ). قبل تحسين نشاط بيروكسيداز الفلفت باستخدام منهجية سطح الاستجابة (RSM) ، يتم تنفيذ خطوة أولية لكل معلمة تمت دراستها (درجة الحموضة ودرجة الحرارة وتركيز كلوريد الصوديوم). بالإضافة إلى ذلك ، يتم استخدام RSM وفقًا لتصميم Box-Behnken لضبط شروط التحسين. في الجزء الثاني من هذا العمل ، تمت تنقية مستخلص الفلفت إلى التجانس وأظهر كتلة جزيئية تبلغ حوالي 58 كيلو دالتون يشهد عليها الرحلان الكهربائي على هلام دوديسيل كبريتات بولي أكريلاميد الصوديوم (SDS-PAGE) والكروماتوجرافيا. بواسطة ترشيح جل عالي الأداء (HPLC). كان عامل التنقية للفلفت المنقى 19 مع عائد 51.1٪. كان النشاط النوعي للإنزيم المنقى هو 14500 وحدة / مغ. أظهر تسلسل N-terminal لأول 19 من بقايا الأحماض الأمينية للفلفت تشابهاً قوياً مع تلك الموجودة في بيروكسيداز. أظهر النشاط الأمثل عند درجة الحموضة 6 و 55 درجة مئوية باستخدام غاياكول. ومن المثير للاهتمام أن هذا البيروكسيداز تم تثبيطه تمامًا بواسطة أزيد الصوديوم ( $Na_3N$ ) وسيانيد البوتاسيوم (KCN) ، مما يشير إلى وجود مكونات الهيم في هيكله ثلاثي الأبعاد. الأكثر إثارة للاهتمام هو أن الفلفت أظهر كفاءة تحفيزية أعلى من بيروكسيداز الفجل التجاري (HRP). تلقى الفلفت اهتمامًا متجددًا نظرًا لأنشطته الممتازة المضادة للأكسدة مع الكسح الفعال لجذور ABTS والبيروكسيد وصلاحيات قوية لتقليل أيونات الحديد والخلاب ، ويتناول الجزء الثالث من هذا العمل تحسين تركيب واستقرار الكبسولات الدقيقة لخلاصة إنزيم الفلفت باستخدام بوليمر متعدد حمض اللينيك (PLA) بتقنية الاستحلاب المزوج. كانت تراكيز الفلفت بالسطح والبوليمر وخواص الإنزيم هي العوامل المحسنة. وفقًا للنتائج التي تم الحصول عليها باستخدام تصميم Box-Behnken ، كانت المعلمات المثلى التي تم العثور عليها هي 55.1٪ كحول بولي فينيل و 55 مل/مغ مستخلص الإنزيم و 30 مل/مغ متعدد حمض اللينيك بكفاءة تغليف تبلغ 29.57٪. أظهر التوصيف المورفولوجي لـ SEM للكبسولات الدقيقة المحسنة بنية كروية منتظمة. حدد التحليل الطيفي FTIR مجموعات وظيفية معينة وروابط كيميائية قبل وبعد الكبسولة الدقيقة. أكدت دراسة إطلاق البروتين في المختبر أن الكبسولات الدقيقة لها إطلاق مستدام ممتاز في محاكاة الهضم المعدي. يُظهر التخزين المغلف لمستخلص الإنزيم عند 25 و 4 درجات مئوية نشاط البيروكسيداز المتبقي الجيد مع حوالي 60 ٪ من الأنشطة الأولية خلال 80 يومًا من التخزين ، بينما يفقد الإنزيم الحر نشاطه الأولي في 15 و 30 يومًا ، على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** برايسكارابا؛ بيروكسيداز؛ فلفت ؛ النشاط المضاد للأكسدة؛ النشاط الإنزيمي؛ كبسولة دقيقة ؛ متعدد حمض اللينيك (PLA) ؛ التحسين ؛ تنقية؛ منهجية سطح الاستجابة (RSM).