

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences Alimentaires**  
**Filière : Sciences Alimentaires**  
**Spécialité : Technologie agroalimentaire**



**Réf : .....**

**Mémoire de Fin de Cycle**  
**En vue de l'obtention du diplôme**

**MASTER**

***Thème***

**Optimisation des paramètres d'encapsulation d'extrait  
enzymatique du navet rouge "*Brassica rapa. L*"**

**Présenté par :**

**DJEBBAR Djouhra & SADELLI Sounia**

**Soutenu le : 30/06/2024**

**Devant le jury composé de :**

Mme. METTOUCHI Epse TAMENDJARI Soraya	MCA	Président
Mme. DAHDOUH Epse AKSAS Amel	MCB	Encadreur
M. BACHIR BEY Mostapha	Pr	Examineur
M. KATI Djamel Edine	Pr	Co-encadreur
M. AKSAS Ali	Pr	Invité

**Année universitaire : 2023/ 2024**

# Remerciement

*Avant tout, nous remercions « Allah » tout puissant qu'il nous a guidé tout au long de nous vie, qu'il nous a donné courage et patience pour passer tous les moments difficiles, qu'il nous a permis d'achever ce travail et de pouvoir le mettre entre vos mains aujourd'hui.*

*Ce mémoire est aujourd'hui l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont collaboré à ce travail.*

*Nous souhaitons remercier vivement en premier lieu notre encadreur **Mme. DAHDOUH Amel** Pour son excellent encadrement, sa vision objective, tout au long de ce mémoire, ses conseils pertinents avec écoute, amabilité et patience nous espérons que Dieu vous gardera toujours.*

*A **Mme. TAMENDJARI Souraya** qui nous a honorés en acceptant d'être Président de ce jury. Nous aimerions profiter l'occasion pour vous remercier tout particulièrement.*

*Notre gratitude, notre profond respect et nos remerciements vont à **M. BACHIR BEY Moustapha** pour avoir accepté d'examiner notre travail. Un grand merci pour **M. KATI Djemel edine** qui a accepté d'être le co-encadreur.*

*Nous tenons à remercier avec toute notre reconnaissance **M. AKSAS Ali** pour sa générosité et son soutien moral, est être présent avec nous. Enfin, nous remercions chaleureusement tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie de nous avoir transmis leurs savoirs le long de notre cycle universitaire.*

*A toutes et à tous qui, de loin ou de près, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.*

*Djouhra & Sounia*

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à mes chers parents, pour leur soutien inconditionnel, leurs sacrifices et leurs amours indéfectibles qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes rêves.*

*A mes sœurs « Dihia, Linda, Lyakout, Mona, Tinhinane Et Katia » pour leurs soutien, confiance et encouragement. Aussi à mon petit frère Mohand.*

*A nos enseignants Mme. DAHDOUH Amel et M. AKSAS pour leur présence et leurs conseils*

*Je remercie tous mes beaux frères*

*Sans oublier ma collègue SADELLI Sounia pour ça patience durant ce travaille*

*Je dédié ce travaille à tous, qui avez été ma source de soutien inébranlable et de motivation*

*Je remercie tous mes amis qui ont partagé cette étape de ma vie avec moi « Lehna, Celia Sarah, Hakima, Nassim, Walid, Haroun et Biki »*

*Djouhra. D*

## *Dédicace*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Dieu pour Sa guidance tout au long de ce travail. Mes sincères remerciements vont également à mes parents, mes deux sœurs « Kenza et Sara » et à mon petit frère Islem.*

*Sans oublier ma collègue DJEBBAR Djouhra et toute sa famille*

*Ainsi qu'à mon encadreur Mme. DAHDOUH Amel et son mari M. AKSAS pour leurs soutien inébranlable et ses conseils précieux.*

*Un merci spécial à mes amis proches et à mon ami à l'étranger Haroun pour leurs soutiens constants et leurs encouragements tout au long de cette aventure académique. Leur soutien a été indispensable et précieux.*

*Sounia. S*

## Liste des abréviations

**FTIR** : Spectrométrie Infrarouge A Transformée De Fourier

**HRP** : Peroxydase De Raifort

**MEB** : Microscopie Electronique A Balayage

**OH** : Radical Hydroxyle

**PLA** : Acide Poly Lactique

**POD** : Peroxydases Végétales

**SOD** : Superoxyde dismutase

**UFC** : Unité Formant Colonie

## Liste des tableaux

<b>Tableau I</b> : Composition analytique moyenne de légume navet.....	<b>6</b>
<b>Tableau II</b> : Différentes applications de la peroxydase végétale.....	<b>11</b>
<b>Tableau III</b> : Différentes techniques d'encapsulation .....	<b>13</b>
<b>Tableau IV</b> : Différents domaines d'application de l'encapsulation .....	<b>15</b>
<b>Tableau V</b> : Facteurs et niveaux pour la méthodologie de surface de réponse de la matrice de conception de Box-Behnken.....	<b>20</b>
<b>Tableau VI</b> : ANOVA pour le temps d'évaporation de solvant, la vitesse d'agitation, le volume de phase ( W/O/W) sur l'efficacité d'encapsulation .....	<b>24</b>
<b>Tableau VII</b> : Coefficient de régression, erreur standard et résultats du test t de la surface de réponse pour l'efficacité d'encapsulation .....	<b>25</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Racine de navet (A) et feuilles de navet (B).....	<b>5</b>
<b>Figure 2</b> : Structure de la peroxydase .....	<b>8</b>
<b>Figure 3</b> : Classification des peroxydases.....	<b>9</b>
<b>Figure 4</b> : Structure tridimensionnelle de la peroxydase .....	<b>10</b>
<b>Figure 5</b> : Schéma de la structure comparative d'une microcapsule et d'une microsphère...	<b>13</b>
<b>Figure 6</b> : Principe d'encapsulation par émulsion/évaporation de solvant .....	<b>14</b>
<b>Figure 7</b> : Graphique des valeurs prédites et expérimentales .....	<b>24</b>
<b>Figure 8</b> : Présentations de la surface de réponse tridimensionnelle.....	<b>27</b>
<b>Figure 9</b> : Images de microscope optique de microcapsules de PLA chargées d'extraits enzymatique du navet .....	<b>28</b>
<b>Figure 10</b> : Distribution de la taille des particules .....	<b>29</b>
<b>Figure 11</b> : Spectres infrarouge à transformée de Fourier du PLA, de l'extrait enzymatique et des microcapsules chargées de l'extrait.....	<b>30</b>
<b>Figure 12</b> : Activité spécifique des peroxydases d'extrait enzymatique du navet et d'extrait enzymatique encapsulé.....	<b>31</b>

# Sommaire

Liste abrégées

Liste des tableaux

Liste des figures

**Introduction .....1**

## Revue Bibliographique

**I. Navet rouge .....4**

1. Historique .....4

3. Origine géographique.....5

4. Classification .....5

5. Composition de navet.....6

6. Composition phytochimique .....7

7. Importance de navet .....7

**II. Peroxydases .....7**

1. Définition.....7

2. Nomenclature (EC) .....8

3. Structure.....8

4. Classification des peroxydases .....8

5. Peroxydases végétales.....9

6. Site actif de la peroxydase végétale .....10

7. Différentes applications des peroxydases végétales .....10

**III. Encapsulation..... 11**

1. Historique .....11

2. Microencapsulation.....12

3. Composition des microcapsules .....12

4. Type des microcapsules .....13

5. Techniques d'encapsulation .....13

7. Domaine d'application de l'encapsulation .....14

## Matériaux et Méthodes

<b>I.</b>	<b>Matériels et produits chimiques .....</b>	<b>17</b>
1.	Produits chimiques.....	17
2.	Appareillage.....	17
3.	Matériel végétal .....	17
<b>II.</b>	<b>Préparation de l'extrait brut .....</b>	<b>17</b>
<b>III.</b>	<b>Détermination de l'activité enzymatique.....</b>	<b>17</b>
<b>IV.</b>	<b>Détermination de la concentration de protéines totales.....</b>	<b>18</b>
<b>V.</b>	<b>Préparation des microcapsules par une double émulsion .....</b>	<b>18</b>
<b>VI.</b>	<b>Optimisation de l'efficacité d'encapsulation avec la méthodologie des surfaces de réponses .....</b>	<b>18</b>
1.	Conception expérimentale.....	18
2.	Construction et validation du modèle.....	19
<b>VII.</b>	<b>Caractérisation des microcapsules.....</b>	<b>20</b>
1.	Calcul de l'efficacité d'encapsulation .....	20
2.	Analyse de la morphologie des microcapsules.....	21
3.	Analyse de la taille des microcapsules .....	21
4.	Analyse par spectroscopie FT-IR.....	21
5.	Calcul de l'activité enzymatique des peroxydases après et avant l'encapsulation .....	21

## Résultats et Discussions

<b>I.</b>	<b>Optimisation de l'efficacité d'encapsulation.....</b>	<b>23</b>
1.	Analyse du modèle.....	23
2.	Analyse de la surface de réponse .....	26
3.	Validation de modèle .....	27
<b>II.</b>	<b>Analyse de la morphologie des microcapsules .....</b>	<b>28</b>
<b>III.</b>	<b>Taille des microparticules .....</b>	<b>28</b>
<b>IV.</b>	<b>Analyse par spectroscopie FT-IR.....</b>	<b>29</b>
<b>V.</b>	<b>Activité enzymatique des peroxydases après et avant l'encapsulation .....</b>	<b>31</b>

<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>Sommaire.....</b>	<b>33</b>
<b>Références Bibliographiques.....</b>		<b>34</b>
<b>Résumé .....</b>		<b>43</b>

# **Introduction**

## **Introduction**

La technologie d'encapsulation a gagné une importance en raison de leur capacité à développer des ingrédients fonctionnels adaptés aux secteurs de l'alimentation et de la santé. L'encapsulation est un processus par lequel des substances sont enfermées à l'intérieur d'un matériel dispersé dans le but de les immobiliser, de les protéger, de les libérer de manière contrôlée et de les rendre fonctionnelles (Vandamme *et al.*, 2007). Elle aide également à préserver l'ingrédient contre les altérations chimiques, physiques ou biologiques, à neutraliser les odeurs potentielles, et à assurer une délivrance précise de l'ingrédient à son lieu d'action. De plus, l'encapsulation améliore la conservation de l'ingrédient et prolonge sa durée de vie dans le produit alimentaire (Dardelle *et al.*, 2012).

Les racines et les feuilles de diverses sous-espèces de navet sont largement utilisées pour leur potentiel inhibiteur de la carcinogénèse, démontrant des activités significatives contre divers types de lignées cellulaires cancéreuses (Sohail *et al.*, 2018). C'est un légume riche en antioxydants reconnus, incluant les vitamines C et E, les caroténoïdes, ainsi que des enzymes antioxydantes telles que la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydase présentes dans les légumes à l'état frais (Singh *et al.*, 2010). Les espèces de *Brassica* possèdent un potentiel anticancéreux grâce à leurs composés bioactifs (Herr & Büchler, 2010). Ces derniers atténuent le stress oxydatif, stimulent la réponse immunitaire, diminuent les risques de cancer et sa gravité, préviennent les mutations et limitent aussi la croissance des cellule cancéreuses (Boivin *et al.*, 2009).

L'intérêt des enzymes en biotechnologie est en hausse en raison de leurs bénéfices économiques et écologiques, qui sont supérieurs à ceux des catalyseurs chimiques (Agostini *et al.*, 2002). Les peroxydases sont largement utilisées en raison de leur importance biologique considérable et de leur exceptionnelle stabilité à la chaleur et aux réactions chimiques (Diao *et al.*, 2019). La superfamille dite « peroxydases de plantes, champignons et bactéries », est composée de protéines présentant toutes une structure tridimensionnelle similaire (Edwards *et al.*, 1993). Les peroxydases produites par les plantes, appartenant à la classe III, jouent un rôle important dans plusieurs aspects physiologiques elles interviennent notamment dans le métabolisme des parois cellulaires, le métabolisme hormonal, la réponse aux stress abiotiques, ainsi que dans les interactions entre les plantes et les micro-organismes pathogènes et les ravageurs (Delannoy *et al.*, 2013). La peroxydase (POD) est souvent employée comme

marqueur biochimique en raison de sa capacité à subir des variations d'activité et de composition (Gaspar *et al.*, 1992).

L'objectif de notre étude est d'encapsuler les peroxydases de l'extrait brut du navet rouge selon quelque paramètre. Pour cela nous avons utilisé le procédé de la microencapsulation en double émulsion dans des particules polymériques, en utilisant l'acide poly lactique (PLA)

Cette étude se divise en trois parties principales :

- La première partie consiste à présenter des généralités sur le navet, les peroxydases, et l'encapsulation.
- La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées pour étudier les conditions optimales qui influencent sur l'efficacité d'encapsulation de l'extrait de navet (la vitesse d'agitation, le temps d'évaporation de solvant et le volume de la phase ( W/O/W) en utilisant système de surface de reponse JMP, utilisation des techniques de caractérisation des microcapsules de l'extrait du navet rouge obtenues de la formulation optimale.
- La troisième partie est consacré à la discussions et interprétation des résultats obtenus.

# **Revue Bibliographique**

## **I. Navet rouge**

### **1. Historique**

Au XIIe siècle, le terme “navet” est apparu sous la forme “Naviet”, dérivant de l’ancien français “Nef” (Araar, 2011). Le navet appartient au genre *Brassica*, de la famille des *Brassicaceae*. *Brassica* regroupe de nombreuses cultures importantes (Sun, 2015).

Autrefois, le navet était un aliment largement consommé et constituait une source vitale de nourriture pour les humains et les animaux dans diverses civilisations anciennes et modernes. Cependant, avec l’introduction de la pomme de terre et du haricot, sa popularité a diminué. Originaire d’Europe, d’Inde et d’Asie centrale, le navet a été cultivé et apprécié pendant des siècles. Aujourd’hui, il est largement utilisé dans le monde entier en tant que source de légumes et d’huile (Paul *et al*, 2019). Les Grecs et les Romains étaient familiers avec de nombreuses variétés de navets (Ménard, 2015). En 1541, Jacques Cartier a introduit le navet en Amérique, où il reste un aliment très consommé en Europe. Cette répartition géographique a donné naissance à deux principales races de navets : la race occidentale, qui se caractérise par ses formes oléagineuses, et la race orientale, qui présente des formes végétales (Paul *et al*, 2019).

Dans les régions de l’Afrique tropicale, la culture de *Brassica rapa* est parfois rapportée comme légume dans de nombreux pays et il est probable qu’elle soit présente dans tous les pays, avec le pétsaï comme variété la plus répandue (Latham, 2014).

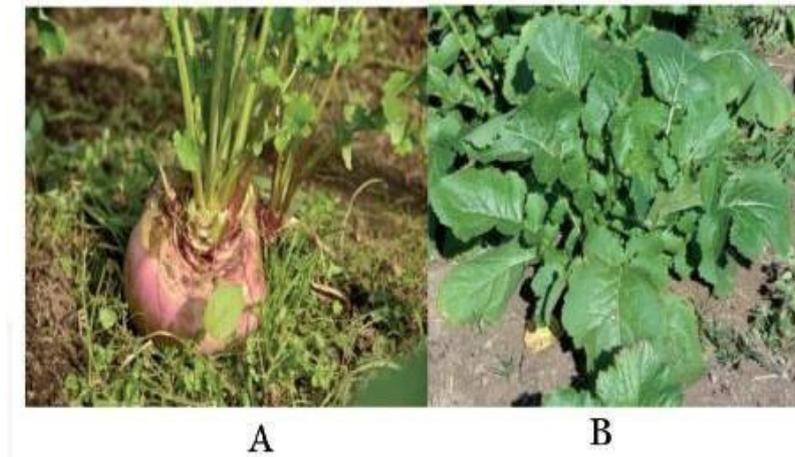
### **2. Description**

Le navet est une plante herbacée bisannuelle cultivée comme légume-racine. Ce légume-racine ne se présente pas comme une véritable racine, mais plutôt comme une « tige enflée qui se développe sous la terre » (Polidoro, 2008).

Ces plantes sont « pratiquement rondes et blanches, avec de fines feuilles rugueuses recouvertes de poils épineux » (Figure 1) (Polidoro, 2008).

- **Feuille** : La plante forme une rosette atteignant une hauteur comprise entre 20 et 40 cm, avec environ quinze feuilles entières ou découpées de forme ovale, recouvertes de poils rugueux (Figure 1B) (Catherine *et al.*, 2008) .
- **Fleur** : Elles sont d'une couleur jaune pâle se présentent en grappes compactes au sommet, ouvertes à l'égalité et au-dessus des bourgeons terminaux, et s'ouvrent vers le haut à partir de la base du racème (tela, 2013).

- **Racine** : Le navet est planté pour ses racines charnues, qui peuvent être allongées ou rondes, et il est utilisé à la fois comme légume et comme aliment pour le bétail (Figure 1A) (tela, 2013).



**Figure 1** : Racine de navet (A) et feuilles de navet (B) (M. Cartea et al., 2021).

### 3. Origine géographique

*Brassica rapa* se rencontre sur l'ensemble des continents, avec une prédominance dans les régions tempérées et à des altitudes plus élevées dans les régions subtropicales (Acevedo & Strong, 2012). Ils sont largement cultivés dans de nombreuses régions du monde. Ont été cultivés pour la première fois en Asie ensuite répandus en Europe et dans d'autres régions du monde grâce aux échanges commerciaux et aux migrations humaines (Ignatov, 2008). Typiquement, on trouve le *Brassica rapa* dans les basses terres côtières, ainsi que dans les régions montagneuses à haute altitude et les zones alpines des hautes sierras.

### 4. Classification

Le genre *Brassica*, également connu sous le nom de crucifères, est le plus important de la famille des *Brassicacées* (Sanlier & Guler, 2018)

La classification botanique du navet est donnée comme suit :

- **Règne** : Plantae.
- **Domaine** : Eukaryota.
- **Classe** : Magnoliopsida.
- **Ordre** : Capparales.
- **Famille** : Brassicacées.
- **Sous-famille** : Brassicoideae.
- **Genre** : Brassica.

## 5. Composition de navet

Le navet, un légume racine, est reconnu par sa richesse en nutriments et en composés phytochimiques qui favorisent la santé. Sa composition chimique se caractérise par les éléments décrits dans le tableau I.

**Tableau I :** Composition analytique moyenne de légume navet par 100 g (Araar, 2011)

Nutriment	Navet cru	Feuilles de navet crues
Eau (g)	91.87	91.07
Energie (Cal)	27	27
Protéine (g)	0.9	1.5
Lipides totaux (g)	0.1	0.3
Glucides (g)	6.23	5.73
Fibres totales (g)	1.8	3.2
Minéraux		
Calcium (mg)	30	190
Fer (mg)	0.3	1.1
Magnésium (mg)	11	31
Sodium (mg)	67	40
Phosphore (mg)	27	42
Potassium (mg)	191	296
Zinc (mg)	0.27	0.19
Cuivre (mg)	0.085	0.35
Manganèse (mg)	0.134	0.466
Vitamines (mg)		
Vitamine C	21	60
B-1(thiamine)	0.04	0.07
B-2(riboflavine)	0.03	0.1
B-3(niacine)	0.4	0.6
B-5(acide pantothénique)	0.2	0.38
B-6(pyridoxine) (mg)	0.09	0.263
Acide folique (mcg)	15	194
Vitamine A (I.U)	0	7600
Vitamine E (mcg ATE)	0.03	2.9
B-12 (mcg)	0	0
Vitamine A (mcg RE)	0	760

## **6. Composition phytochimique**

La composition phytochimique du navet contient une variété de composés végétaux bénéfiques pour la santé, notamment des glucosinolates, des polyphénols, des caroténoïdes et des flavonoïdes (Kapusta-Duch et al., 2012). 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., 2011).

## **7. Importance de navet**

- Les glucosinolates présents dans le navet sont associés à des propriétés anticancéreuses. De plus la vitamine C aider à prévenir la croissance et la propagation des cellules cancéreuses (Kapusta-Duch et al., 2012b).
- La vitamine C protège le corps contre les dommages causés par les radicaux libres et améliore l'absorption du fer. Elle contribue également à la régulation du cholestérol sanguin (Kapusta-Duch et al., 2012b).
- Le navet contient des nutriments essentiels pour la santé osseuse, tel que le calcium et le phosphore (Ariane, 2019).
- Ses composés peuvent aider à réduire la pression artérielle et à protéger les vaisseaux sanguins (Bazzano *et al.*, 2003).
- Il est faible en calories et riche en fibres, ce qui favorise une digestion saine et peut aider à la perte de poids (Ariane, 2019).
- La vitamine A présente dans les feuilles du navet est essentielle pour la vision et la santé de la peau (Ariane, 2019).

## **II. Peroxydases**

### **1. Définition**

Les peroxydases sont un groupe d'enzyme qui catalyse l'oxydation d'un substrat par peroxyde d'hydrogène ou un peroxyde organique. La plupart des peroxydases sont des protéines de l'hème ferrique qui renferment de la ferriprotoporphyrine IX en tant que cofacteur et du calcium (Takabe *et al.*, 2001). Elles sont principalement localisées dans la paroi cellulaire et participent activement à divers processus tels que la croissance, le développement et la défense des plantes (El Mansouri *et al.*, 1999). Elles font partie des

enzymes oxydoréductases leur fonction principale est de catalyser des réactions dans lesquelles  $H_2O_2$  est l'accepteur d'atomes d'hydrogène, ce qui leur permet de fournir une protection vitale contre le stress oxydatif.

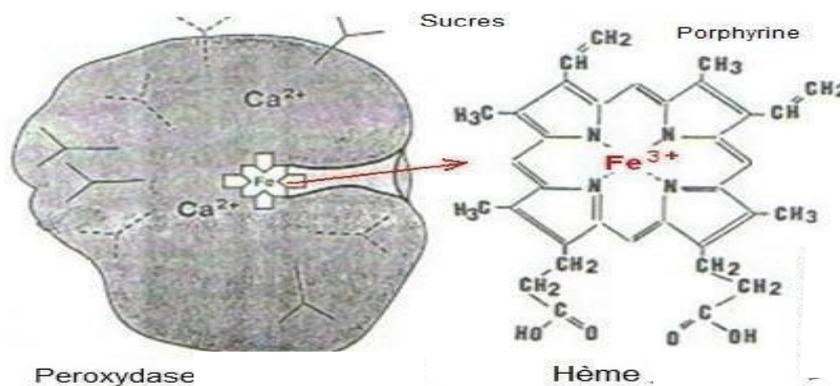
## 2. Nomenclature (EC)

La nomenclature EC est un système de classification des enzymes basé sur les réactions chimiques spécifiques qu'elles catalysent (Delannoy *et al.*, 2013). Le code EC de la peroxydase est (EC : 1.11.1.7), appelées aussi peroxydase de classe III (Nisha Rani & Emilia Abraham, 2006) qui est structuré de la manière suivante :

- 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.

## 3. Structure

Les peroxydases sont constituées d'une chaîne polypeptidique qui inclut un groupe prosthétique de type hème (Nnamchi *et al.*, 2016). Cette structure distinctive qui leur confère leurs propriétés catalytiques (Figure 2).

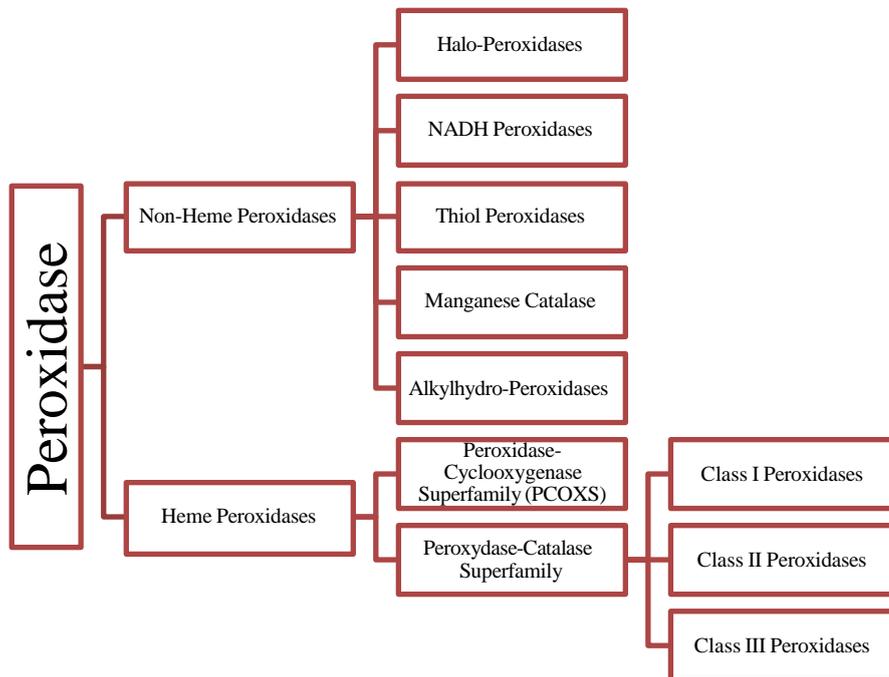


**Figure 2** : Structure de la peroxydase (Baaziz, 2018)

## 4. Classification des peroxydases

Il n'existe pas une unique peroxydase mais plutôt une diversité de peroxydase, car ce type d'enzyme est présent chez quasiment tous les êtres vivants, incluant les animaux, les végétaux, ainsi que les microorganismes tels que les champignons et les bactéries, elles sont

absentes uniquement chez les anaérobies stricts, qui considèrent l'oxygène moléculaire comme un toxique (Nagai *et al.*, 2002).

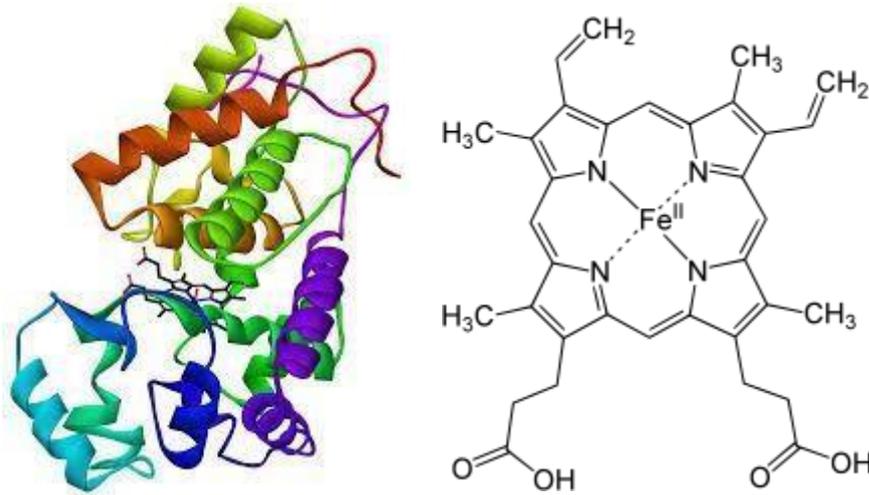


**Figure 3** : Classification des peroxydas (Pontsho *et al.*, 2020)

Les peroxydases sont classifiées en deux superfamilles (Figure 3) selon leur séquence en acides aminés (Welinder, 1992). La première catégorie comprend les peroxydases spécifiques aux animaux, tandis que la seconde englobe celles trouvées chez les plantes, les champignons et les bactéries. Ce dernier est divisé en 3 classes : la classe I regroupe les peroxydases d'origine bactérienne avec une activité catalase ; la classe II comprend les peroxydases sécrétées (extracellulaires) par les champignons, comme la lignine/manganèse peroxydase ; la classe III est constituée des peroxydases sécrétées par les plantes, parmi lesquelles la plus étudiée est la peroxydase de type HRP.

## 5. Peroxydases végétales

Elles sont des protéines glycosylées qui contiennent de l'hème, formant ainsi des hémoglycoprotéines. Leur structure se caractérise par la présence d'un hème central, situé entre le domaine distal (extrémité N-terminale) et le domaine proximal (extrémité C-terminale) de la protéine. Ainsi, l'hème agit en tant que groupement prosthétique de l'enzyme, tandis que la chaîne polypeptidique constitue l'apoenzyme (Figure 4) (Henriksen *et al.*, 1998).



**Figure 4 :** Structure tridimensionnelle de la peroxydase (Veitch, 2004)

## 6. Site actif de la peroxydase végétale

Le site actif de la peroxydase est principalement centré autour de l'hème, une protoporphyrine IX liée à un atome de fer ferrique  $Fe^{3+}$ . Lorsque l'enzyme est au repos, cet atome de fer ferrique établit quatre liaisons avec des atomes d'azote de la protoporphyrine et une liaison avec le groupement imidazole de l'histidine 170. Du côté distal de l'hème, trois acides aminés conservés (arginine 38, phénylalanine 41 et histidine 42) permettent la fixation du peroxyde d'hydrogène et jouent un rôle catalytique crucial. Ces quatre acides aminés se situent sur deux hélices  $\alpha$  en parallèle au plan de l'hème : l'hélice B (Arg 38, Phe 41 et His 42) et l'hélice F (His 170). Une aspartate (Asp 247) assure une liaison hydrogène avec l'histidine 170 du côté proximal, jouant un rôle clé dans le mécanisme de la réaction catalytique de la peroxydase (Delannoy *et al.*, 2013).

## 7. Différentes applications des peroxydases végétales

Les peroxydases ont une place importante dans tous les secteurs industriels, le tableau II montre les différentes applications :

**Tableau II** : Différentes applications de la peroxydase végétale (Sbaihi, 2021).

Domaine	Application
Environnement	-Catalyseurs dans la bio remédiation des composés phénoliques à savoir le traitement des eaux usées contenant des composés phénoliques et des amines aromatiques.
Biochimie médicale	-La préparation d'une enzyme conjuguée à un anticorps et son utilisation dans les kits de diagnostic.
Industrie alimentaire	-Estimation du lactose en immobilisant la $\beta$ -galactosidase, la galactose-oxydase et HRP sur un support polymérique. -Elles sont également utilisées comme indicateurs dans le blanchiment des légumes. -Elle peut être utilisé comme inhibiteur de production de gaz dans l'industrie du fromage.
Biologie moléculaire	-Fabrication des sondes d'ADN et d'ARN. -Marqueur de croissance et de différenciation des tissus et de divers stress biotiques et abiotiques.
Textile	-Utilisées pour contrôler la coloration des vêtements.
Production de polymères	-Production de la lignine.
Industrie du papier	-Le blanchiment de la pulpe à papier et la biodégradation de la lignine.

### **III. Encapsulation**

#### **1. Historique**

L'encapsulation a été découverte aux années 1950 lors de la recherche de matériaux muraux sensibles à la pression pour la production de papier autocopiant (Xu *et al.*, 2024). Et en 1970 ont commencé son utilisation dans le domaine alimentaire (Calderón-Oliver & Ponce-Alquicira, 2022) cette technique est de plus en plus utilisée dans l'industrie alimentaire pour protéger, stabiliser et libérer des composés actifs, tels que des arômes, des colorants, des vitamines ou des additifs, de manière contrôlée. Cette approche permet d'améliorer la qualité, la sécurité et la durée de conservation des aliments, tout en offrant de nouvelles possibilités de formulation et de présentation des produits (Agriopoulou *et al.*, 2023).

## **2. Microencapsulation**

Le concept de la microencapsulation englobe toutes les méthodes utilisées pour fabriquer des microparticules d'un diamètre compris entre 0,2 et 5 000  $\mu\text{m}$  (Calderón-Oliver & Ponce-Alquicira, 2022). Elles sont souvent sphériques ou ovoïdales (Benoit *et al.*, 2000). On distingue trois types selon la taille des microparticules obtenue : microencapsulation (entre 1 $\mu\text{m}$  et 1mm), nanoencapsulation (10<sup>ème</sup> – 100<sup>ème</sup> de nm) ou minigranule (>1mm) (Faure, 2023).

L'intérêt de la microencapsulation réside dans sa capacité à protéger la matière active : elle est nécessaire pour isoler le composé actif de son environnement dans certaines situations, telles que pour préserver les vitamines des effets dégradants de l'oxygène, retarder l'évaporation d'une matière active volatile, améliorer les caractéristiques de manipulation des matériaux collants ou protéger un noyau réactif d'une attaque chimique. Dans d'autres situations, il ne s'agit pas d'isoler totalement le composé actif, mais de réguler la vitesse à laquelle il sort de la microcapsule, comme dans le cas de la libération contrôlée de médicaments ou de pesticides. Il est possible que le problème soit aussi simple que de dissimuler le goût ou l'odeur du noyau, ou aussi complexe que d'accroître la sélectivité d'un processus d'adsorption ou d'extraction (Agnihotri *et al.*, 2012).

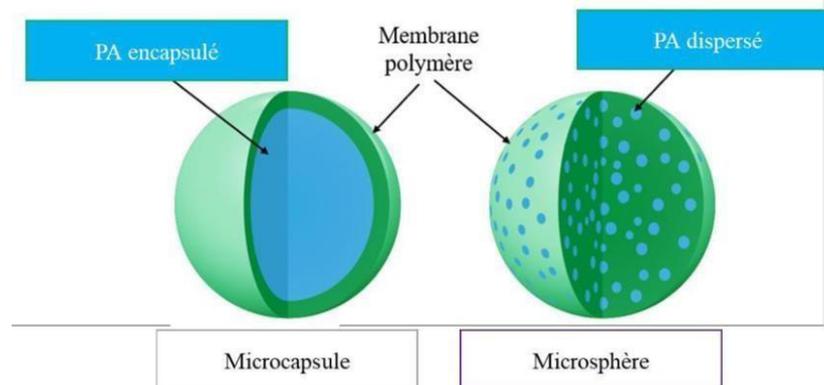
## **3. Composition des microcapsules**

La substance encapsulée peut être appelée matériau central, agent actif ou phase interne (Agriopoulou *et al.*, 2023). Elle peut avoir une composition différente, telle que le noyau liquide peut contenir des matériaux dispersés et/ou dissous. Les composants actifs, stabilisants, diluants, excipients, ainsi que des retardateurs de libération ou des accélérateurs sont présents dans le noyau solide (Omar *et al.*, 2019).

Il est nécessaire de disperser le matériau à encapsuler dans une solution aqueuse contenant un poly électrolyte chargé négativement, puis d'introduire une solution aqueuse contenant le second polymère (charge opposée) dans l'émulsion (Faure, 2023). Cette dernière peut être définie par un revêtement, une membrane, une coquille, un matériau de support, un matériau de paroi, une phase externe ou une matrice (Agriopoulou *et al.*, 2023), cette matrice doit contenir les propriétés suivantes : stabilise la matière active, inerte envers les matières actives, présente une libération contrôlée dans des conditions spécifiques ; filmogène, souple, insipide, stable ; non-hygroscopique, pas de viscosité élevée, économique ; soluble dans un milieu aqueux ou un solvant, ou fondant ; flexible, fragile, dur, mince, etc... (Omar *et al.*, 2019).

#### 4. Type des microcapsules

Deux catégories de microparticules sont distinctes par leur structure microsphérique : la microcapsule, une particule sphérique de type cœur-membrane où la substance active est contenue dans le cœur et la membrane de l'agent encapsulant qui forme l'enveloppe solide ; et la microsphère, un réseau polymère où la substance active est dispersée à l'état moléculaire ou particulaire (structure dite matricielle) (Figure 5) (Hamounic & Pino, 2011).



**Figure 5 :** Schéma de la structure comparative d'une microcapsule et d'une microsphère (Charaabi, 2020).

#### 5. Techniques d'encapsulation

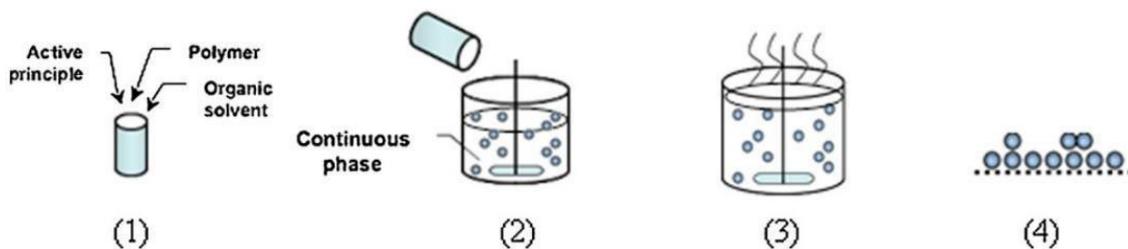
Il existe plusieurs techniques de l'encapsulation, et on peut les distinguer selon le type de procédé utilisé (Tableau III) :

**Tableau III :** Différentes technique d'encapsulation (Finch & Bodmeier, 2000).

Type de procédé	Technique d'encapsulation.
Procédé physico-chimique	Séparation de phase ou coacervation.
	Evaporation-extraction de solvant.
	Gélification thermique d'émulsions.
Procédé mécanique	Nébulisation /séchage.
	Gélification ou congélation des gouttes.
	Enrobage en lit fluidisé.
	Extrusion/Sphéronisation.
	Lyophilisation (Freeze drying).
Procédés chimiques	Polymérisation interfaciale.
	Polymérisation en milieux dispersés par voie radicalaire ou anionique.
	Nébulisation/ séchage.

## 6. Encapsulation par émulsion/évaporation de solvant

La méthode d'encapsulation par émulsion-évaporation de solvant permet une libération d'agent actif contrôlée et présente de nombreux avantages cliniques (Omar *et al.*, 2019) la figure 6 montre les étapes de la technique. Il est possible de dissoudre ou de disperser l'agent à encapsuler dans une phase organique composée d'un polymère (généralement hydrophobe) solubilisé dans un solvant organique volatil (1). Dans une phase dispersante aqueuse, la solution organique (solvant + matière encapsulée + polymère) est émulsionnée en agitation, ce qui entraîne une mauvaise qualité de solvant pour le polymère. On stabilise l'émulsion en ajoutant des tensio-actifs (2). Après avoir stabilisé l'émulsion, le solvant se disperse progressivement dans la phase dispersante en agitation, puis s'évapore (3). Enfin, le polymère est encapsulé soit par l'accumulation de gouttelettes formant des microsphères, soit par la migration des chaînes de polymère à l'interface des gouttelettes, créant ainsi des particules (microcapsules) (Faure, 2023).



**Figure 6** : Principe d'encapsulation par émulsion/évaporation de solvant (Faure, 2023)

## 7. Domaine d'application de l'encapsulation

De nombreuses applications sont envisagées en fonction des molécules encapsulées : agriculture, santé, industrie etc...(Finch & Bodmeier, 2000). Le tableau IV montre quelques exemples de composés encapsulés selon le domaine d'application (Finch & Bodmeier, 2000).

**Tableau IV** : Différents domaines d'application de l'encapsulation.

<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...

# **Matériel et Méthodes**

## **I. Matériels et produits chimiques**

### **1. Produits chimiques**

Guaiacol (2-méthoxyphénol), le dichlorométhane (DCM), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hydroperoxyde), Albumine sérique bovine (BSA), bleu de comassie R250 (Bio-Rad), acide poly-lactique (PLA ; PM : 150000 g/mol, densité : 1,21 g/cm<sup>3</sup>) l'alcool éthanol à 95%, acide phosphorique (acide orthophosphorique) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, l'alcool polyvinylique (PVA ; PM, 13 000–23 000g/mol), acide citrique C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> (0.5M), sodium phosphate Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.5M).

### **2. Appareillage**

Ultra turrax est utilisé pour préparer le mélange de l'extrait brut du navet rouge (IKA T18 basic, Allemagne) ; spectrophotomètre UV-visible pour la détermination de l'activité enzymatique et d'autres dosages (Shimadzu UV-2700 ; Kyoto, Japon) ; centrifugeuse pour la séparation des phases des extraits (NUVE SANAYI, Turquie) ; un microscope optique pour analyser la morphologie des microcapsules ; étuve de séchage et de chauffage est utilisé pour le séchage de l'extrait brut (78532 Tuttlingen /Germany).

### **3. 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 à l'eau courante pour éliminer les traces de poussière. Les tiges ont ensuite été séparées des racines pour les utiliser dans cette étude.

## **II. Préparation de l'extrait brut**

200 g de racines de navet rouge a été homogénéisée par ultra-turrax, dans 400 mL du tampon phosphate citrate, puis le mélange a été filtré pour éliminer les grandes particules solides du navet. Par la suite on centrifuge le filtrat et on obtient le surnageant (l'extrait brut) qui est riches en peroxydases.

## **III. Détermination de l'activité enzymatique**

L'activité peroxydase peut être évaluée en suivant la méthode de Łobarzewski, qui consiste à mesurer l'absorbance du tétra-gaiacol à 470 nm ( $\lambda_{470 \text{ nm}} = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible, en présence de gaiacol et de peroxyde d'hydrogène pendant 1 min (Łobarzewski *et al.*, 1990). L'activité enzymatique a ensuite été calculée selon la formule suivante :

$$n\text{Kat/gMF} = \frac{\Delta DO \times V_r \times V_e}{\Delta t \times P \times \lambda \times I \times MF}$$

$\frac{DO}{\Delta t}$  : Pente de la courbe de l'activité peroxydase ;  $V_r$  : volume réactionnel ;  $V_e$  : volume d'essai ;  $P$  : prise d'essai ;  $\epsilon$  : coefficient d'extinction moléculaire ;  $I$  : longueur de la cuve (1cm) ;  $MF$  : Masse de la matière fraîche.

#### **IV. Détermination de la concentration de protéines totales**

La concentration en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Pour cela, 1000  $\mu$ L de l'extrait ont été mélangés avec 2500  $\mu$ L du réactif de Bradford. Après agitation, le mélange a été laissé incuber pendant 10 minutes à l'obscurité. Le sérum albumine bovine (BSA) a été utilisé comme standard, et les absorbances ont été mesurés à 595 nm. La teneur en protéines est exprimée en mg d'équivalent BSA pour 100 g de matière fraîche.

#### **V. Préparation des microcapsules par une double émulsion**

Après la préparation de l'extrait brut, on prépare les microcapsules par une double émulsion. Le dichlorométhane a été ajouté avec l'acide poly lactique dissout (PLA). La solution d'alcool polyvinylique (PVA) (0,1-3%) a été ajoutée à cette émulsion primaire (W1/O) en tant qu'émulsifiant. On a réussi à obtenir une double émulsion stable (W1/O/W2) en agitation continue (400 tr/min) pendant une nuit. Après avoir réalisé trois lavages à l'eau distillée, nous avons séparé les microcapsules obtenues par centrifugation à 5000 tours par minute pendant 15 min, puis nous les avons séchées.

#### **VI. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation avec la méthodologie des surfaces de réponses**

##### **1. Conception expérimentale**

Dans cette partie, nous avons utilisé le plan expérimental de Box-Behnken, comprenant trois variables et trois niveaux factoriels. Les variables indépendantes étaient le temps ( $x_1$  en heures), la vitesse ( $x_2$  en tours/min) et le volume des phases (W/O/W) ( $x_3$  en mL), tandis que la variable dépendante était l'efficacité d'encapsulation. Les résultats de l'optimisation de l'efficacité d'encapsulation par méthodologie de séquence ont été utilisés pour déterminer les niveaux des trois paramètres : le temps (1-16 heures), la vitesse (100-1000 tours/min) et le volume (6-60 ml) pour l'optimisation avec la méthode de surface de réponse (RSM).

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

Les données expérimentales ont ensuite été ajustées au modèle de régression sélectionné afin de bien comprendre la corrélation entre chaque facteur et les différentes réponses. Les conditions optimales de l'efficacité d'encapsulation de l'extrait brut du navet dépendaient du temps, du volume et de la vitesse, ces valeurs des trois paramètres ont été obtenues en utilisant l'équation prédictive de la RSM. Les valeurs expérimentales et prédites des réponses ont été comparées pour déterminer la validité du modèle. Une méthodologie de surface de réponse, basée sur un plan Box-Behnken (BBD), a été mise en œuvre pour optimiser la détermination de l'efficacité d'encapsulation. Les niveaux des facteurs ont été codés comme suit : + (faible), 0 (point central) et - (élevé). La conception expérimentale a été réalisée en double, et les résultats de 15 essais sont présentés dans le tableau V.

**Tableau V** : 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	Configurations	Les paramètres		
		X1	X2	X3
1	-0-	1	550	6
2	-0	1	100	33
3	000	8,5	550	33
4	+0+	16	550	60
5	0++	8,5	1000	60
6	-0+	1	550	60
7	000	8,5	550	33
8	+0-	16	550	6
9	0-	8,5	100	6
10	-+0	1	1000	33
11	0+-	8,5	1000	6
12	000	8,5	550	33
13	+0	16	100	33
14	0+	8,5	100	60
15	++0	16	1000	33

*X1 le temps d'évaporation de solvant (h) ; X2 la vitesse d'agitation (tours/min) ; X3 Le volume de la phase (W/O/W) (mL).*

## **VII. Caractérisation des microcapsules**

### **1. Calcul de l'efficacité d'encapsulation**

Selon Davda et Labhasetwar (2002), le taux d'efficacité d'encapsulation a été calculé en utilisant le pourcentage de la différence de concentration initiale en protéines (CP<sub>0</sub>) ajoutée à la formulation, en excluant la concentration de protéines non encapsulées (CPS) présentes dans le surnageant (Davda & Labhasetwar, 2002). Ainsi, les microcapsules, prélevées du surnageant après le lavage, ont été analysées pour évaluer la concentration en protéines en utilisant la méthode de Bradford. L'équation ci-dessous a été employée afin de déterminer l'efficacité d'encapsulation (EE) :

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

## **2. Analyse de la morphologie des microcapsules**

La morphologie des microcapsules a été observée sous le microscope optique (avec l'objectif 10×10, 10×40 et 10×100).

## **3. Analyse de la taille des microcapsules**

La forme des microcapsules a été déterminée à l'aide d'un granulomètre laser Analysette 22"NanoTec (Fritsch, Allemagne). Le Span, une valeur mathématique indiquant la distribution des dimensions, a été calculée comme  $= d(0,88) - [d(0,16) / d(0,47)]$  ; où  $d(0,16)$ ,  $d(0,47)$  et  $d(0,88)$  correspondent, respectivement, à un diamètre de particules à 16 %, 47 % et 88 % de la distribution accumulée de l'échantillon. Cette mesure a été effectuée après la dispersion des microcapsules dans de l'eau distillée, en utilisant les valeurs d'indices de réfraction de l'eau équivalentes à 1,33. La portée, qui est une valeur mathématique représentant la largeur de la distribution granulométrique, a été calculée comme suit :

$$P = [(0,88) - \frac{d(0,16)}{d(0,47)}]$$

## **4. Analyse par spectroscopie FT-IR**

FT-IR (Fourier Transformed Infra Red) (spectromètre IR Affinity-1 CE, Shimadzu, Japon) cette technique est basée sur l'absorbance d'un rayonnement infrarouge dans le but d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans l'extrait et les microcapsules via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons. Le spectre de transmittance a été enregistré en balayant dans la longueur d'onde de 400 à 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

## **5. Calcul de l'activité enzymatique des peroxydases après et avant l'encapsulation**

Afin de calculer l'activité enzymatique des extraits bruts encapsulés et non encapsulés de navet rouge 1000  $\mu\text{L}$  d'extrait brut ont été ajoutés à un volume de 5 mL de solution tampon phosphate (pH 6) et 100 mg des microcapsules ont été dissous dans 5 mL de dichlorométhane. Les solutions ont été doucement agitées pendant 10 min.

L'activité enzymatique a été déterminée selon la méthode de Łobarzewski et al (Łobarzewski *et al.*, 1990), en utilisant 980  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel contenant 25  $\mu\text{L}$  de gaïacol (45 mM), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (22,5 mM) et 25 mL de solution tampon de phosphate de citrate (0,5 M) en plus de 20  $\mu\text{L}$  d'extrait brut. Les absorbances ont été mesurées à 470nm par un spectrophotomètre UV-vis.

# **Résultats et Discussions**

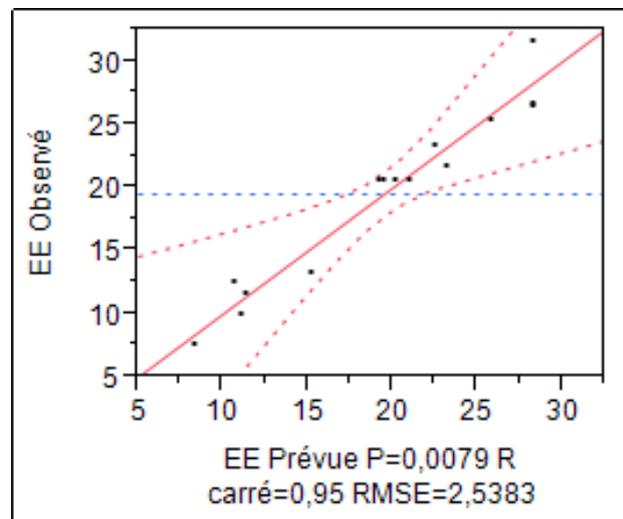
## I. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation

Le but de cette étude est de déterminer les conditions optimales qui influencent sur le taux d'encapsulation de l'extrait du navet rouge, pour cela nous avons utilisé un plan d'expérience de type Box-Behnken à trois facteurs (X1, X2 et X3) et trois niveaux (-1 0 +1), en fixant comme réponse le taux d'encapsulation et cela à l'aide de logiciel JMP appliqué pour l'analyse de tous les résultats.

### 1. Analyse du modèle

La validation du modèle quadratique a été vérifiée à l'aide du diagramme de parité comparatif entre les valeurs prédites et expérimentales (Figure 7). Une droite de corrélations entre celles-ci a été obtenue avec un coefficient de détermination qui est proche de 1,  $R^2 = 0,95$  et le coefficient de détermination ajusté également élevé  $R^2_{aj} = 0,87$  qui témoignent et confirment une bonne adéquation du modèle de régression. La différence entre les taux d'encapsulation expérimentales et ceux prédits par le modèle qui sont les résidus sont tracés en fonction des valeurs prédites.

D'après la figure 7, les points étant tous très proches de la droite, on conclut que le modèle prévoit correctement l'efficacité d'encapsulation en fonction des facteurs choisis.



**Figure 7** : Graphique des valeurs prédites et expérimentales.

Une analyse de la variance a été fournie par le logiciel JMP, afin de valider le modèle obtenu, qui étudie le taux d'encapsulation de l'extrait du navet rouge dans les microparticules de PLA. Les résultats des évaluations statistiques ANOVA de la variance sont résumés dans le tableau VI.

Selon les résultats du tableau VI, il est démontré que le modèle quadratique a obtenu des performances satisfaisantes en termes d'efficacité d'encapsulation, avec un coefficient de corrélation (R2) de 0,95, tandis que la valeur R2 ajustée correspondante est de 0,87. Avec une valeur de F (687,80). Selon la littérature, le modèle est dit significatif lorsque la valeur de P est petite et celle de F est grande (Azouz et al., 2016). Le modèle de régression linéaire présente une grande signification. Ces résultats indiquent que ces facteurs ont une influence significative sur les valeurs de la réponse (EE). De plus, le coefficient de régression est significatif, ce qui signifie que le modèle mathématique est statistiquement acceptable.

**Tableau VI** : ANOVA pour le temps d'évaporation de solvant, la vitesse d'agitation, le volume de la phase (W/O/W) sur l'efficacité d'encapsulation

<i>Source</i>	<i>DF</i>	<i>Sommes des carrés</i>	<i>Rapport Fraction</i>	<i>Prob.&gt; F</i>
X1	1	52,1731	8,0980	0,036*
X2	1	0,6903	0,1071	0,7567
X3	1	163,8050	25,4248	0,004*
X1*X2	1	100,0000	15,5214	0,011*
X1*X2	1	32,6612	5,0695	0,0741
X2*X3	1	0,6806	0,1056	0,7583
X1*X1	1	55,5616	8,6239	0,0324*
X2*X2	1	155,0016	24,0584	0,0045*
X3*X3	1	138,3685	21,4767	0,0057*
Model	9	655,59	11,3064	0,0079*
Défaut d'ajustement	3	15,096375	0,588	0,6792
R2= 0,95				
AdjR2 = 0,87				

*X1 le temps d'évaporation de solvant (h) ; X2 la vitesse d'agitation (tours/min) ; X3 Le volume de la phase ( W/O/W) (mL).*

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

On a employé la méthode Box-Behnken de la surface de réponse (MSR) afin d'améliorer l'encapsulation de l'extrait brut en changeant le temps, la vitesse d'agitation et le volume du polymère PVA, en utilisant une double émulsion. Les conclusions présentées dans le tableau VII ont montré que l'efficacité de l'encapsulation variait de 7,5 % à 31,65%. Le tableau VII présente l'analyse de la variance du modèle, l'absence d'ajustement et le coefficient de régression de l'efficacité d'encapsulation. Une valeur P de 0,0079 a été observée

lors de l'ajustement global, ce qui indique la signification du modèle développé. La valeur élevée du coefficient de détermination (R2) et le défaut d'ajustement (0,97) non significatif ( $p < 0,05$ ) indiquent que le modèle est valide. On a ajusté les valeurs mesurées dans un modèle quadratique pour obtenir une régression mathématique adéquate. Le coefficient de régression des termes d'interception, linéaire, quadratique et d'interaction du modèle a été déterminé en utilisant la méthode des moindres carrés, comme le montre le tableau VII. On observe une signification des termes linéaires et quadratiques des trois facteurs, ainsi que des termes d'interaction de Temps-Vitesse ( $p < 0,05$ ), tandis que les termes d'interaction de Temps-Volume et Vitesse-Volume n'étaient pas significatifs. Les résultats obtenus ont été ajustés dans un modèle quadratique pour obtenir une régression mathématique adéquate. Les termes linéaires ont également été observés avoir un impact positif sur l'efficacité d'encapsulation, tandis que les termes quadratiques ont un impact négatif sur la réponse. Cela suggère que l'efficacité d'encapsulation augmentait avec l'augmentation de deux facteurs (le temps d'évaporation du solvant et le volume de la phase W/O/W), mais diminuait à des valeurs élevées de ces facteurs. Le modèle quadratique ajusté pour l'efficacité d'encapsulation dans les variables codées est donné dans l'équation :

$$EE = 28,27 + 2,55x_1 + 4,53x_3 - 5x_1x_2 - 3,88x_1^2 - 6,48x_2^2 - 6,12x_3^2$$

*X1 le temps d'évaporation de solvant (h) ; X2 la vitesse d'agitation (tours/min) ; X3 Le volume de la phase ( W/O/W) (mL) ; EE l'efficacité d'encapsulation (%).*

**Tableau VII :** Coefficient de régression, erreur standard et résultats du test t de la surface de réponse pour l'efficacité d'encapsulation.

Paramètres	Estimation	Erreurs standards	Rapport t	Prob.> t
Constante	28,27	1,47	19,29	<,0001*
X1	2,55	0,90	2,85	0,036*
X2	-0,29	0,90	-0,33	0,7567
X3	4,53	0,90	5,04	0,004*
X1*X2	-5,00	1,27	-3,94	0,011*
X1*X3	-2,86	1,27	-2,25	0,0741
X2*X3	-0,41	1,27	-0,33	0,7583
X1*X1	-3,88	1,32	-2,94	0,0324*
X2*X2	-6,48	1,32	-4,9	0,0045*
X3*X3	-6,12	1,32	-4,63	0,0057*

*X1 le temps d'évaporation de solvant (h) ; X2 la vitesse d'agitation (tours/min) ; X3 Le volume de la phase ( W/O/W) (mL).*

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

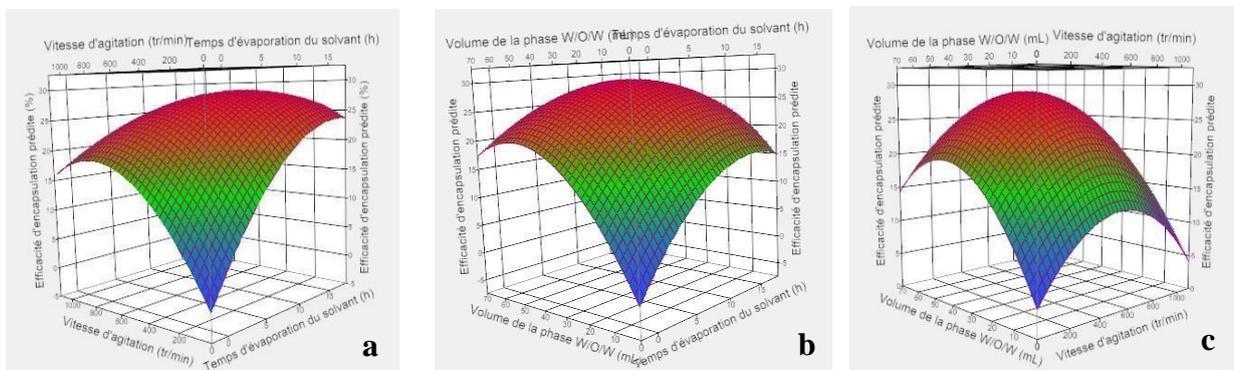
## **2. Analyse de la surface de réponse**

Afin d'illustrer l'interaction entre les trois variables étudiées et l'efficacité d'encapsulation (%), la figure 8 montre les tracés graphiques de la surface tridimensionnelle du modèle. Le temps d'élimination du solvant est la durée pendant laquelle le solvant organique de la phase dispersée s'évapore de la phase continue, suite à la solidification des gouttelettes pour former des microcapsules (M. Li *et al.*, 2008). L'efficacité d'encapsulation des microcapsules à différents moments d'élimination du solvant sont représentées sur la figure 8a et 8b. Dans cette étude, le temps optimal pour l'élimination du solvant a été obtenu à 8 heures et 30 min.

L'efficacité d'encapsulation des microcapsules était également affectée par le temps d'élimination du solvant lorsque la phase organique était dispersée dans la phase aqueuse. Si les gouttelettes se trouvaient dans la phase continue pendant une période plus longue, le principe actif pourrait être facilement séparé de la surface des gouttelettes non précipitées vers une phase aqueuse continue, ce qui entraînerait une diminution de la concentration de principe actif contenu dans les microcapsules (Tiwari & Verma, 2011). Par conséquent, l'efficacité d'encapsulation dans le temps d'élimination du solvant de 16 heures était inférieure à 8 heures et 1 heure. De plus, l'efficacité d'encapsulation à 1 heure était inférieure à 8 heures car les microcapsules n'étaient pas entièrement solidifiées. Ainsi, l'extrait s'est libéré et a entraîné une diminution de l'efficacité d'encapsulation. La taille des particules des microcapsules produites à différents temps d'élimination du solvant a légèrement diminué parallèlement au temps d'élimination du solvant plus long.

L'effet de la vitesse d'agitation et du volume du milieu réactionnel sur la réponse est donné dans la figure 8 (c) qui indique que les deux facteurs ont influencé ensemble l'efficacité d'encapsulation. Ces derniers ont augmenté jusqu'à atteindre la vitesse d'agitation de 550 tr/min et le volume de 33mL qui induit l'augmentation de l'efficacité d'encapsulation au maximum (28,27%) et ont ensuite diminué. La vitesse d'agitation a un rôle essentiel dans la forme des microparticules. Pendant la formation des gouttelettes, la vitesse d'agitation détermine la taille des microparticules de telle sorte qu'une augmentation dans la vitesse résulte une diminution de taille des particules (Tiwari & Verma, 2011).

Le volume de la phase interne est augmenté, une fine couche de phase (chlorure de méthylène) se forme et agit comme barrière pour diffusion de l'extrait vers la phase aqueuse. Maintenant, plus la phase organique est fine, plus il y aura de diffusion et probabilité de diffusion de la phase interne vers la phase externe est augmentée donc la charge sera plus faible. Ainsi, un petit volume de phase interne a été trouvé être bénéfique pour obtenir une charge élevée. 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 (X. Li *et al.*, 2014). 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).



**Figure 8 :** Présentations de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs de la vitesse d'agitation et du temps d'évaporation du solvant (a), du temps d'évaporation du solvant et volume de la phase W/O/W (b), du volume de la phase W/O/W et de la vitesse d'agitation (c) sur l'efficacité d'encapsulation.

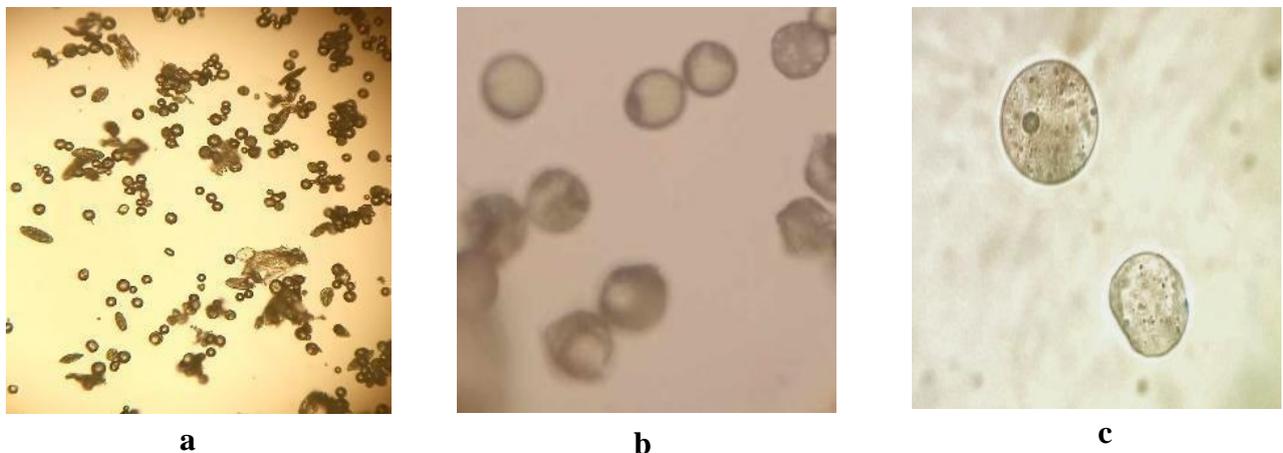
### 3. Validation de modèle

Afin de valider la formulation optimale prédite par le modèle, une analyse par point de contrôle est indispensable à effectuer dans les mêmes conditions. Ces derniers font déjà objet dans la matrice des essais réalisée. Les conditions optimales pour l'efficacité d'encapsulation maximal sont le temps d'évaporation de solvant 8h et 30min, la vitesse d'agitation 550 (tours/min) et Le volume de phase (W/O/W) 33 (mL). Après avoir comparé les taux d'encapsulation expérimentale  $28,27\% \pm 1,46$  et prédit  $31,65 \pm 7,5\%$  on constate des valeurs très proches avec une faible erreur ce qui démontre la précision du modèle de prédiction obtenu.

## II. Analyse de la morphologie des microcapsules

L'analyse morphologique par microscopie optique des microparticules (avec l'objectif 10×10, 40×40 et 10×100) obtenues dans des conditions optimisées est représentée par la figure 9. Les microparticules obtenues ont une forme sphérique, nous pouvons conclure que les particules formulées sont des microcapsules. D'autres expériences ont examiné des images SEM typiques des microparticules 650D et HPR, révélant des particules de 2 à 3 micromètres de diamètre avec une surface lisse a forme sphérique qui conclue la séparation de phase aqueuse (Morita *et al.*, 2000).

D'autres études similaires ont utilisé la microscopie électronique à balayage (MEB) pour observer des particules à fort grossissement, mettant en évidence une surface rugueuse parsemée de pores minuscules, probablement formés par l'évaporation de l'eau piégée dans les sphères pendant la lyophilisation (Yang *et al.*, 2001). Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un microscope JEOL 5800 LV et les images ont été enregistrées avec le logiciel Picture Publisher de Micrographx. La distribution des diamètres des microsphères et des particules de poudre a été déterminée pour chaque échantillon en analysant les dimensions de 100 à 150 microsphères sphériques (Rawat *et al.*, 2012).



**Figure 9** : Images de microscope optique de microcapsules de PLA chargées d'extraits brut du navet (a, b et c représentent la morphologie des microcapsules aux échelles a : grossissement 10×10, b : grossissement 10×40, c : grossissement 10×100).

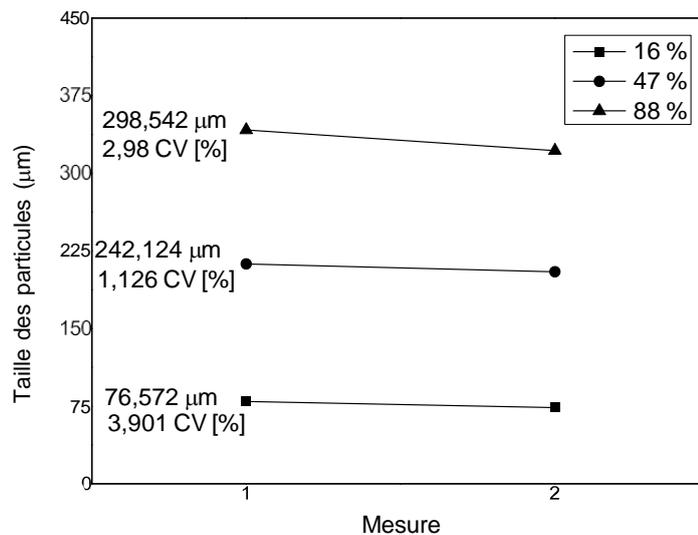
## III. Taille des microparticules

Les résultats de l'analyse par diffraction laser sont illustrés dans la figure 10. Les résultats montrent des valeurs de  $d(0,16) = 299 \pm 3$ ,  $d(0,47) = 242 \pm 1$ , et  $d(0,88) = 76 \pm 4$ .

Ces mesures indiquent une distribution granulométrique étroite autour de la taille moyenne des particules (Barboza *et al.*, 2014).

Des résultats par d'autres chercheurs indiquent que l'efficacité d'encapsulation augmente de manière significative à mesure que la concentration en IBF augmente, de plus il est observé que la taille moyenne des microparticules augmente également dans ce contexte (Azouz *et al.*, 2016). La concentration en PVA influençait fortement le diamètre des microparticules.

De nombreuses recherches ont indiqué que l'utilisation d'un polymère biodégradable pour analyser la répartition des tailles des microsphères a révélé que ses dernières générées à partir d'un échantillon contenant un mélange d'agents tensioactifs ont des diamètres allant de 3,5 à 8,0  $\mu\text{m}$ , elles ont une population principale de microsphères avec un diamètre moyen de 5  $\mu\text{m}$ , avec un indice de polydispersité (PDI) de 0,155 (Rawat *et al.*, 2012). Lorsque les microcapsules sont fabriquées de manière homogène, cela a un impact sur la libération des protéines encapsuler (Nidhin *et al.*, 2008).

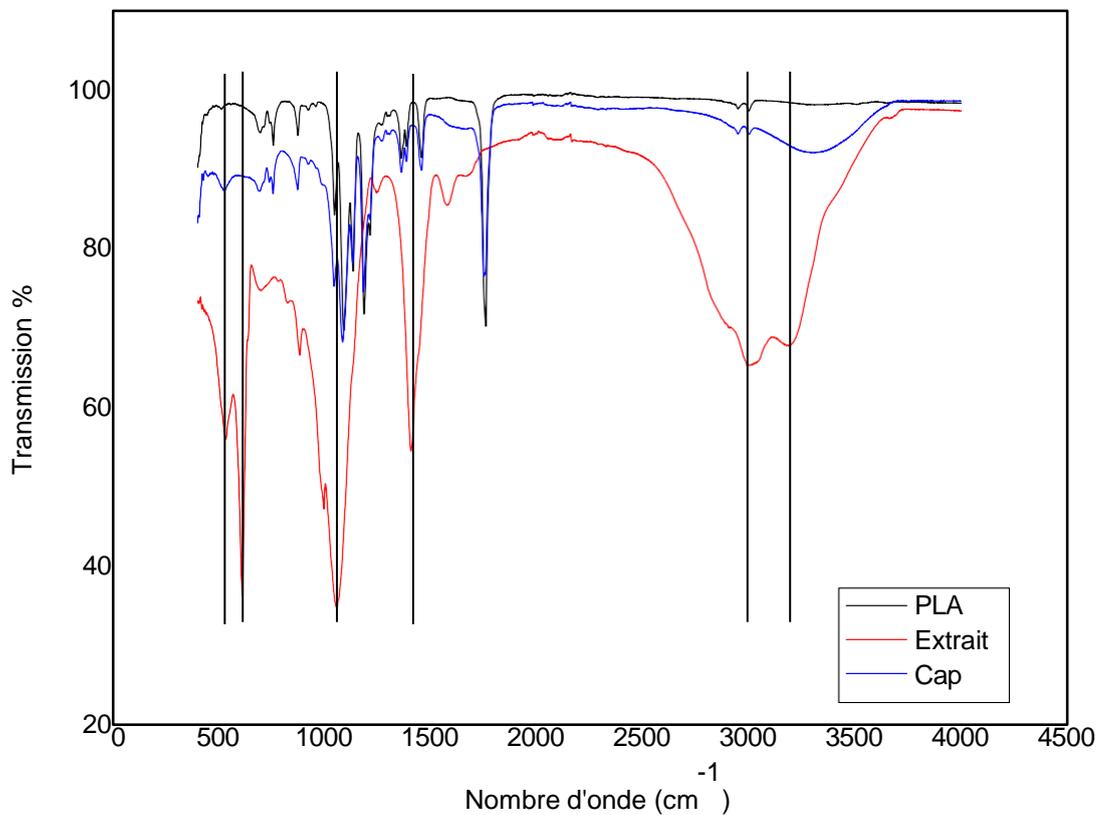


**Figure 10 :** Distribution de la taille des particules

#### **IV. Analyse par spectroscopie FT-IR**

Une analyse infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) a été réalisée pour vérifier et confirmer la présence de l'extrait dans les microparticules de PLA et vérifier d'éventuels interactions possibles entre la matrice et le principe actif.

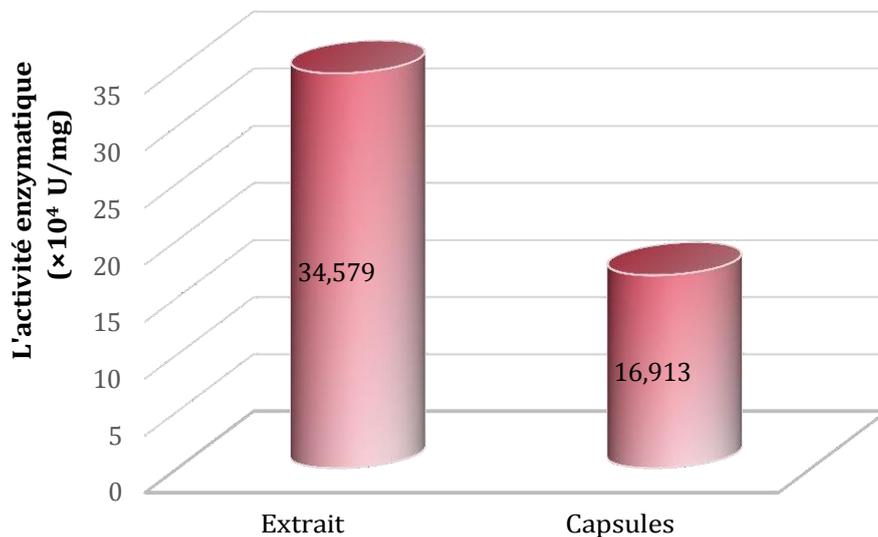
Les spectres de microcapsules et l'extrait du navet rouge ont été comparés à ceux du PLA. Dans la figure 11, on observe un pic dans la région de 800-1200  $\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée aux vibrations d'étirement des groupes C-O/C-C (Wiercigroch *et al.*, 2017). Le pic caractéristique à 1400  $\text{cm}^{-1}$  est attribué l'étirement symétrique du  $\text{CH}_3$  (Fringeli & Günthard, 1981). Le pic intense à 612  $\text{cm}^{-1}$  est lié à la courbure de l'OCN et le pic à 537  $\text{cm}^{-1}$  correspond à la courbure hors plan de C=O (Bunaciu *et al.*, 2014). Le pic caractéristique à 3029  $\text{cm}^{-1}$  est attribué à l'étirement symétrique du  $\text{CH}_2$  (Mizutani *et al.*, 2004). et la région de 3050-3600  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à la vibration d'étirement de O-H (Wiercigroch *et al.*, 2017).



**Figure 11 :** Spectres infrarouge à transformée de Fourier du PLA, de l'extrait brut et des microcapsules chargées de l'extrait.

## V. Activité enzymatique des peroxydases après et avant l'encapsulation

La mesure de l'activité enzymatique avant et après l'encapsulation montre que l'extrait du navet préservé plus que 48% de leur activité enzymatique dans les microcapsules après l'encapsulation par rapport à l'activité initial de l'extrait ( $16,913 \times 10^4$  U/mg) (Figure 12). Des études similaires montrent que l'activité enzymatique est souvent réduite au cours du processus d'encapsulation (Zhang, 2011). Et lorsque les enzymes sont immobilisées (encapsulées), leur activité diminue, mais leur stabilité augmente et leur disponibilité est prolongée (Datta *et al.*, 2013), et selon l'étude de Vial (Vial, 2005) lors d'une action chimique de solvants organiques, il est possible que l'activité enzymatique diminuée.



**Figure 12 :** Activité spécifique des peroxydases d'extrait brut du navet et d'extrait brut encapsulé.

# **Conclusion et Perspectives**

## **Conclusion et perspectives**

Les travaux réalisés dans ce mémoire ont pour objectif d'optimiser l'encapsulation d'un extrait brut du navet rouge (*Brassica rapa. L*) par le polymère biodégradable poly (acide lactique) (PLA).

Dans la première partie de ce travail nous avons utilisé un plan d'expérience de type Box-Behnken à l'aide du logiciel JMP pour déterminer les conditions optimales de l'encapsulation. Une matrice de formulation de 15 essais a été obtenue en variant trois facteurs à trois niveaux (-1 0 +1), X1 (le temps d'évaporation de solvant (h)), X2 (Vitesse d'agitation (Tour/min)) et X3 (Le volume de phase (W/O/W) (mL)), en fixant comme réponse le taux d'encapsulation (%). Après validation du modèle obtenu, les conditions optimales étaient X1 : 8h et 30min, X2 : 550 (Tour/min) et X3 : volume de la phase W/O/W 33 (mL), pour un taux d'encapsulation de 31,65%. Ensuite la deuxième partie a été consacrée pour caractériser les microcapsules du navet rouge, à l'aide d'un microscope optique les microparticules obtenues de la formulation optimale présentent des formes sphériques et dispersés, non agglomérés, ainsi que l'analyse par diffraction laser indique que la distribution granulométrique est étroite autour de la taille moyenne des particules ce qui permet de dire que ces dernières peuvent être des microparticules. Par une caractérisation spectroscopique IR à Transformée de Fourier nous avons mis en évidence les différents pics caractéristiques de notre molécule active y compris ceux du PLA, ce qui prouve l'existence de notre extrait dans les microparticules de PLA. Une étude de l'activité enzymatique des peroxydases a été réalisé pour l'extrait du navet rouge avant et après l'encapsulation, nous avons remarqué que l'activité POD a diminué de près de 50% ( $16,913 \times 10^4$  U/mg) et ce résultat était attendu.

Pour les futures recherches, il est possible d'envisager différents axes afin d'approfondir et d'élargir les connaissances acquises :

- Étudier la durabilité des extraits encapsulés sur de longues périodes et dans différentes conditions de stockage afin d'assurer leur pérennité et leur efficacité.
- Consiste à évaluer l'effet des extraits encapsulés sur les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits finis en effectuant des tests.
- Mise en œuvre d'études in vivo : afin d'évaluer l'efficacité biologique des extraits encapsulés, en se concentrant sur leur biodisponibilité et leurs effets sur la santé humaine.
- Explorer de nouvelles technologies et matériaux pour l'encapsulation afin d'améliorer encore plus la protection et la libération contrôlée des extraits bruts.

# **Références Bibliographiques**

- Acevedo, R., & Strong, (2012).SCtB-0098.pdf. <https://repository.si.edu/bitstream/handle/10088/17551/SCtB-0098.pdf?sequence=2>
- Agnihotri, N., Mishra, R., Goda, C., & Arora, M. (2012). Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery : A Review. *Indo Global J Pharm Sci*, 2, 1- 20. <https://doi.org/10.35652/IGJPS.2012.01>
- Agostini, E., Hernández-Ruiz, J., Arnao, M., Milrad, S., Tigier, H., & 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- 7. <https://doi.org/10.1042/BA20010049>
- Agriopoulou, S., Tarapoulouzi, M., Varzakas, T., & Jafari, S. M. (2023). Application of Encapsulation Strategies for Probiotics : From Individual Loading to Co-Encapsulation. *Microorganisms*, 11(12), 2896. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122896>
- Araar, H. (2011). *Ressources phytogénétiques légumières en Algérie*. Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
- Ariane, L. (2019). *Turnips : Nutrition, Calories, and Benefits*. <https://www.healthline.com/nutrition/turnip-nutrition>
- Azouz, L., Dahmoune, F., Rezgui, F., & G'Sell, C. (2016). Full factorial design optimization of anti-inflammatory drug release by PCL-PEG-PCL microspheres. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 58, 412- 419. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.058>
- Baaziz. (2018). *Takween.com*. [takween.com. https://www.takween.com/molecules-structure-3D/peroxydases.html](https://www.takween.com/molecules-structure-3D/peroxydases.html)
- Barboza, F. M., Machado, W. M., Olchanheski Junior, L. R., Padilha de Paula, J., Zawadzki, S. F., Fernandes, D., & Farago, P. V. (2014). PCL/PHBV microparticles as innovative carriers for oral controlled release of manidipine dihydrochloride. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 268107. <https://doi.org/10.1155/2014/268107>

- Bazzano, L. A., Serdula, M. K., & Liu, S. (2003). Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, 5(6), 492- 499. <https://doi.org/10.1007/s11883-003-0040-z>
- Benoit, J.-P., Richard, J., & Venier-Julienne, M.-C. (2000). *Microencapsulation*. Techniques de l'Ingénieur. <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/biomedical-pharmath15/mise-en-forme-des-medicaments-42611210/microencapsulation-j2210/>
- 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>
- 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)
- Bunaciu, A., Fleschin, Ş., & Aboul-Enein, H. (2014). Evaluation of the protein secondary structures using fourier transform infrared spectroscopy. *Gazi University Journal of Science*, 27, 637- 644.
- Calderón-Oliver, M., & Ponce-Alquicira, E. (2022). The Role of Microencapsulation in Food Application. *Molecules*, 27(5), 1499. <https://doi.org/10.3390/molecules27051499>
- Cartea, M., Cámara-Martos, F., Obregón, S., Badenes-Pérez, F., & De Haro, A. (2021). *Advances in Breeding in Vegetable Brassica rapa Crops*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.95769>
- Cartea, M. E., Francisco, M., Soengas, P., & Velasco, P. (2011). Phenolic Compounds in Brassica Vegetables. *Molecules*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/molecules16010251>
- Catherine, D., Philippe, A., & Jean-Michel, G. (2008). *Amazon.fr—Le Truffaut du jardin écologique— Groult, Jean-Michel, Delvaux, Catherine, Asseray, Philippe, Beucher, Patricia, Collectif— Livres*. <https://www.amazon.fr/Truffaut-du-jardin-%C3%A9cologique/dp/2035840503>

- Charaabi, S. (2020). *Complexation EBISilc-Molécules bioactives : Conception et développement d'un nouveau modèle galénique.*
- Dardelle, G., Bouquerand, P.-E., & Erni, P. (2012). *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals—An industry perspective on the advantages and disadvantages of different flavor delivery systems.*
- 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)
- Delannoy, E., Marmey, P., Penel, C., & Nicole, M. (2013). Les peroxydases végétales de classe III. *Acta Botanica Gallica*, 151, 353- 380. <https://doi.org/10.1080/12538078.2004.10515440> Diao, M.,
- Dembele, R. H., Konate, K., & Dicko, M. H. (2019). Etude comparative des peroxydases de dix (10) plantes supérieures couramment rencontrées au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 13(6), Article 6. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i6.9>
- Edwards, S. L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M. H., & Poulos, T. L. (1993). Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 750- 754. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.750>
- El Mansouri, I., Mercado, J. A., Santiago-Dómenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V., & Quesada, M. A. (1999). Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum*, 106(4), 355- 362. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.106401.x>
- Faure, A. (2023, mars 3). L'encapsulation chimique et physico-chimique d'actifs. *PolymerExpert*. <https://polymerexpert.fr/blog/lencapsulation-chimique-et-physico-chimique-dactifs/>

- Finch, C. A., & Bodmeier, R. (2000). Microencapsulation. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. [https://doi.org/10.1002/14356007.a16\\_575](https://doi.org/10.1002/14356007.a16_575)
- Fringeli, U. P., & Günthard, H. H. (1981). Infrared membrane spectroscopy. *Molecular Biology, Biochemistry, and Biophysics*, 31, 270- 332. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-81537-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-81537-9_6)
- Gaspar, T., Kevers, C., Hausman, J., Berthon, J., & Ripetti, V. (1992). Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*, 12(10), 757- 765.
- Hamounic, B., & Pino, F. (2011). *La microencapsulation : Une technologie de choix pour la formulation d'actifs - p39 - N°352 - L'Actualité Chimique, le journal de la SCF*. Société Chimique de France (SCF). <https://new.societechimiquedefrance.fr/numero/fiche-n-4-la-microencapsulation-une-technologie-de-choix-pour-la-formulation-dactifs-p39-n352/>
- Henriksen, A., Welinder, K. G., & Gajhede, M. (1998). Structure of Barley Grain Peroxidase Refined at 1.9-Å Resolution : A PLANT PEROXIDASE REVERSIBLY INACTIVATED AT NEUTRAL pH\*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 2241 - 2248. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.2241>
- 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>
- Ignatov, A. (2008). (PDF) *Origin and Expansion of Cultivated Brassica rapa in Eurasia : Linguistic Facts*. [https://www.researchgate.net/publication/257942800\\_Origin\\_and\\_Expansion\\_of\\_Cultivated\\_Brassica\\_rapa\\_in\\_Eurasia\\_Linguistic\\_Facts](https://www.researchgate.net/publication/257942800_Origin_and_Expansion_of_Cultivated_Brassica_rapa_in_Eurasia_Linguistic_Facts)
- Kapusta-Duch, J., Kopeć, A., Piatkowska, E., Borczak, B., & Leszczyńska, T. (2012a). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 63(4), 389- 395.
- Kapusta-Duch, J., Kopeć, A., Piatkowska, E., Borczak, B., & Leszczyńska, T. (2012b). The beneficial effects of Brassica vegetables on human health. *Roczniki Panstwowego Zakladu Higieny*, 63(4), 389- 395.

- Latham, P. (2014). Plantes utiles du Bas-Congo. [https://www.academia.edu/13181660/Plantes\\_utiles\\_du\\_Bas\\_Congo](https://www.academia.edu/13181660/Plantes_utiles_du_Bas_Congo)
- Li, M., Rouaud, O., & Poncelet, D. (2008). Microencapsulation by solvent evaporation : State of the art for process engineering approaches. *International journal of pharmaceutics*, 363, 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>
- Łoborzewski, 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)
- Ménard, F. (2015). : *Histoire du navet* :: [https://lesjardinslaurentiens.com/navets\\_histoire.html](https://lesjardinslaurentiens.com/navets_histoire.html) 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>
- Morita, T., Sakamura, Y., Horikiri, Y., Suzuki, T., & Yoshino, H. (2000). Protein encapsulation into biodegradable microspheres by a novel S/O/W emulsion method using poly(ethylene glycol) as a protein micronization adjuvant. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 69(3), 435- 444. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(00\)00326-6](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(00)00326-6)
- Nagai, T., Yukimoto, T., & Suzuki, N. (2002). Glutathione Peroxidase from the Liver of Japanese Sea Bass *Lateolabrax japonicus*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 57(1- 2), 172- 176. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-1-228>
- Nisha Rani, D., & Emilia Abraham, T. (2006). *Kinetic study of a purified anionic peroxidase isolated from Eupatorium odoratum and its novel application as time temperature indicator for food materials*. <http://localhost:8080/xmlui/handle/123456789/2030>

- Nnamchi, C. I., Parkin, G., Efimov, I., Basran, J., Kwon, H., Svistunencko, D. A., Agirre, J., Okolo, B. N., Moneke, A., Nwanguma, B. C., Moody, P. C. E., & Raven, E. L. (2016). Structural and spectroscopic characterisation of a heme peroxidase from sorghum. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 21, 63. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1313-z>
- Omar, Z. K., Driouch, A., Diaf, K., & Abbès, S. B. (2019). *Microencapsulation et libération des principes actifs : L'huile essentielle de Tetraclinis Articulata (VAHL) (Thuya de Berberie) et l'Hydrochlorothiazide à partir des polymères biodégradables et biocompatible.*
- Polidoro, J. (2008). *Turnips.pdf*. [https://academics.hamilton.edu/foodforthought/our\\_research\\_files/turnips.pdf](https://academics.hamilton.edu/foodforthought/our_research_files/turnips.pdf)
- Pontsho, P., Feto, N. A., & Mitema, A. (2020). Breakthroughs in the discovery and use of different peroxidase isoforms of microbial origin. *AIMS Microbiology*, 6, 330- 349. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>
- Sanlier, & Guler, S. (2018). *[PDF] The Benefits of Brassica Vegetables on Human Health | Semantic Scholar*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-Benefits-of-Brassica-Vegetables-on-Human-Health-Sanlier-Saban/c7e3ab5286aeb8f539d8ca5d3fa9656a2b02c1d0>
- Sbaihi, K. (2021). *Content.pdf*. <https://dspace.ummto.dz/server/api/core/bitstreams/9e8ba4c1-cc4f-4ef4-bc4c-918bff5b156e/content>
- 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>
- Sohail, A., Zabta khan, S., Maimoona, M., & Muhammad, I. (2018). Antioxidant and anticancer activities of Brassica rapa : A review. *MOJ Biology and Medicine*, Volume 3(Issue 4). <https://doi.org/10.15406/mojbm.2018.03.00094>
- Takabe, K., Takeuchi, M., Sato, T., Ito, M., & Fujita, M. (2001). Immunocytochemical Localization of Enzymes Involved in Lignification of the Cell Wall. *Journal of Plant Research*, 114(4), 509- 515. <https://doi.org/10.1007/PL00014018>

- tela, botanica. (2013). eFlore. *Tela Botanica*. <https://www.tela-botanica.org/eflore/>
- Tiwari, D., & Verma, P. (2011). *Microencapsulation technique by solvent evaporation method (Study of effect of process variables)*. 2, 998- 1005.
- Vandamme, T., Ponclet, D., & Surbra-paternault, P. (2007). *Microencapsulation : Des sciences aux technologies - - VANDAMME Thierry F., PONCELET Denis, SUBRA-PATERNAULT Pascale (EAN13 : 9782743019570) / e-librairie Lavoisier. Lavoisier.* <https://e.lavoisier.fr/produit/37037/9782743019570/microencapsulation-des-sciences-aux-technologies>
- Veitch, N. (2004). Veitch, N. C. Horseradish peroxidase : A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65, 249-259. *Phytochemistry*, 65, 249- 259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>
- Vial, S. (2005). *Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques.*
- 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)
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M. Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., & Malek, K. (2017). Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates : A review. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 317- 335. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.045>
- 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, Y., Yan, X., Zheng, H., Li, J., Wu, X., Xu, J., Zhen, Z., & Du, C. (2024). The application of encapsulation technology in the food Industry : Classifications, recent Advances, and perspectives. *Food Chemistry: X*, 21, 101240. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101240>
- Zhang, Y. (2011). *Development of an enzyme immobilization platform based on microencapsulation for paper-based biosensors.*

## Résumé

L'objectif de ce travail consiste à préparer des microparticules à base d'un polymère biodégradable le (Poly (acide lactique)), contenant un extrait brut du navet rouge (*Brassica rapa.L*) riches en antioxydants comme les enzymes telles que la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) et la peroxydase, en utilisant la technique d'émulsion/évaporation du solvant. Afin d'optimiser les paramètres d'encapsulation dans la matrice PLA, nous avons utilisé un plan d'expérience de type Box-Behnken à l'aide du logiciel JMP, afin de déterminer les conditions optimales de l'encapsulation. Une matrice contenant 15 formulations a été obtenue en variant trois facteurs à trois niveaux (-1 0 +1), X1 (temps d'évaporation (h)), X2 (vitesse d'agitation (Tour/min)) et X3 (volume de phase W/O/W (mL)), en fixant comme réponse le taux d'encapsulation. La formulation optimale a été préparée après validation du modèle obtenu, à l'aide d'un microscope optique. Les microparticules obtenues présentent une taille moyenne (principalement de 150 à 500 µm), de forme sphériques et dispersées, non agglomérées. Par une caractérisation spectroscopique IRTF nous avons retrouvé les pics caractéristiques de notre molécule active y compris ceux du PLA, ce qui prouve la présence de notre extrait dans les microparticules de PLA. Les peroxydases encapsulées ont montré une diminution de l'activité enzymatique de 50% par rapport à l'activité initiale.

**Mots clés :** Navet ; *Brassica rapa* ; peroxydase ; microencapsulation ; activité enzymatique ; PLA.

## Abstract

The objective of this work is to prepare microparticles based on a biodegradable polymer (Poly (lactic acid)), containing an enzymatic extract of red turnip (*Brassica rapa.L*) rich in antioxidants such as enzymes such as catalase , superoxide dismutase (SOD) and peroxidase, using the emulsion/solvent evaporation technique. In order to optimize the encapsulation parameters in the PLA matrix, we used a Box-Behnken type experimental design using JMP software, in order to determine the optimal encapsulation conditions. A matrix containing 15 formulations was obtained by varying three factors at three levels (-1 0 +1), X1 (evaporation time (h)), phase W/O/W (mL)), setting the encapsulation rate as the response. The optimal formulation was prepared after validation of the model obtained, using an optical microscope. The microparticles obtained have an average size (mainly 150 to 500 µm), spherical shape and dispersed, not agglomerated. By FTIR spectroscopic characterization we found the characteristic peaks of our active molecule including those of PLA, which proves the presence of our extract in the PLA microparticles. The encapsulated peroxidases showed a decrease in enzymatic activity of 50% compared to the initial activity.

**Keywords :** Turnip ; *Brassica rapa* ; peroxidase; microencapsulation ; enzymatic activity ; PLA.

## المخلص

الهدف من هذا العمل هو إعداد جسيمات دقيقة تعتمد على بوليمر قابل للتحلل الحيوي (بولي حمض اللبنيك)، يحتوي على مستخلص إيزيمي من الفلث الأحمر (*Brassica rapa.L*) الغني بمضادات الأكسدة مثل إنزيمات مثل الكاتالاز وديسموناز الأكسيد الفائق (SOD) والبيروكسيداز، باستخدام تقنية المستحلب/التبخير بالمذيبات. من أجل تحسين معلمات التغليف في مصفوفة PLA، استخدمنا تصميم Box-Behnken للتجربة باستخدام برنامج JMP لتحديد شروط التغليف المثلى. تم الحصول على مصفوفة تحتوي على 15 تركيبة عن طريق تغيير ثلاثة عوامل على ثلاثة مستويات (-1 0 +1) (X1 زمن التبخير ساعة) (X2 سرعة التغليف) دورة في الدقيقة (X3 حجم المرحلة W/O/W مل)، مع تحديد معدل التغليف كاستجابة. تم إعداد التركيبة المثلى بعد التحقق من صحة النموذج الذي تم الحصول عليه باستخدام المجهر الضوئي. كانت الجسيمات المجهرية التي تم الحصول عليها متوسطة الحجم (150 إلى 500 ميكرومتر بشكل أساسي)، كروية الشكل ومشتتة وغير متكتلة. كُثِفَ التوصيف الطيفي بالأشعة فوق البنفسجية بالأشعة تحت الحمراء عن القيم المميزة للجزء النشط، بما في ذلك تلك الخاصة بجزء PLA، مما يثبت

وجود مستخلصنا في جزيئات PLA الدقيقة. أظهرت البيروكسيدازات المغلفة انخفاً نسبياً بنسبة 50% في النشاط الإنزيمي مقارنة بالنشاط الأولي.

الكلمات الرئيسية: الفلث؛ براسيكا رابا؛ البيروكسيداز؛ التغليف الفائق؛ النشاط الإنزيمي؛ PLA.