

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
Département de Biologie Physico-Chimique
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biochimie Fondamentale



Réf :.....

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

MASTER

Thème

Optimisation des paramètres influençant la synthèse des microcapsules du navet blanc (*Brassica rapa L.*) dans polymère PLA

Présenté par :

BOULKARIA Chalabia & SERRADJ Kenza

Soutenu le : **03/07/2025**

Devant le jury composé de :

Mr. ZAIDI. H	MCB	Président
Mme. SEBAIHI Epse HARZOUN. S	MCB	Examinatrice
Mme. DAHDOUH Epse AKSAS. A	MCB	Promotrice

Année universitaire : 2024/ 2025

Dédicace

Par la grâce de Dieu Tout-Puissant, je dédie mon travail à mes parents qui sont ma raison de vivre pour leurs sacrifices innombrables, leur encouragement constant et leur soutien inconditionnel.

À la mémoire de mes grands-parents, ainsi qu'à mes tant et oncle.

*À mes sœurs **Akila, Louiza et Nadjat**, ainsi qu'à mes frères **Hachmi et Yacine**.*

*Ainsi qu'à mon encadreur **Mme. DAHDOUH Amel** pour ses précieux conseils, ses orientations éclairées et les efforts qu'elle a fournis tout au long de ce travail.*

*A mes chères copine adorée **Tinhinane, Lina, Kenza, Imane**, sans oublier **Cylia**, même à distance.*

*A mon binôme **BOULKARIA Chalabia** pour sa collaboration et sa gentillesse ainsi qu'à sa famille*

*Sans oublier mes camarades de la promotion **M2BF** qui ont partagé cette étape importante de ma vie.*

Et enfin, à toute ma famille proche, ainsi qu'à toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin.

Kenza



Dédicace

*Louange à **Dieu**, qui m'a accordé la patience, la force et la persévérance nécessaires pour accomplir ce mémoire.*

*Tout d'abord je dédie ce travail à mes **chers parents** qui ont été et sont toujours ma force, l'amour, la tendresse, les mains qui ne se lâchent jamais, et qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours académique. Que Dieu vous protège.*

*À ma seule sœur **Liticia** mon cœur, mon courage pour son soutien, sa patience. Ainsi qu'à mes frères **Hamza, Mazigh, Ali** et **Yifithene** qui sont toujours à mes côtés le dieu vous garde pour moi. Ainsi que mes **belles sœurs** et mes chers neveux **Mayas, Assalas, Ouiza** et **Hiba**.*

À la personne qui m'a aidé et qui m'a soutenu surtout moralement, qui était toujours à mes côtés à tout moment, pour ses encouragements et sa patience infinie

Abeoub. M.

*Ainsi qu'à mes cousins pour leur soutien et à mes oncles et tantes de la famille **Yakouben** et à toutes la famille **Boukaria**. À mes **grands-parents** et mes **cousins** le dieu vous accueille dans son vaste paradis.*

*À notre encadrante **Mme. DAHDOUH Epse AKSAS Amel** pour sa présence et ses Conseils.*

*Aussi à ma binôme **SERRADJ Kenza** pour sa patience et pour ce travail Partagé avec elle, un grand merci.*

*Un grand merci à notre promo de **master 2 biochimie fondamentale 2025** sur la coopération et les beaux moments passés ensemble.*

*À mes Chères amies **Fahima, Lydia** et **Thiziri** sont oublie **Katia** et **Asma**.*

Je tiens de remercier toutes personnes qui m'a aidé de près ou de loin.

Chalabia



Remerciement

*Nous remercions d'abord « **DIEU** » tout puissant qui nous avoir donné la patience et le courage pour arriver jusqu'à aujourd'hui et l'opportunité de terminer cet humble travail.*

*Nous adressons nos chaleureux remerciements à notre encadrante **Mme. DAHDOUH Epse AKSSAS Amel** pour ses conseils avisés, ses orientations, ses accompagnements bienveillants et ses efforts fourni tout au long de ce travail.*

*Nous tenons également à exprimer notre profonde gratitude aux membres du jury **Mr. ZAIDI. H** le président et **Mme. SEBAIHI Epse HARZOUN. S** l'examinatrice, qui ont accepté de lire ce mémoire et d'évaluer notre travail avec bienveillance et attention.*

*Sans oublie à remercier tous **nos professeurs** de la faculté des sciences de la nature et de la vie pour leur enseignement, leur soutien et leurs encouragements tout au long de notre parcours universitaire.*

Kenza & Chalabia

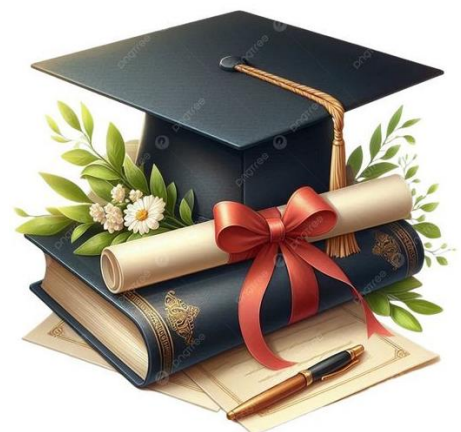


Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction..... 1

Revue bibliographique

I. Généralités sur le navet	3
Historique	3
Description de l'espèce	3
Classification botanique	4
Variétés de navet.....	4
Composition de navet.....	5
Intérêt de navet.....	5
II. Peroxydases	6
Définition.....	6
Classification et sources des peroxydases	6
Nomenclature (EC)	7
Structure des peroxydases	7
Structure de site actif.....	8
Mécanisme catalytique des peroxydases de classe III	9
Aspect physiologique des peroxydases de classe III	9
Domaines d'application des peroxydases.....	9
III. Micro encapsulation	10
Historique	10
Définition.....	10
Types des microcapsules	11
Technique d'encapsulation	12
Domaines d'applications de la microencapsulation.....	12
Encapsulation par émulsion/évaporation de solvant.....	13

Matériels et méthodes

I. Matériels	14
Produits chimiques.....	14
Appareillage.....	14
Echantillon végétal.....	14
II. Préparation de l'extrait brut de navet blanc	14
III. Détermination de la concentration de protéines totales	15

IV. Détermination de l'activité enzymatique	15
V. Préparation des microcapsules	15
VI. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation avec la méthodologie des surfaces de réponses	16
Conception expérimentale	16
Construction et validation du modèle	16
VII. Caractérisation des microcapsules.....	17
Calcul de l'efficacité d'encapsulation	17
Analyse de la morphologie des microcapsules	18
Analyse de taille des microcapsules.....	18
Analyse par spectroscopie FT-IR.....	18
Détermination de l'activité enzymatique des peroxydases avant et après l'encapsulation	18
<i>Résultats et discussions</i>	
I. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation	19
Analyse de modèle	19
Analyse de la surface de réponse.....	22
Validation de modèle	24
II. Analyse de la morphologie des microcapsules	25
III. Analyse de taille des microcapsules.....	26
IV. Analyse de spectre FT-IR.....	27
V. Activité enzymatique avant et après encapsulation des peroxydases.....	28
<i>Conclusion et perspectives</i>	
<i>Conclusion et perspectives</i>	30
<i>Références bibliographiques</i>	

Liste des tableaux

Tableau I : Résume la composition essentielle du navet.	5
Tableau II : Représente l'intérêt de navet.	5
Tableau III : Représente les facteurs et les niveaux pour la méthode de surface de réponse basée sur le plan expérimental Box-Behnken (en niveaux codés de trois variables).	16
Tableau IV : ANOVA pour l'impact de la concentration de PVA, la masse de PLA et la température sur l'efficacité d'encapsulation.....	20
Tableau V : Estimation des coefficients, erreurs standards et rapport de teste t de la surface de l'efficacité d'encapsulation.	22

Liste des figures

Figure 1: Image représente les différentes variétés de navet.....	4
Figure 2: Représentation d'une structure primaire des peroxydases végétale	7
Figure 3: Modélisation en 3D de la construction cristalline des peroxydases végétales	8
Figure 4: Résidus d'acide aminée dans la région de connexion à l'hème de HRP-C.....	8
Figure 5: Images obtenues par microscope électronique à balayage des types des microcapsules..	11
Figure 6: Schéma du procédé d'encapsulation par précipitation/évaporation	13
Figure 7: Diagramme de parité comparatif entre les valeurs prédites et expérimentales.	19
Figure 8: Présentation de la surface de réponse tridimensionnelle	26
Figure 9: Morphologie des microcapsules chargée de l'extrait de navet blanc sous microscope optique à différentes échelles (G 10×10, G 10×40, G 10×100).....	26
Figure 10: Représentation graphique de la distribution de la taille des capsules	27
Figure 11: Spectre infrarouge à transformée de Fourier du PLA, d'extrait brut et des microcapsules	28
Figure 12: Comparaison de l'activité enzymatique de l'extrait libre et des microcapsules.....	29

Liste des abréviations

Aj : Ajustement

ANOVA : Analyse de la variance

BBD : Plan de Box-Behnken

BSA : Bovin Sérum Albumin

DCM : Dichlorométhane

EE : Efficacité d'encapsulation

FTIR: Fourier Transform Infrared Spectroscopy

HRP : Peroxydase de Raifort

MEB : Microscopie Électronique à Balayage

OH : Groupement d'Hydroxyle

pH: potentiel d'Hydrogène

POD : Peroxydase

PLA: Poly Lactic acid

PLGA: acide poly(lactide-co-glycolide)

PVA : polyvinyllic acid

RSM : Response Surface Methodology

Introduction

Introduction

Le navet (*Brassica rapa L.*), appartenant à la famille des Brassicacées, est une plante annuelle ou bisannuelle présentant une grande diversité morphologique (Al-Khayri et al., 2021). Il est de plus en plus valorisé pour ses usages alimentaires et industriels, grâce à sa richesse en composés bioactifs (phénols, flavonoïdes, caroténoïdes, vitamines C et E, enzymes antioxydantes) (Abdel-Faride et al., 2007 ; Sun et al., 2022). Les composés cités contribuent à leur activité protectrice contre diverses maladies, notamment le cancer, les anomalies immunitaires, peut aussi contrôler le stress oxydatif dans les cellules (Bovine et al., 2009).

L'emploi des enzymes notamment les peroxydases, connaît une croissance constante dans les secteurs chimique, pharmaceutique et alimentaire (Poyot et al., 2007). En 1855 le Schonbein a observé l'apparition d'une couleur vive en présence de gaïacol, peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'extrait animaux ou végétaux, à partir de cette observation les peroxydases ont été les premières enzymes à être examinées (Delannoy et al., 2013), suit à leur utilité industrielle et analytique. Cette importance est directement liée à leur stabilité thermique et chimique (Diao et al., 2019). Les peroxydases d'origine végétale, ce sont des enzymes hémiques de classe III capables d'oxyder divers composés inorganiques et impliquées dans plusieurs fonctions physiologiques (Diao et al., 2019).

Au cours des dernières années, l'encapsulation a connu des progrès et des avancées significatives dans de nombreux domaines grâce à leur efficacité d'envelopper des substances liquides, solides ou gazeuses dans de petites vésicules (Nedovic et al., 2011). Elle constitue une méthode de protection des composés bioactifs contre la décomposition et dénaturation causées par des facteurs environnementaux (Chaize et al., 2004 ; Narsaiah et al., 2014 ; Eghbal et al., 2018). Elle crée une barrière qui ralentit les réactions chimiques avec le milieu extérieur, ce qui prolonge la durée de conservation des composés encapsulés tout en garantissant leur libération graduelle (Labuschagne et al., 2018). Plusieurs techniques permettent d'encapsuler des substances médicamenteuses afin d'assurer une libération contrôlée de principe actif. L'efficacité de cette procédure dépend de plusieurs paramètres tels que la vitesse d'agitation, le volume de la phase huileuse, la concentration de polymère (PLGA, PLA...) et température...etc (Jyothi1 et al., 2010).

Dans ce contexte, notre travail vise à encapsuler les peroxydases de navet blanc (*Brassica rapa .L*) selon quelques paramètres et nous nous intéressons aux peroxydases vues ces intérêt dans plusieurs application (médicales, industries et environnements). Afin de protéger les peroxydases contre la dégradation, nous avons appliqué la technique microencapsulation en double émulsion évaporation de solvant en utilisant l'acide poly lactique (PLA) comme un polymère.

Cette étude est divisée en trois parties principales :

- La première partie s'agit d'une synthèse des données bibliographiques concernant le navet, les peroxydases et le procédé de microencapsulation.
- La seconde partie présente le matériel et les techniques employées pour optimiser les conditions de préparation et de caractérisation des microcapsules.
- La troisième partie est consacré pour l'interprétation et la discussion des résultats.

Revue bibliographique

I. Généralités sur le navet

1. Historique

Le navet entre dans la catégorie des légumes anciens, il est cultivé depuis des millénaires par l'homme et destiné à leur consommation. Ce légume est d'origine de Sibérie, d'Asie Mineure et d'Europe de l'Est, il était déjà connu par les Romains (Polidoro et al., 2008).

Au 17^{ème} siècle, le navet était introduit à l'aux États-Unis et au Canada par Jacques Cartier en 1541, puis réparti petit à petit un peu partout au monde. Dans les régions d'Asie, le navet se consomme mariné par contre au Japon, il est décoratif (Polidoro et al., 2008). En Italie et en Autriche, sont précieux qu'ils figuraient sur les armoiries des familles nobles et de haut rang social qui ont une richesse particulière où il est fermenté spécialement pour une nourriture d'hiver appelée « Ruedenkraut » (Vogl-Lukasser et al., 2007).

Au XVIII^{ème} siècle, des recherches ont mis en évidence les racines de navet et ils ont trouvé que ces espèces fournissent une excellente énergie pour les animaux d'élevage (Polidoro et al., 2008), aussi il est très impliqué dans la médecine traditionnelle (Beltagy et al., 2014). Un chercheur a montré l'utilité de navet par cette expression : « un fermier trompe le diable en plantant des navets pour ne lui laisser que les feuilles, puis du blé pour ne lui laisser que les racines » (Vogl-Lukasser et al., 2007).

2. Description de l'espèce

Le navet c'est une plante qui termine son cycle de vie dans deux ans (plante bisannuelle) mais souvent cultivée comme légume-racine annuelle, leur croissance est comme les carottes. Au cours de la première année il développe et stocke des nutriments dans sa racine qui possède une forme cylindrique, de couleur blanc et elle plus ou moins sucrée. Au cours de la seconde année, la plante est souterraine, il génère des fleurs et des graines (Polidoro et al., 2008). Ces feuilles développent sur la surface de la terre de manière allongées, de couleur vert, poilues et assez ou moins rugueuses au contact. Ces fleurs sont de couleur jaune, reçoivent du pollen ce qui la transforme en gousses contenant de 15 à 25 graines de petite taille sphérique (Cie et Vilmorin-Andrieux, 1883).

3. Classification botanique

La classification de *Brassica rapa* selon Mansfeld est comme suit (Sanlier et al., 2018 ; Kong et al., 2024) :

- Règne : Plantae.
- Devisions : Magnoliophyta.
- Classe : Magnolioposida.
- Ordre : Capparales.
- Famille : Brassicacées.
- Sous-famille : Brassicoideae.
- Genre : Brassica.
- Noms communs : Navet

4. Variétés de navets

Les racines de navet variantes entre aux selon la forme : piriforme, cylindrique, sphérique, aplatie ou allongée, et sa couleur : blanc, jaunes pale, noir ou gris, violet, bicolores, rose et vert (Alamy., 2016 ; Cie et Vilmorine-Andrieuse, 2018).

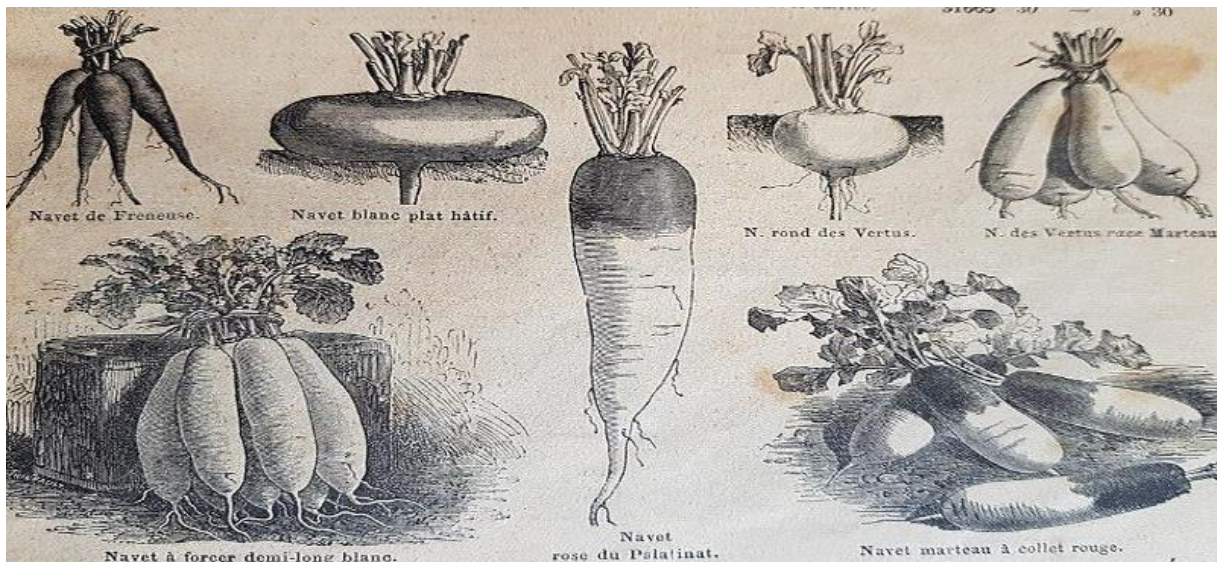


Figure 1: Image représente les différentes variétés de navet (Cie et Vilmorine-Andrieuse, 2018).

5. Composition du navet

Tableau I : Résume la composition essentielle du navet (Sun et al., 2022 ; Paul et al., 2019).

Composants		Teneurs
Chimique	Eau	92 g/100 g
	Lipide	0.3 g/100 g
	Glucides	6 g /100g
	Energie	27 kcal/100 g
	Protéines	1g /100 g
Minéraux	Calcium (Ca)	$4,5 \times 10^3$ mg/kg
	Phosphore (P)	27mg/kg
	Zinc (Zn)	15,7 mg/kg
	Fer (Fe)	81,1 mg/kg
	Magnésium (Mg)	11mg/Kg
Phytochimique	Flavonoïdes	33,0 g/100g

6. Intérêt du navet

Tableau II : Représente l'intérêt du navet (Paul et al., 2019).

Pharmaceutique	Traitement traditionnelle	Nutritionnelle
<ul style="list-style-type: none"> • Activités anticancéreuses • Activité hépatoprotectrice • Activité néphroprotectrice • Antidiabétiques • Antihypertenseurs • Antioxydants anti-inflammatoires 	<ul style="list-style-type: none"> • Traitement des maux de tête. • Traitement des affections thoraciques. • Traitement des rhumatismes • Traitement des œdèmes, de la gonorrhée. • Traitement de la syphilis et de la rage. 	<ul style="list-style-type: none"> • Les navets sont riches des isothiocyanates qui intervient sur empêche l'action des cancérogène sur les cellules. • Equilibre d'alimentation : Grace à sa richesse en vitamines et d'autre composé.

II. Peroxydases

1. Définition

Les peroxydases appartiennent à un groupe des protéines à hème (Delannoy et al. ;2004), situé au niveau des parois cellulaires contenant de la lignine (Takabe et al., 2001), catalysent les réactions d'oxydo-réduction de divers substrats en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) comme accepteurs d'électrons (Delannoy et al., 2004) selon la réaction suivante :



2. Classification et sources des peroxydases

Il n'existe pas uniquement une seule classification des peroxydases mais il y a plusieurs car ces enzymes sont présents presque chez tout être vivant.

2-1. Classification de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB)

Cette classification regroupe les peroxydases selon les mécanismes de réactions et les substrats utilisés. Les enzymes de cette classe sont divisées en treize groupes parmi lesquels il y a 10 groupes de protéines à hème et les trois autres sont des sélénocystéine (Delannoy et al., 2004).

2-2. Classification de Welinder

Welinder basée dans sa classification sur la condition de l'absence ou la présence d'hème. Les peroxydases non hémiques englobent quatre superfamilles. Les peroxydases hémiques qui se divisent en deux catégories telles que les cyclooxygénases peroxydases qui sont présentes dans les cellules animales et les catalases peroxydases se sont des peroxydases non animales, ces dernières ont été classées en trois classes (I, II, III) selon leur origine (Pandey et al., 2017).

- Les peroxydases de classe I : cette classe elle est disponible chez les procaryotes (Pandey et al., 2017), elle est composée de catalase peroxydase (CaP) bactériennes, ascorbate peroxydase (APX) (Delannoy et al., 2004) et cytochrome c peroxydase (CCP) de *Saccharomyces cerevisiae* (Zamocky et al., 2000). Leur structure ne renferme pas de ponts disulfures et de calcium (Pandey et al., 2017).
- Les peroxydases de classe II : Ce sont majoritairement présentes chez les champignons (Twala et al., 2020).

Sont divisé on deux type les lignine-peroxydases (LiP) et les peroxydases à manganèse (Delannoy et al., 2004). Ils ont des ponts disulfures, calcium et de peptide signale dans leur structure (Pandey et al., 2017).

- Les peroxydases de classe III : sont des peroxydases d'origine végétale, extracellulaires, leur structure est similaire à celle des peroxydases de classe II (Patricia Twala et al., 2020).

3. Nomenclature (EC)

Le code enzymatique des peroxydases c'est EC :1.11.1.7, chacun de ces nombres indique une étape importante dans la classification de ces enzymes (Medjeldi Marzougui et al., 2012) :

- 1 : les peroxydases sont des oxydoréductases ;
- 1.11 : signifie que les oxydoréductases qui réagissent comme accepteurs d'électrons avec les peroxydes ;
- 1.11.1 : c'est-à-dire implique le H₂O₂ comme peroxyde ;
- 1.11.1.7 : indique exactement les peroxydases ;

4. Structure des peroxydases

Les peroxydases végétales sont des protéines de 300-330 acide aminée. Au sein de ces protéines on trouve domaines conservés (B, D et F) qui sont des hélices alpha. Le domaine B c'est le domaine distal, le D il n'avait pas de rôle bien déterminé et le F est un domaine proximal. En plus de ces éléments, les peroxydases comportant un peptide signalent et un segment peptidique clivée à l'extrémité N-terminale (Delannoy et al., 2004).

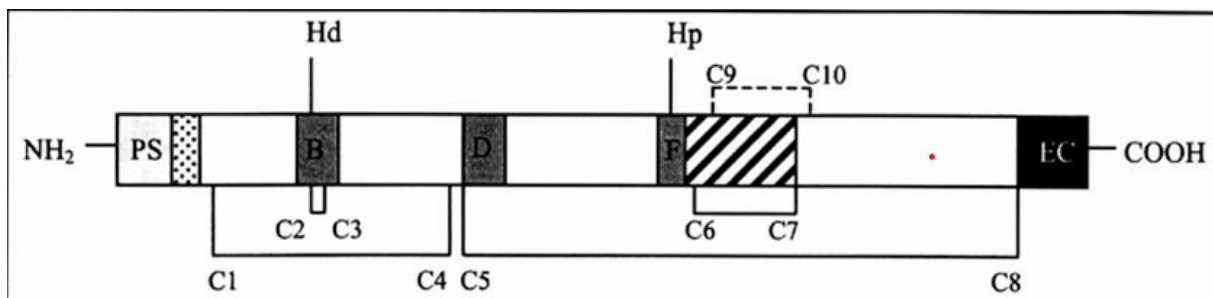


Figure 2: Représentation d'une structure primaire des peroxydases végétale (Delannoy et al., 2004).

La structure tertiaire dit globale des peroxydases, elle est composée de dix hélices alpha forment un groupement prosthétique (hème de type b) et un centre fonctionnel donc c'est deux domaines : l'un distale et l'autre dit proximale connectés entre eux par une vaste boucle où se

situer l'hème. Cette structure est stabilisée par plusieurs ponts telle que les ponts disulfure et pont salin étalier pour lier les deux domaines. Chaque un de ces dernier est caractérisée par la présence d'un site de fixation de calcium qui sont essentielle à l'activité optimal de la protéine (Delannoy et al., 2004).

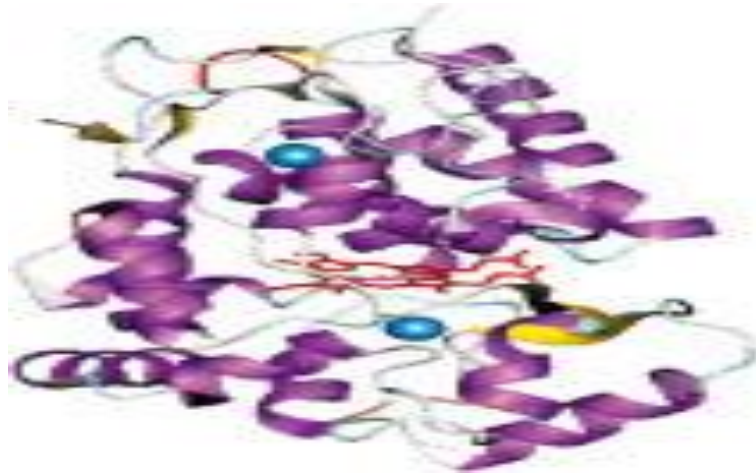


Figure 3:Modélisation en 3D de la construction cristalline des peroxydases végétales (Veitch et al., 2004).

5. Structure de site actif

Le site actif des peroxydases se focalise sur l'hème. A l'état libre de l'enzyme, l'atome de fer ferrique (Fe^{3+}) est associé à quatre atomes d'azote de la protoporphyrine et à une histidine (His 170). Les quatre acides aminés essentielle impliqués dans la catalyse se trouvent sur deux hélices parallèles au plan de l'hème : arginine 38, phenylalanine41 et histidine 42 placée sur l'hélice alpha B et l'histidine 170 sur l'hélice alpha F qui forme une liaison hydrogène avec l'aspartate 247 pour assurer une bonne activité catalytique. En plus, les molécules d'eau impliqué dans la stabilisation de la structure par des interactions hydrogènes établit entre les molécules d'eau (Delannoy et al., 2004).

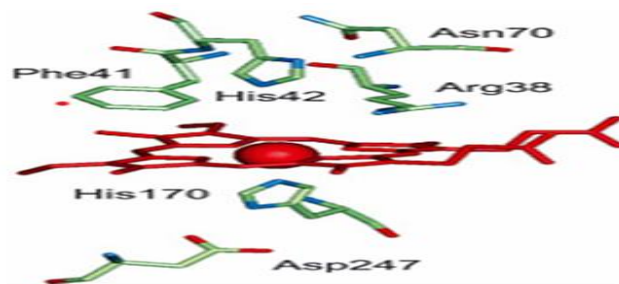


Figure 4:Résidus d'acide aminée dans la région de connexion à l'hème de HRP-C (Veitch et al., 2004).

6. Mécanisme catalytique des peroxydases de classe III

La première réaction de mécanisme catalytique de peroxydases avec le H₂O₂ se déroule à un pH neutre, le H₂O₂ se fixe au fer de l'hème, ce qui provoque un transfert de proton vers l'histidine 42 et la rétention de la charge négative sur l'oxygène restant par l'arginine 48. Par conséquent, l'hydrogène de l'histidine 42 cible l'oxygène, ce qui provoque la rupture hétérolytique de la liaison O-O, la libération d'une molécule d'eau et l'apparition du composé I. Ce dernier renferme un groupement oxyferryl (Fe⁴⁺=O) ainsi qu'un radical cation sur la porphyrine, ce qui apporte deux analogues d'oxydation à l'enzyme à l'état libre. L'interaction entre l'histidine 170 et l'aspartate 247 affecte la stabilité du composé I ainsi que son potentiel redox, ce qui à son tour influence l'activité de la peroxydase (Delannoy et al., 2004).

Au cours de la seconde réaction, l'intermédiaire oxydé réagit avec une molécule de substrat réducteur (AH). Une partie de l'électron est transférée au fer, ce qui produit le composé II suivi par la libération d'un produit radicalaire libre FRP (free-radical product). Dans la dernière étape, le substrat (AH) continue à libérer des électrons et enfin l'enzyme est prié à recommencer un nouveau cycle catalytique (Delannoy et al., 2004).

7. Aspect physiologique des peroxydases de classe III

- Les peroxydases participent dans le métabolisme des parois végétale telle que leur modification et formation, la production de la lignine et de la subérine et la synthèse des radicaux libre (OH) qui favorise la croissance des plantes (Passardi et al., 2005).
- L'activité des peroxydases progresse en cas de stress par divers facteurs comme : UV, métaux lourds, températures élevée ou basse, lésion ... ect (Passardi et al., 2005).
- Les peroxydases protègent les plants contre des agents pathogènes par sa capacité de dégradation de ces derniers et aident également à la symbiose en contrôlent l'interaction avec les champignons et les bactéries (Passardi et al., 2005).
- Dans le phénomène de senescence les peroxydases participent à la décomposition de chlorophylle et des capsaïcinoïdes et des métabolites secondaires (Passardi et al., 2005).

8. Domaines d'application des peroxydases

- **Application environnementale** : élimination des polluants telle que les phénols et amines aromatiques des eaux usées de plusieurs industries (produits chimiques, textile, pâte et papier, raffinage du pétrole...etc) Avant d'être rejetée dans l'environnement (Nicell et al., 1993).

- **Application analytique :** quantification de glucose dans différents échantillons telle nutritionnelle et biologique, détection des antigènes ou anticorps par test ELISA (De Oliveira et al., 2021).
- **Application médicale :** fabrication des kits de diagnostic pour mesurer le taux de cholestérol, d'acide urique et triglycérides (De Oliveira et al., 2021).
- **Application industrielle :** contrôler les teintures des tissus pour la construction des vêtements, fabrication engrais naturel à base de fumier de porc sans odeurs, décomposition de lignine de bois (Hamid et al., 2009).

III. Micro encapsulation

1. Historique

Dans les années 1950, la préparation des microcapsules a été mise en évidence lorsque Green et Schleicher ont réalisé des colorants microencapsulés à partir de coacervation complexe de gélatine et gomme arabique qui sont utilisés dans la production de papier autocopiant. Actuellement, le papier autocopiant est l'un des produits majeurs utilise la technologie de la microencapsulation et continue d'être mise sur le marché. Les avancées technologiques ont mené à élaborer différents produits microencapsulés.

Au fil des années 1960, la microencapsulation du cristal liquide cholestérique par un processus de coacervation complexe à base de gélatine et d'acacia a donné naissance à un matériau d'affichage thermosensible. Cette innovation de l'encapsulation a permis l'élargissement des zones et les angles d'affichage.

Au milieu des années 1970, la microencapsulation est devenu de plus en plus populaire dans le domaine pharmaceutique et également utilisé dans le secteur alimentaire (Dubey et al., 2009 ; Calderón-Oliver et al., 2022).

2. Définition

La microencapsulation c'est une technologie utilisée dans la production de plusieurs produits industrielle. Elle consiste à préparer des particules individualisées composées d'un matériau de recouvrement qui renferme une ou plusieurs substances actives (solide, liquide ou gazeuse). Ces particules sont souvent sphériques ou ovoïdales (Richard et al., 2000). Ont un diamètre compris entre 1 et 1000 μm et contiennent de 5 à 90% (par rapport au poids) de substance active (Dubey et al., 2009). Typiquement, la microcapsule possède le potentiel de transformer et d'améliorer l'apparence et les caractéristiques d'une substance.

Pour être plus précis, la microcapsule a la capacité de maintenir une substance sous forme finement divisée et de la libérer au moment opportun (Shahidi et al., 1993).

3. Types des microcapsules

Les microparticules polymériques sont des particules solides de petite taille qui présentent deux types de structures internes, selon leur microstructure. Elles sont donc classées en deux catégories : les microsphères et les microcapsules (Nesterenko et al., 2013 ; Lengyel et al., 2019).

- Les microcapsules sont des systèmes de stockage sphériques, structuré d'une enveloppe de polymère continue qui englobe un noyau liquide ou solide. Le principe actif est habituellement dissous dans le noyau, mais il peut aussi être adsorbé sur la surface des microcapsules (Nesterenko et al., 2013).
- Les microsphères sont des systèmes matriciels sphériques, contenant une matrice polymère dans laquelle l'agent actif est soit dispersé ou dissous lors de la création des microsphères, soit adsorbé sur leur surface après fabrication par le biais de liaisons covalentes ou électrostatiques (Figure 5B) (Nesterenko et al., 2013).

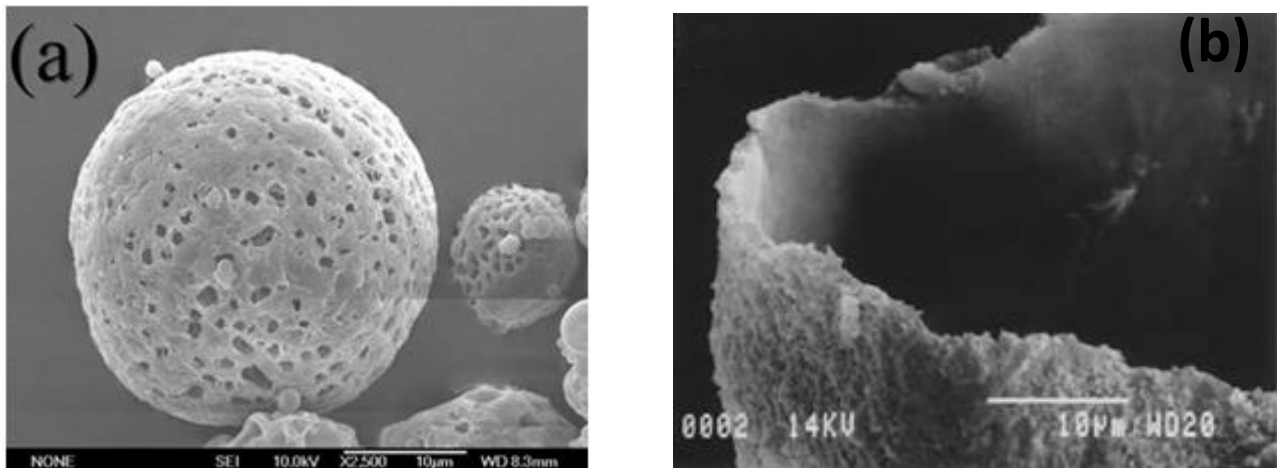


Figure 5: Images obtenues par microscope électronique à balayage des types des microcapsules. (a) microsphère, (b) microcapsule (Theron et al., 2009).

4. Technique d'encapsulation

Il existe nombreuse technique d'encapsulation telle que :

- **Séchage par pulvérisation (Spray Drying)** : Une méthode où le matériau à encapsuler est pulvérisé dans un courant d'air chaud, ce qui permet le séchage rapide des particules, forment ainsi des microcapsules (Risch et al., 1995). Cette technique est la plus économique et la plus utilisée pour l'encapsulation du pétrole à grande échelle (Martins et al., 2017).
- **Coacervation ou séparation de phase** : c'est un processus dans lequel une phase riche en polymère se sépare d'une solution et forme un revêtement autour du matériau de cœur. Cette méthode est principalement utilisée pour l'encapsulation des substance liquide (Risch et al., 1995).
- **Complexation d'Inclusion** : cette technique consiste à encapsuler le matériau de cœur à l'intérieur de la cavité d'une molécule hôte plus grande (comme les cyclodextrines), formant ainsi un complexe d'inclusion (Risch et al., 1995).
- **Évaporation du solvant** : cette méthode consiste à former des microsphères en enrobant un principe actif dans un polymère, grâce à l'évaporation d'un solvant volatil. Ce processus est affecté par plusieurs facteurs (agitation, pH...etc.) (Jyothi et al., 2010).

5. Domaines d'applications de la microencapsulation

- **Dans domaine pharmaceutique** : utilisation des microcapsules dans les vaccins pour le traitement du SIDA, des tumeurs, du cancer et du diabète. Aussi, administration de protéines thérapeutiques telles que l'insuline, l'hormone de croissance et l'érythropoïétine (utilisée pour traiter l'anémie) (Dubey et al., 2009).
- **Dans l'industrie alimentaire** : la microencapsulation permet d'améliorer la stabilité et la biodisponibilité des ingrédients actifs dans les aliments fonctionnels, tout en préservant leur goût, leur texture et leur durée de conservation. Elle facilite également le processus de production et contribue à la réduction des coûts (Gibbs et al., 2009).
- **Dans l'agriculture** : L'encapsulation utilise des agents comme l'arabique de gomme qui permet de délivrer efficacement des phéromones en les protégeant de l'oxydation et de la lumière.

Elle assure une libération contrôlée, optimisant leur efficacité dans la gestion des nuisibles en agriculture, tout en minimisant les pertes (Dubey et al., 2009).

- **Dans la défense :** La microencapsulation a des applications importantes dans la défense, notamment dans les matériaux autoréparants utilisés en aérospatiale, où des microcapsules libèrent un agent réparateur en cas de dommage. Elle est également utilisée pour la création des tissus de protection pour les militaires, avec des microcapsules contenant des agents de décontamination qui neutralisent les agents chimiques toxiques (Dubey et al., 2009).

6. Encapsulation par émulsion/évaporation de solvant

Selon la définition de l'IUPAC, « International Union of Pure and Applied Chemistry », une émulsion est une dispersion colloïdale d'un liquide sous forme de petites gouttes (phase discontinu ou dispersée) dans un autre liquide non miscible (phase continu ou dispersante), comme l'huile et l'eau. En général, on ajoute un agent tensioactif pour empêcher la séparation des deux phases et de garantir la stabilité de l'interface de l'émulsion (Agnihotri et al., 2012).

La technique la plus fréquemment adoptée pour générer des microparticules et nanoparticules ou pour l'encapsulation de substances actives, est celle d'évaporation du solvant par double émulsion (Iqbal et al., 2015), cette méthode repose sur le transfert et l'évaporation de la phase interne d'une pseudo-émulsion sous agitation (Richard et al., 2000).

Dans cette méthode, un polymère hydrophobe et biodégradable, est d'abord dissous dans un solvant organique et volatil, puis la solution contenant le principe actif est émulsifiée sous agitation avec la solution du polymère. Cela permet d'obtenir une première émulsion. Ensuite, cette dernière est ajoutée goutte à goutte, sous une agitation dans la phase aqueuse externe contenant un surfactant afin de former une double émulsion (Li et al., 2008).

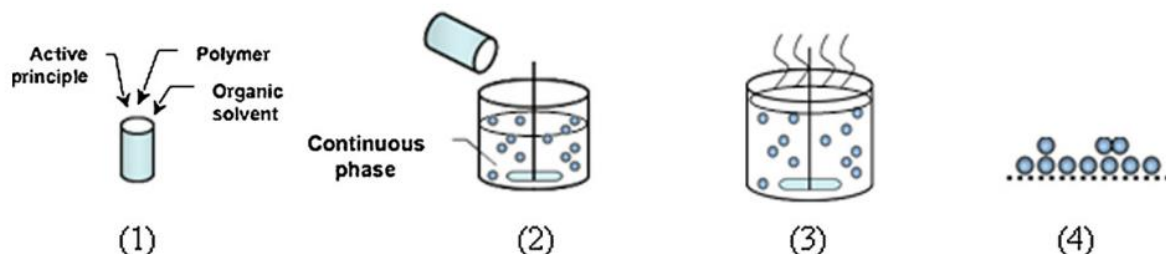


Figure 6: Schéma du procédé d'encapsulation par précipitation/évaporation. 1- la mise en contact entre les deux phases. 2- la formation d'une pseudo-émulsion. 3- le transfert puis l'évaporation du solvant. 4- la formation des capsules solides (Li et al., 2008).

Matériel et méthodes

I. Matériel

1. Produits chimiques

Acide citrique $C_6H_8O_7$ (0.5M), Sodium phosphate Na_2HPO_4 (0.5M), Albumine sérique bovine (BSA), Bleu de comassie R250 (Bio-Rad), L'alcool éthanol à 95%, acide phosphorique H_3PO_4 , acide Poly-lactique (PLA ; PM : 150000 g/mol, densité : 1,21 g/cm³), l'alcool polyvinylique (PVA ; PM, 13 000– 23 000g/mol), Gaïacol (2-méthoxyphénol), le dichlorométhane (DCM), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

2. Appareillage

Une plaque chauffante a été utilisée pour chauffer les solutions et préparer le tampon, une balance pour peser les masses des produits à utiliser, un Ultra turrax (IKA T18 basic, ;Allemagne) pour la dispersion des peroxydases du navet blanc (*Brassica rapa* L), un spectrophotomètre UV-visible pour la détermination l'activité enzymatique , une centrifugeuse pour séparer les phases des extraits et récupérer le culot (NUVE SANAYI ,Turquie),un microscope optique pour analyser la morphologie des microcapsules, un étuve de séchage et de chauffage est utilisé pour le séchage des microcapsules du l'extrait brut (78532 Tutlingen/Germany), PH mètre permettant la mesure du pH d'une solution , un granulomètre laser Analysette 22"NanoTec (Fritsch,Germany) pour la détermination de la taille des microcapsules, spectromètre FT-IR (Affinity-1 IR spectrometer, CE, Shimadzu, Japan) a été utilisé pour analyser les fonction chimique des microcapsules.

3. Echantillon végétal

La présente étude s'est portée sur la variété de navet *Brassica rapa. L* provenant du marché local de la ville de Bejaia. Le légume a été bien lavé à l'eau courante afin d'éliminer les résidus de poussière. Par la suite, les tiges ont été séparées des racines pour leur utilisation dans cette étude.

II. Préparation de l'extrait brut du navet blanc

Les racines de navet blanc ont été lavées et broyées puis mélangé avec 200 mL du tampon phosphate -citrate. Ensuite le mélange a été homogénéisé à l'aide d'ultra-turrax, puis le mélange a été filtré pour éliminer les particules solides du navet et récupérer le filtrat (l'extrait brut).

III. Détermination de la concentration de protéines totales

La méthode de Bradford (Bradford et al., 1976) a été utilisée pour mesurer la concentration des protéines. À cet effet, 2500 µL du réactif de Bradford ont été combinés avec 1000 µL de l'extrait de navet. Après l'agitation, le mélange a été incubé à l'obscurité pendant 10 minutes. Ensuite On a ajouté le sérum l'albumine bovine (BSA) comme référence et les mesures des absorbances ont été effectuées à 595 nm. La concentration en protéines est indiquée en milligrammes d'équivalent BSA pour chaque 100 g de matière fraîche.

IV. Détermination de l'activité enzymatique

L'activité des peroxydases est mesurée selon la méthode de Lobarzewski, les mesures ont été déterminés en présence de peroxyde d'hydrogène et de gaïacol pendant 1min à l'aide d'un spectrophotomètre qui permis de mesurer l'absorbance du tétra-gaïacol à une longueur d'onde de 470nm (Lobarzewski et al., 1990), puis l'activité enzymatique a été calculée selon la formule suivante :

$$nKat/gMF = \frac{\Delta DO \times Vr \times Ve}{\Delta t \times P \times \lambda \times I \times MF}$$

Telle que : ΔDO : Variation de densité optique (ou absorbance), V_r : Volume réactionnel, V_e : volume d'essai, Δt : Intervalle de temps, P : pris d'essai, λ : longueur d'onde, I : longueur de la cuve (1cm), MF : masse de matière fraîche.

V. Préparation des microcapsules

Les microcapsules ont été préparés par la méthode de la double émulsion évaporation de solvant décrite par Zheng (Zheng, 2016) avec quelques modifications. Ainsi, l'aqueuse interne de l'extrait de navet (5mL) a été mélangée avec 5mL de dichlorométhane comportant la quantité sélectionnée d'acide poly-lactique dissous (PLA). Cette émulsion initiale (W1/O) a été ajoutée à 20mL d'une solution d'alcool polyvinylique (PVA) (0,1-3%) servant d'émulsifiant. Une émulsion double stable (W1/O/W2) a été réalisée grâce à une agitation constante (500 tours par minute) durant deux heures. Suite à trois lavages à l'eau distillée, les microcapsules obtenues ont été séparées par centrifugation pendant 15 minutes à une vitesse de 5000 rpm, puis elles ont été lyophilisées à froid à -60 °C.

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

1. Conception expérimentale

Dans cette étude, trois paramètres quantitatifs ont été considérés comme facteurs indépendants pour évaluer l'optimisation de l'efficacité d'encapsulation de l'extrait de navet (*Brassica rapa, L*) par la méthode RSM selon un plan expérimental de Box-Behnken à savoir la concentration de PVA (X_1 ; 0.1-3 %) (Dahdouh et al., 2021), la concentration de PLA (X_2 ; 30-70 mg) (Zheng et al., 2016) et la température (X_3 ; 4 - 42 °C) (Freitas et al., 2004). La variable dépendante étudiée était l'efficacité d'encapsulation (%).

2. Construction et validation du modèle

L'analyse des données expérimentales ont été effectués par la méthode de régression de surface de réponse de JMP 18 (système d'analyse statistiques Inc., SAS). L'évaluation des modèles mathématiques a été réalisée via l'ANOVA, et les données expérimentales ont été adaptées à un modèle polynomial de deuxième ordre, les coefficients de régression appliqué dans l'évaluation de la surface de réponse ont été dérivés de l'équation générale ci-dessous (équation 1).

$$y = \alpha_0 + \sum_{i=1}^3 \alpha_i x_i + \sum_{i=1}^3 \alpha_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 \alpha_{ij} x_i x_j (i \neq j) \quad (Eq1)$$

Dans cette équation, α_0 , α_i et α_{ij} correspondent aux coefficients de régression associés aux termes d'interception, linéaire, quadratique et d'interaction respectivement ; x_i et x_{ij} désignent les variables indépendantes.

Le modèle de régression par la suite été ajusté sur les données expérimentales élaboré pour bien saisir la relation entre chaque élément et les diverses réponses. L'efficacité d'encapsulation de l'extrait brut du navet était liée à la concentration de PVA, concentration de PLA et à la température. Ces paramètres ont été déterminés à l'aide de l'équation prédictive de la RSM. On a comparé les résultats expérimentaux et prédits des réponses afin d'évaluer la pertinence du modèle. Afin d'optimiser la mesure de l'efficacité d'encapsulation, nous avons utilisé une méthodologie de surface de réponse, basée sur le plan Box-Behnken (BBD). Les niveaux des facteurs ont été codé de la manière suivante : - (faible), 0 (centre) et + (élevé). L'expérimentation a été menée en double, et les résultats de 15 tests figurent dans le tableau III.

Tableau III: Représente les facteurs et les niveaux pour la méthode de surface de réponse basée sur le plan expérimental Box-Behnken (en niveaux codés de trois variables).

Numéro de teste	Configurations	Les paramètres		
		X ₁	X ₂	X ₃
1	-0-	0,1	50	4
2	0+-	1,55	70	4
3	0	1,55	50	23
4	0	3	70	23
5	+0-	3	50	4
6	0--	1,55	30	4
7	--+0	0,1	70	23
8	0	1,55	50	23
9	--0	0,1	30	23
10	+0+	3	50	42
11	0-+	1,55	30	42
12	+--0	3	30	23
13	0	1,55	50	23
14	0++	1,55	70	42
15	-0+	0,1	50	42

Avec : X₁ c'est la concentration de PVA (%) ; X₂ la masse d'acide poly-lactique (mg) ; X₃ la température (°C).

VII. Caractérisation des microcapsules

1. Calcul de l'efficacité d'encapsulation

La détermination de taux de l'efficacité d'encapsulation nécessite le pourcentage entre l'activité enzymatique initiale mesurée dans l'extrait brute et l'activité enzymatique après l'encapsulation (Rentería-Ortega et al., 2025). Selon la méthode Rentería-Ortega avec quelques modification, l'activité enzymatique a été mesurée dans l'extrait brute et le surnagent après le lavage des microcapsules (Rentería- Ortega et al., 2021) L'équation employée afin de déterminer l'efficacité d'encapsulation (EE) a été :

$$EE\% = \frac{\text{Activité enzymatique après encapsulation}}{\text{Activité enzymatique iniale}} \times 100$$

2. Analyse de la morphologie des microcapsules

L'observation de la morphologie des microcapsules a été effectuée sous le microscope optique (avec l'objectif 10×10, 10×40 et 10×100).

3. Analyse de taille des microcapsules

La détermination de la forme des microcapsules nécessite la dissolution des microcapsules dans l'eau distillé avec les valeurs d'indices de réfraction de l'eau qui est 1,33 puis la solution obtenue a été analysée à l'aide d'un granulomètre laser Analysette 22"NanoTec qui détermine le Span, une mesure mathématique qui définissant la répartition des dimensions, comme suit : $= d(0,90) - [d(0,10) / d(0,50)]$; ici, $d(0,10)$, $d(0,50)$ et $d(0,90)$ représentent respectivement un diamètre de particules correspondant à 10 %, 50 % et 90 % de l'échantillon cumulatif. La portée, qui correspond à une valeur mathématique indiquant la largeur de la distribution granulométrique, a été déterminée de la manière suivante :

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

4. Analyse par spectroscopie FT-IR

Le principe de la technique de la spectroscopie FT-IR (Fourrier Transformed Infra Red) repose sur le rayonnement infrarouge absorbé pour examiner les différentes fonctions chimiques existe dans les microcapsules et l'extrait brute de navet. Pour cela, la détection des vibrations des caractéristiques des liaisons chimiques a été effectuée et le spectre de transmittance a été capturée dans la gamme de 400 à 4000 cm^{-1} .

5. Détermination de l'activité enzymatique des peroxydases avant et après l'encapsulation

La détermination de l'activité enzymatique de l'extrait brut de navet blanc avant et après encapsulation consiste d'abord à préparer un tampon réactionnel par ajout de 100 μL de gâicol et 50 μL de H_2O_2 à un volume de 50 mL de tampon phosphate citrate (0,5M). Ensuite, 20 μL de l'extrait brute encapsuler ou non encapsuler a été ajouté à 980 μL de tampon réactionnel préparée. Les absorbances ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis à 470nm.

Résultats et discussion

I. Optimisation de l'efficacité d'encapsulation

Cette étude a pour objectif de déterminer l'effet de l'encapsulation sur l'activité des peroxydases du navet blanc (*Brassica rapa*. L). Pour ce faire, l'optimisation des trois facteurs (concentration de PLA, concentration PVA, température) influencent sur l'encapsulation a été réalisée. Dans ce travail, un plan d'expérimentation Box-Behnken impliquant trois facteur (X_1 , X_2 et X_3) et trois niveaux (-1, 0, +1) a été utilisé. En déterminant le taux d'encapsulation à l'aide du logiciel JMP pour analyser tous les résultats.

1. Analyse de modèle

Grace à la représentation graphique du diagramme de parité comparatif entre les valeurs prédites et expérimentales (Figure 07), le modèle quadratique a été vérifié. Le coefficient de détermination R^2 , élevé à 0,95 ce qui favorise l'obtention d'une droite de corrélation entre ces deux variables de plus, le coefficient de détermination ajusté R^2 atteint également un niveau important qui est à 0,9982, ce qui indique la réussite d'ajustement du modèle de régression. Dans cette étude, la différence entre R^2 et R^2 ajusté est de 0,04 ce qui signifie que le modèle est adéquat car 0,04 se situe entre 0 et 0,20 (Moghddam et al., 2016). L'écart entre les taux d'encapsulation expérimentaux et ceux prévus par le modèle, qui représente les résidus en fonction des valeurs prédictives.

La figure 07, montre que tous les points sont proches de la droite de régression, ce qui confirme que le modèle évalue avec précision l'efficacité de l'encapsulation en fonction des paramètres sélectionnés.

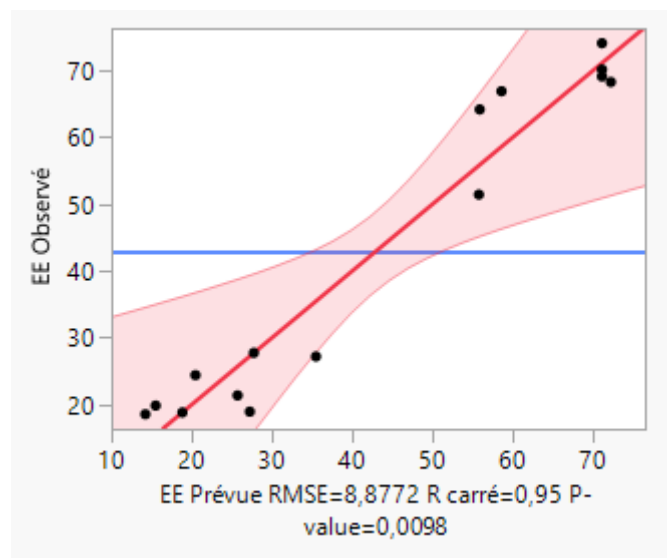


Figure 7: Diagramme de parité comparatif entre les valeurs prédites et expérimentales.

A l'aide de logiciel JMP, une analyse de la variance a été réalisé pour confirmé le modèle quadratique qui analyse le taux d'encapsulation de l'extrait de navet blanc dans la PLA. Le tableau 04 résume les résultats des analyses statistiques ANOVA de la variance.

D'après le tableau 04 qui montre des performances très satisfaisantes pour l'efficacité d'encapsulation, avec un coefficient de corrélation (R^2) est élevée à 0,95 et coefficient de corrélation ajusté ($Aj R^2$) correspondante est de 0,9982 et la valeur de P est de 0,0098, selon la littérature, si le R^2 est proche de 1 et $P < 0,05$ on dis que le modèle est significative et explique fortement les données expérimentale (Lestari et al., 2023 ; Aliemeke et al., 2024). La valeur F est de 7664,85 une grande valeur par rapport à la valeur de P (0,0098) qu'est très petite, ce qui signifie que le modèle est très significatif (Azouz et al., 2016). Les présentes résultat indiquent que ces trois paramètres ont un effet important sur la réponse d'efficacité d'encapsulation (EE).

Tableau IV : ANOVA pour l'impact de la concentration de PVA, la masse de PLA et la température sur l'efficacité d'encapsulation.

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Rapport F	Prob. > F
X ₁ (0,1,3)	1	915,06	11,61	0,0191*
X ₂ (30,70)	1	196,71	2,49	0,175
X ₃ (4,42)	1	1834,05	23,27	0,0048*
X ₁ *X ₂	1	524,86	6,66	0,0494*
X ₁ *X ₃	1	529,92	6,72	0,0487*
X ₂ *X ₃	1	100,50	1,27	0,31
X ₁ *X ₁	1	1906,03	24,18	0,0044*
X ₂ *X ₂	1	1052,42	13,35	0,0147*
X ₃ *X ₃	1	674,71	8,56	0,0328*
Model	9	7284,56	10,27	0,0098*
Défaut d'ajustement	3	380,28	18,44	0,0519
$R^2 = 0,95$				
Ajustement $R^2 = 0,9982$				

X₁ c'est la concentration de PVA (%) ; X₂ la masse d'acide poly-lactique (mg) ; X₃ la température (°C).

Dans le but d'optimiser l'efficacité d'encapsulation de l'activité des peroxydases d'extrait du navet blanc par la technique de la double émulsion en modifiant la concentration de PVA, PLA et la température, on a effectué une analyse basée sur la méthode Box-Behnken de surface de réponse (RMS). Selon les données présentées dans le tableau, l'efficacité d'encapsulation variait entre 18,81% et 73,98 %. Le tableau 05 montre l'analyse de la variance du modèle et le coefficient de régression de l'efficacité d'encapsulation ainsi que le manque d'ajustement. La valeur p est de 0,0098 indique que le modèle élaboré est significatif. Le R^2 qui représente une valeur de 0,95, selon la littérature, une droite de corrélations obtenue avec un coefficient de détermination qui est proche de 1 et le coefficient de détermination ajusté également élevé $R^2_{Aj} = 0,99$ qui témoignent et confirment une bonne adéquation du modèle de régression (Noronha et al., 2013). Le défaut d'ajustement de 0,0519 qui est non significatif indique que le modèle est validé. Afin d'obtenir une équation mathématique appropriée, on a ajusté les valeurs mesurer dans un modèle quadratique et on utilise la méthodologie des moindres carrés pour calculer le coefficient de régression des termes linéaire, interception, quadratique et d'interaction du modèle comme l'indique le tableau ci-dessous. Le tableau 05 montre que les termes linéaire, quadratique et d'interaction pour les trois facteurs sont significatifs ($P < 0,05$) (Azouz et al., 2016), tandis que le terme linéaire PLA et d'interaction de PLA-Température n'est pas significatifs. Nous avons également constaté que les termes linéaires ont un effet positif sur l'efficacité de l'encapsulation par contre les termes quadratiques ont une influence négative. Ce qui montre que l'efficacité d'encapsulation augment de façon proportionnelle avec le facteur de température et diminue lorsque les températures sont très élevées. Nous avons obtenu le modèle quadratique final pour l'efficacité d'encapsulation en utilisant l'équation suivante :

$$EE = 71,01 + (-10,69x_1) + (-4,96x_2) + (15,14x_3) + 11,46x_1x_2 + (-11,51x_1x_3) \\ + (5,01x_2x_3) + (-22,72x_1^2) + (-16,88x_2^2) - (13,51x_3^2)$$

Où x_1 la concentration de PVA (%); x_2 la concentration de PLA (mg/ml); x_3 la température; EE l'efficacité d'encapsulation (%).

Tableau V : Estimation des coefficient, erreurs standards et rapport de teste t de la surface de l'efficacité d'encapsulation.

Paramètre	Estimation	Erreur standard	Rapport t	Prob. > t
Constante	71,013	5,13	13,86	<,0001*
X ₁ (0,1,3)	-10,69	3,14	-3,41	0,0191*
X ₂ (30,70)	-4,96	3,14	-1,58	0,175
X ₃ (4,42)	15,14	3,13	4,82	0,0048*
X ₁ *X ₂	11,45	4,44	2,58	0,0494*
X ₁ *X ₃	-11,51	4,43	-2,59	0,0487*
X ₂ *X ₃	5,01	4,43	1,13	0,3100
X ₁ *X ₁	-22,72	4,62	-4,92	0,0044*
X ₂ *X ₂	-16,88	4,61	-3,65	0,0147*
X ₃ *X ₃	-13,52	4,61	-2,93	0,0328*

X₁ c'est la concentration d'acide polyvinylique (%) ; X₂ la masse d'acide poly-lactique (mg) ; X₃ la température (°C).

2. Analyse de la surface de réponse

Les graphes des surfaces de réponse tridimensionnelles permettent de représenter les interactions entre les trois facteurs indépendants et le taux d'efficacité d'encapsulation (figure 8).

La figure 8a montre la représentation graphique de la surface tridimensionnelle pour les deux facteurs, la concentration de PVA et PLA sur la réponse. Le taux d'efficacité d'encapsulation augment jusqu'à atteindre au maximum (73,98%) par l'augmentation de la concentration de PVA, qui est l'agent stabilisant dans la formation des microparticules de polymère, vu qu'il joue un rôle dans le contrôle de la taille des capsules et la cinétique de libération (Xie et al., 2014). En plus, la concentration de PVA est élevée permettant de réduire la tension interfaciale entre deux phases ce qui facilite la formation d'émulsion plus stable et microcapsules plus petites grâce à l'augmentation de la surface des microparticules de PLA (Yeo et Park, 2004 ; Vj et al., 2014). Par contre quand la concentration de PLA augmente le taux d'efficacité d'encapsulation diminue. Ceci pourrait être attribué à la durée prolongée requis pour la précipitation du polymère utilisé et aussi pourrait être due à l'existence d'une plus grande

quantité de polymère PLA pour encapsuler l'extrait, ce qui n'aboutit pas à une saturation de l'encapsulation. (Budhian et al., 2005 ; Krishnamachari et al., 2007).

La figure 8b représente la surface de réponse d'effet interactif de deux facteurs la concentration de PVA (X_1) et de température (X_3) sur le taux d'efficacité d'encapsulation (EE%). Le taux d'efficacité d'encapsulation atteint le maximum environ 80% avec l'augmentation de concentration de PVA de 0,1 à 1,55 % et de température de 4°C à 23°C, au-delà de ces valeurs des deux facteurs la réponse diminue. Cette diminution probablement due à la présence d'un revêtement de PVA qui enveloppe la protéine dans la microcapsule. Une étude récente suggère qu'une concentration de tensioactif (PVA) plus élevée provoque une haute viscosité dans la phase fluide externe, pour cela les chercheurs ont préféré d'utiliser le PVA à des petites concentrations et pour éviter les résidus formés sur les surfaces des microcapsules par ce qu'il n'y a pas de normes fixes de cette concentration (Lie et al., 2008). D'autre part la température élevée peut entraîner l'évaporation rapide de solvant qui peut être la raison de la diminution d'efficacité d'encapsulation selon ce qui est décrit par Yang & Chung lors de la préparation des microcapsules chargées de BSA (Yang et al., 2000).

L'influence de la concentration de PLA (X_2) et de la température (X_3) sur l'efficacité d'encapsulation est représentée sur la figure 8c. L'efficacité d'encapsulation augmente progressivement jusqu'à atteindre leur maximum (73,98%) avec l'augmentation de la concentration de PLA de 30 mg/ml à 50 mg/ml et de température de 4°C à 23°C. Au-dessus de ces valeurs, la réponse diminue. Dans une étude similaire sur la préparation des microparticules de poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) il a été rapporté qu'une concentration élevée de PLA dissous augmente la viscosité de la phase organique ce qui réduit la vitesse d'agitation de la solution (Jeffery et al., 1991), cela peut être la raison principale de la diminution de l'efficacité d'encapsulation. Selon la recherche effectuée par Yang en 2000 (Yang et al., 2000), les faibles températures au cours de la préparation des microcapsules influencent positivement l'efficacité d'encapsulation puisqu'elle réduit plusieurs facteurs tels que le paramètre de solubilité du principe actif et de sa rapidité de diffusion vers la phase aqueuse externe, cela limite l'échappement. Encore d'avantage, une température basse accélère la solidification d'une membrane polymérique efficace qui piège les molécules encapsulées, ce qui améliore considérablement l'efficacité de l'encapsulation (Jeffery et al., 1991).

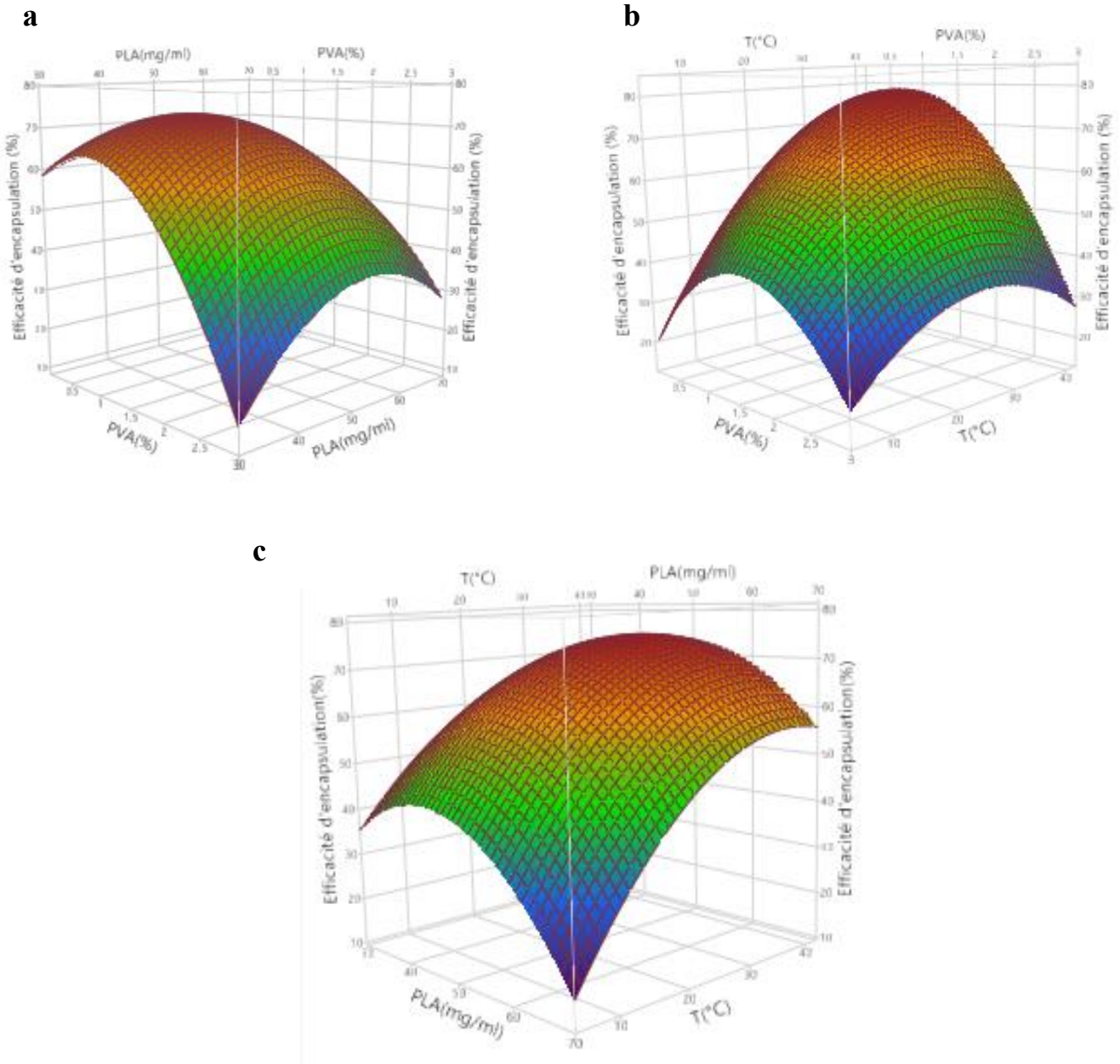


Figure 8: Présentation de la surface de réponse tridimensionnelle des effets interactifs entre la concentration de PVA et la concentration de PLA (a), la concentration de PVA avec la température (b) et la concentration de PLA avec la température (c) sur l'efficacité d'encapsulation.

3. Validation de modèle

Les valeurs optimales de trois facteurs qui influencent sur l'efficacité d'encapsulation de l'extrait enzymatique sont obtenues par le profileur de désirabilité de JMP. Les conditions adéquates qui ont manifesté sur l'efficacité d'encapsulation maximale de 73,98%. Sont 1,55 % pour la concentration de tensioactif PVA, 50 mg/mL de polymère

PLA et une température de 23°C. Après la comparaison de taux d'efficacité d'encapsulation expérimentale et prédite $71,01 \pm 2.6 \%$ on conclut que les valeurs expérimentales présentent une forte similarité à celle prédite ce qui signifie la validation du modèle de prédiction développé.

VIII. Analyse de la morphologie des microcapsules

La morphologie des microcapsules contenant les peroxydases de navet blanc préparées dans des conditions optimales est illustrée par microscope optique (avec les objectifs 10×10, 10×40 et 10×100) (Figure 09). Les images révèlent des structures ovales et la surface de certaines microcapsules présente de multiples plis et rainures dont la distribution de taille est hétérogène. Ceci suggère que la peroxydase était correctement dispersée au niveau moléculaire à l'intérieur des microparticules de PLA. Cette interprétation est en accord avec les résultats d'autres études (Abdelwahed et al., 2006 ; Holz et al., 2018 ; Muneer et al., 2021). La forme pourrait être le résultat de plusieurs facteurs, elle peut être le résultat des mouvements turbulents de l'agitation lors de la formation de la paroi, ce qui provoque l'accumulation des matériaux aux extrémités avant et arrière de la particule par rapport aux côtés situés à 90° de ces points (Kanellopoulos et al., 2016). La surface ridée probablement due aux conditions de séchage (Corrêa-Filho et al., 2019), ou peut être attribué à la déshydratation lors de la lyophilisation (Tang et al., 2022).

Selon les analyses effectuées par Jin-Wook Yoo des images de microscope électronique à balayage (MEB) des particules de PLGA qui changent de forme, mettent en évidence des microparticules de forme de « disque elliptique » obtenue à des faibles températures (Yoo et al., 2011), aussi lorsque la solution recuite est laissée à refroidir à température ambiante les microparticules reprennent une configuration ovale (Yang et al., 2005).

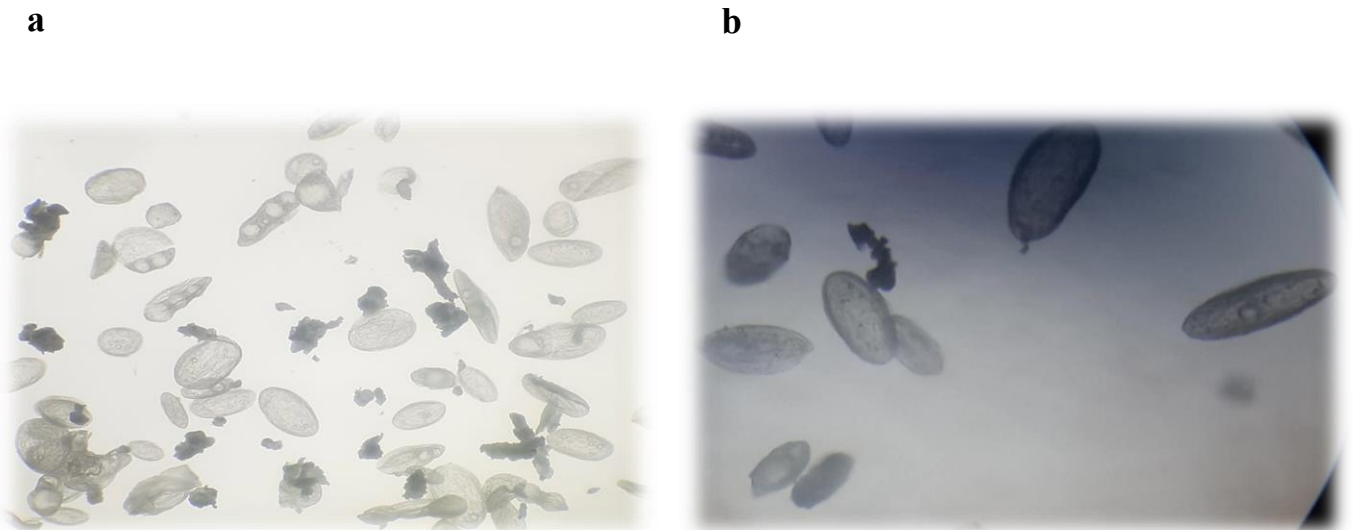




Figure 8: Morphologie des microcapsules chargée de l'extrait de navet blanc sous microscope optique à différentes échelles (a : grossissement 10×10, b : grossissement 10×40, c : grossissement 10×100).

IX. Taille des microcapsules

Grace à l'analyse par diffraction laser les résultats sont présenté dans la figure 10, les valeurs obtenues montrent que les termes $d(0.1)$, $d(0.5)$, $d(0.9)$ étaient respectivement de 77 ± 4 , 209 ± 2 , 332 ± 3 qui calcule un intervalle de 1,22. Selon la littérature, l'intervalle inférieur à 2 montrant une distribution granulométrique étroite autour de diamètre moyenne des microcapsules (Barboza et al., 2014). Selon les résultats trouver dans la littérature, la taille des microcapsules est affectée par la condition de fabrication telle que la concentration d'extrait à encapsuler, la vitesse d'agitation, la concentration de polymères employé, la vitesse de refroidissement et le procédé de séchage (Rocha-Selmi et al., 2013).

Dans une étude similaire sur la micro encapsulation des beta carotène dans la gomme arabique, la taille des microparticules supérieure à $10\mu\text{m}$ a été observer avec l'augmentation de la concentration de matériaux de la paroi, ce qui peut attribuer à la viscosité élevée de la suspension de coeurs (Corrêa-Filho et al., 2019). En plus, la dispersion de la taille des particules est déférente en raison de la quantité de polymère utilisée et la concentration de stabilisant (PVA) présent dans la phase aqueuse externe qui peut augmenter la viscosité par la diminution de volume d'émulsion. Cela influence la taille des gouttelettes pendant l'évaporation (Ibraheem et al., 2014).

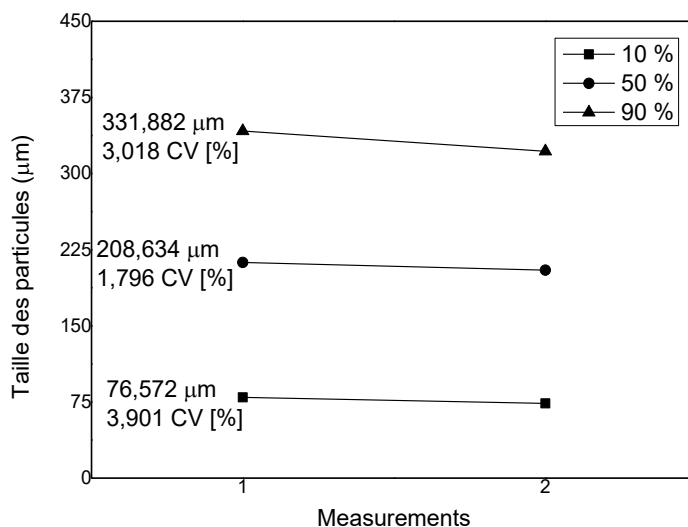


Figure 9: Représentation graphique de la distribution de la taille des capsules.

X. Analyse de spectre FT-IR

La caractérisation de microparticules de PLA chargées en peroxydases de navet blanc a été réalisée par FT-IR dans la gamme de longueurs d'onde de 400 à 4 000 cm^{-1} , afin de déterminer la présence des peroxydases dans les microcapsules de PLA et d'étudier les liaisons chimiques et les groupes fonctionnels à la surface des particules (figure 11). L'analyse de l'extrait enzymatique encapsulé révèle qu'un pic fort à 1751 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'étirement C = O (Sahadevan et al., 2016). De même, les pics à 1182 et 1084-1134 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations du squelette benzénique et aux vibrations d'étirement de la liaison éther. À noter que des pics d'intensité variable ont été observés autour de 1080 cm^{-1} , qui sont attribués à l'étirement CO des acides carboxyliques, esters, et anhydrides (Kong et al., 2007). Les bandes d'étirement CH_2 asymétriques et symétriques sont respectivement associées aux caractéristiques de 3029,46 cm^{-1} et 2868,85 cm^{-1} (Mizutani et al., 2004). Les pics d'absorption spécifiques des spectres de l'extrait enzymatique pur et de l'extrait encapsulé n'ont pas été détectés dans le spectre PLA, ils correspondent au pic de la bande 3290 cm^{-1} qui représente l'étirement NH de l'amine ou l'amide (Barth et al., 2002). Le pic de la bande 620,55 cm^{-1} est associé à la flexion OCN et le pic à 1571,14 cm^{-1} correspond à la vibration de flexion NH_2 (Bai et al., 2011), principalement induite par les protéines. Ces résultats démontrant

l'existence des peroxydases dans le polymère PLA et leurs groupes fonctionnels qui garantiront leur réactivité potentielle.

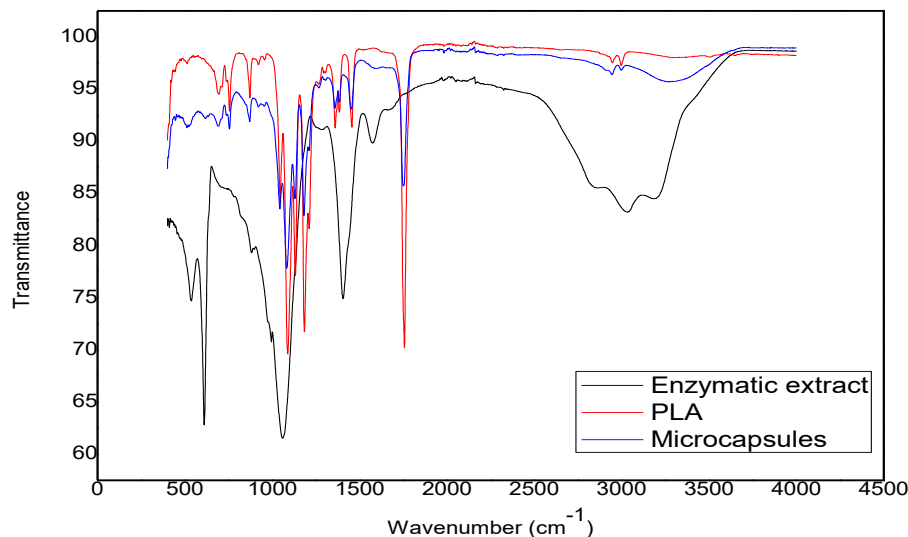


Figure 10: Spectre infrarouge à transformée de Fourier du PLA, d'extrait brut et des microcapsules.

XI. Activité enzymatique avant et après encapsulation des peroxydases

D'après les résultats obtenus sur l'activité enzymatique des peroxydases avant est après l'encapsulations (figure 12), montrant que l'activité enzymatique est conservée environ de 91% dans les microcapsules par rapport aux taux d'encapsulation qui est de $71,01 \pm 2.6 \%$, Cette réduction est cohérente, car l'immobilisation entraîne souvent une diminution de l'activité enzymatique, mais améliore la stabilité et prolonge la disponibilité de l'enzyme, également peut être en raison des interactions créée entre le principe actif et les matériaux d'encapsulation (Ibarra-Escutia et al., 2010 ; Weng et al., 2024). La capacité à maintenir l'activité enzymatique pendant et après l'encapsulation dépend des caractéristiques du matériau de support sélectionné. Ces caractéristiques peuvent être physiques, telles que la résistance à la compression et l'hydrophilie, ou chimiques, notamment l'inertie aux réactions enzymatiques et la biodisponibilité. De plus, le matériau de support doit présenter des propriétés telles qu'une porosité élevée, une biodégradabilité et une petite taille de particules pour optimiser l'efficacité de l'encapsulation (Sharma et al., 2022). Selon les recherches effectuées par Vail l'activité

enzymatique diminue à cause de la membrane de la capsule qui rend la diffusion de substrat difficile (Vail et al., 2005).

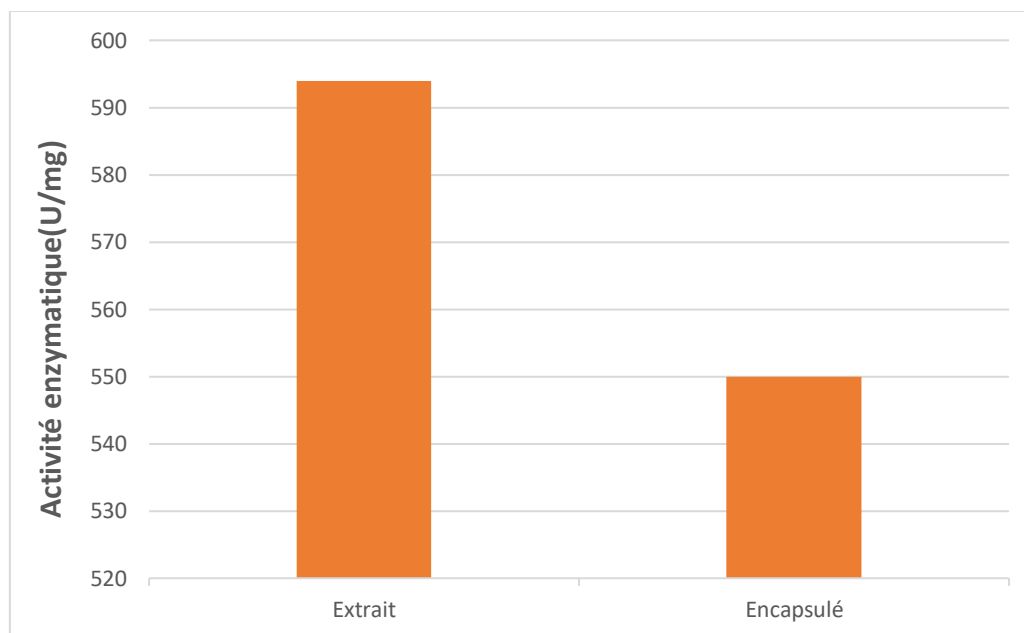


Figure 11: Comparaison de l'activité enzymatique de l'extrait libre et des microcapsules.

Conclusion et prescriptive

Conclusion et perspectives

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.

En premier lieu, un plan d'expérience à trois niveaux « Box- Behnken » par logiciel JMP a été employé pour déterminer les bons facteurs d'encapsulation. Les facteurs fixés étaient la concentration de PVA (%), la quantité de polymère PLA (mg), la température (°C) et l'efficacité d'encapsulation (%) comme réponse. Les conditions optimales obtenues sont les suivantes : 1,55 % de PVA, 50 mg de PLA, 23 °C pour la température avec un taux d'efficacité d'encapsulation de $71,01 \pm 2.6$ %. En deuxième lieu, l'étude morphologique des microcapsules par microscope optique montrant une forme ovale avec la surface de certaines microcapsules présente des rides comme formulation optimale. Ensuite, une analyse de la taille à l'aide d'une diffraction laser révèle une distribution granulométrique étroite autour du diamètre moyenne des microcapsules. La spectroscopie FT-IR indique la présence de principe actif à l'intérieure des microcapsules. Au dernier lieu, nous avons mesuré l'activité enzymatique de l'extrait brut de navet et celle de l'extrait encapsulé, le résultat indique une grande concentration de l'activité enzymatique de 91% après l'encapsulation dans le polymère de PLA. Ces travaux offrent donc une plateforme étendue pour le développement des procédés d'encapsulation destinés à l'application biotechnologique de ces enzymes végétales.

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 :

- Il est suggéré d'examiner la stabilité des peroxydases encapsulées dans divers contextes environnementaux (pH, vitesse d'agitation, durée de conservation, ...) afin de mieux comprendre leur potentiel d'utilisation.
- Analyser la libération contrôlée de l'enzyme dans des contextes simulés ou réels, afin d'évaluer son efficacité dans des usages précis comme le traitement des eaux, les élaborations alimentaires...etc.

- Utilisation dans des domaines de santé comme un agent antioxydant afin de traiter les troubles associés au stress oxydatif.
- Tester des nouvelles procédures d'encapsulation comme la nanoencapsulation et ou la lyophilisation pour estimer l'efficacité d'encapsulation, la stabilité des enzymes encapsulées et leur rendement.

Références bibliographiques

A

Abdel-Farid I B, Kim H K, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic Characterization of Brassica Rapa Leaves by NMR Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007;55(19):7936–7943. <https://doi.org/10.1021/jf071294b>.

Abdelwahed W, Degobert G, Fessi H A. Pilot Study of Freeze Drying of Poly(Epsilon-Caprolactone) Nanocapsules Stabilized by Poly(Vinyl Alcohol): Formulation and Process Optimization. *International Journal of Pharmaceutics* 2006;309(1–2):178–188. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.003>.

Agnihotri N, Mishra R, Goda C, Arora M. Microencapsulation – A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012;02(01):01–20. <https://doi.org/10.35652/IGJPS.2012.01>.

Alamy T. *Le guide pratique des légumes; Les jardifiches*; Éditions “Ouest-France”: Lille Rennes, 2016.

Aliemeke B N G, Okwudibe H A, Omoakhalen A I, Major P. Box-Behnken Optimization of Pin-on-Disc Wear Test Process Parameters. *Nigerian Journal of Technology*. 2024;42(4):464–471. <https://doi.org/10.4314/njt.v42i4.6>.

Al-Khayri J M, Jain S M, Johnson D. *Advances in Plant Breeding Strategies: Vegetable Crops*. Springer International Publishing AG 2021;(8):3-49.

Argeriou M. Daily Alcohol Consumption Patterns in Boston: Some Findings and a Partial Test of the Tuesday Hypothesis. *Journal of Studies on Alcohol* 1975;36(11):1578–1583. <https://doi.org/10.15288/jsa.1975.36.1578>.

Azouz L, Dahmoune F, Rezgui F, G'Sell C. Full Factorial Design Optimization of Anti-Inflammatory Drug Release by PCL–PEG–PCL Microspheres. *Materials Science and Engineering: C* 2016;58:412–419. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.08.058>.

B

Bai C, Peng H, Xiong H, Liu Y, Zhao L, Xiao X. Carboxymethylchitosan-Coated Proliposomes Containing Coix Seed Oil: Characterisation, Stability and in Vitro Release Evaluation. *Food Chemistry* 2011;129(4):1695–1702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.033>.

Barboza F M, Machado W M, Olchanheski Junior L R, Padilha De Paula J, Zawadzki S F, Fernandes D, Farago P V. PCL/PHBV Microparticles as Innovative Carriers for Oral Controlled Release of Manidipine Dihydrochloride. *The Scientific World Journal* 2014;1–10. <https://doi.org/10.1155/2014/268107>.

Barth A, Zscherp C. What Vibrations Tell about Proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2002;35 (4): 369–430. <https://doi.org/10.1017/S0033583502003815>.

Beltagy A. Investigation of new antimicrobial and antioxidant activities of Brassica rapa L. *Innovare Academic Sciences* 2014;6(6):19-25.

Boivin D, Lamy S, Lord-Dufour S, Jackson J, Beaulieu E, Côté M, Moghrabi A, Barrette S, Gingras D, Béliveau R. Antiproliferative and Antioxidant Activities of Common Vegetables: A Comparative Study. *Food Chemistry* 2009;112(2):374–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.084>.

Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72(1–2):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 J, Winey K I. Production of Haloperidol-Loaded PLGA Nanoparticles for Extended Controlled Drug Release of Haloperidol. *Journal of Microencapsulation* 2005;22 (7):773–785. <https://doi.org/10.1080/02652040500273753>.

C

Calderón-Oliver M, Ponce-Alquicira E. The Role of Microencapsulation in Food Application. *Molecules* 2022;27(5):1499. <https://doi.org/10.3390/molecules27051499>.

Chaize B, Colletier J-P, Winterhalter M, Fournier D. Encapsulation of Enzymes in Liposomes: High Encapsulation Efficiency and Control of Substrate Permeability. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 2004;32(1):67–75. <https://doi.org/10.1081/BIO-120028669>.

Cie V-A. *Les Plantes potagères, description et culture des principaux légumes des climats tempérés, troisième.*; Paris, 1891.

Corrêa-Filho L C, Lourenço M M, Moldão-Martins M, Alves V D. Microencapsulation of β - Carotene by Spray Drying: Effect of Wall Material Concentration and Drying Inlet Temperature. *International Journal of Food Science* 2019;1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/8914852>.

D

Dahdouh A, Kati D E, Bachir-bey M, Aksas A, Rezgui F. 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* 2021;86(5):1893–1906. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15721>.

De Oliveira F K, Santos L O, Buffon J G. Mechanism of Action, Sources, and Application of Peroxidases. *Food Research International* 2021;143:110266. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110266>.

Delannoy É, Marmey P, Penel C, Nicole M. Les Peroxydases Végétales de Classe III. *Acta Botanica Gallica* 2004;151(4):353–380. <https://doi.org/10.1080/12538078.2004.10515440>.

Diao M, Dembele R H, Konate K, Dicko M H. Etude Comparative Des Peroxydases de Dix (10) Plantes Supérieures Couramment Rencontrées Au Burkina Faso. *International. Journal of Biological and Chemical. Science* 2020;13(6):2533. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v13i6.9>.

Dubey R, Shami T C, Rao K U B. Microencapsulation Technology and Applications. *Defence Science Journal* 2009;59 (1).

E

Eghbal N, Choudhary R. Complex Coacervation: Encapsulation and Controlled Release of Active Agents in Food Systems. *LWT- Food Science and Technology* 2018;90:254–264. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>.

F

Freitas S, Merkle H P, Gander B. Microencapsulation by Solvent Extraction/Evaporation: Reviewing the State of the Art of Microsphere Preparation Process Technology. *Journal of Controlled Release* 2005;102 (2):313–332. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.015>.

G

Gibbs B F, Kermasha S, Alli I N, Mulligan C. Encapsulation in the Food Industry: A Review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 1999;50(3):213–224. <https://doi.org/10.1080/096374899101256>.

H

Hamid M, Khalil-ur-Rehman. Potential Applications of Peroxidases. *Food Chemistry* 2009;115(4):1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.035>.

Holz J P, Bottene, M. K, Jahno V D, Einloft S, Ligabue R. Menthol-Loaded PLGA Micro and Nanospheres: Synthesis, Characterization and Degradation in Artificial Saliva. *Materials and Research*. 2018;21(2). <https://doi.org/10.1590/1980-5373-mr-2017-0488>.

I

Ibarra-Escutia P, Gómez J J, Calas-Blanchard C, Marty J L, Ramírez-Silva M. T. Amperometric Biosensor Based on a High Resolution Photopolymer Deposited onto a Screen-Printed Electrode for Phenolic Compounds Monitoring in Tea Infusions. *Talanta* 2010;81(4–5):1636–1642. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.03.017>.

Ibraheem D, Iqbal M, Agusti G, Fessi H, Elaissari A. Effects of Process Parameters on the Colloidal Properties of Polycaprolactone Microparticles Prepared by Double Emulsion like Process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2014;445:79–91. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.01.012>.

Iqbal M, Zafar N, Fessi H, Elaissari A. Double Emulsion Solvent Evaporation Techniques Used for Drug Encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 2015;496(2):173–190. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.057>.

J

Jeffery H, Davis S S, O'Hagan D T. The Preparation and Characterisation of Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microparticles. I: Oil-in-Water Emulsion Solvent Evaporation. *International Journal of Pharmaceutics* 1991;77(2–3):169–175. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(91\)90314-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(91)90314-E).

Jyothi N V N, Prasanna P M, Sakarkar S N, Prabha K S, Ramaiah P S, Srawan, G Y. Microencapsulation Techniques, Factors Influencing Encapsulation Efficiency. *Journal of Microencapsulation* 2010;27(3):187–197. <https://doi.org/10.3109/02652040903131301>.

K

Kanellopoulos A, Giannaros P, Palmer D, Kerr A, Al-Tabbaa A. Polymeric Microcapsules with Switchable Mechanical Properties for Self-Healing Concrete: Synthesis, Characterisation and Proof of Concept. *Smart Materials and Structures* 2017;26(4):045025. <https://doi.org/10.1088/1361-665X/aa516c>.

Kong H, Yang J, Wang X, Mamat N, Xie G, Zhang J, Zhao H, Li J. The Combination of Brassica Rapa L. Polysaccharides and Cisplatin Enhances the Anti Liver Cancer Effect and Improves Intestinal Microbiota and Metabolic Disorders. *International Journal of Biological Macromolecules* 2024;265:130706. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130706>.

Kong J, Yu S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *ABBS* 2007;39(8):549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>.

Krishnamachari Y, Madan P, Lin S. Development of pH- and Time-Dependent Oral Microparticles to Optimize Budesonide Delivery to Ileum and Colon. *International Journal of Pharmaceutics* 2007;338(1–2):238–247. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.015>.

L

Labuschagne P. Impact of Wall Material Physicochemical Characteristics on the Stability of Encapsulated Phytochemicals: A Review. *Food Research International* 2018;107:227–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.026>.

Lengyel M, Kállai-Szabó N, Antal V, Laki A J, Antal I. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery. *Scientia Pharmaceutica* 2019;87(3):20. <https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>.

Lestari E, Windarsih A, Sunardi S, Nisa K. Encapsulation of Channa Striata Albumin Extract: Optimization by Box-Behnken Design of Response Surface Methodology. *International Aquatic Research* 2023: No. Online First. <https://doi.org/10.22034/iar.2023.1992964.1484>.

Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by Solvent Evaporation: State of the Art for Process Engineering Approaches. *International Journal of Pharmaceutics* 2008;363(1–2):26–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.07.018>.

Łoborzewski J, Brzyska M, Wójcik A, Kolarz B. The Influence of Metal Ions on the Soluble and Immobilized Cytoplasmic Cabbage Peroxidase Activity and Its Kinetics. *Journal of Molecular Catalysis* 1990;59(3):373–383. [https://doi.org/10.1016/0304-5102\(90\)85109-U](https://doi.org/10.1016/0304-5102(90)85109-U).

M

Martins E, Poncelet D, Rodrigues R C, Renard D. Oil Encapsulation Techniques Using Alginate as Encapsulating Agent: Applications and Drawbacks. *Journal of Microencapsulation* 2017;34(8):754–771. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1403495>.

Medjldi Marzougui S. Peroxydase d'origine végétale: purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés. THèse, BADJI Mokhtar ANNABA, ANNABA, 2011.

Mizutani Y, Matsumura Y, Murakami H, Mori T. Effects of Heating on the Interaction of Lipid and Zein in a Dry Powder System. *Journal and Agricultural of Food Chemistry*. 2004;52(11):3570–3576. <https://doi.org/10.1021/jf030677g>.

Moghddam S R M, Ahad A, Aqil M, Imam S S, Sultana Y. Formulation and Optimization of Niosomes for Topical Diacerein Delivery Using 3-Factor, 3-Level Box-Behnken Design for the Management of Psoriasis. *Materials Science and Engineering: C* 2016;69:789–797. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.043>.

Muneer R M, Hadi N J, Al-Zubiedy A. Simulation Study of Biopolymer Microspheres Shape Varying Behavior. *Journal. Physique Conferences Series*. 2021;1973(1):012101. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1973/1/012101>.

N

Narsaiah K, Jha S N, Wilson R A, Mandge H M, Manikantan M R. Optimizing Microencapsulation of Nisin with Sodium Alginate and Guar Gum. *J Food Sci Technol* 2014; 51(12):4054–4059. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0886-6>.

Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An Overview of Encapsulation Technologies for Food Applications. *Procedia Food Science* 2011;1:1806–1815. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.265>.

Nesterenko A, Alric I, Silvestre F, Durrieu V. Vegetable Proteins in Microencapsulation: A Review of Recent Interventions and Their Effectiveness. *Industrial Crops and Products* 2013; 42:469–479. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>.

Nicelle J A, Al-Kassim L, Bewtra J K, Taylor K E. Wastewater Treatment by Enzyme Catalysed Polymerization and Precipitation. *Biodeterioration Abstracts* 1993:7.

Noronha C M, Granada A F, De Carvalho S M, Lino R. C, De O B, Maciel M V, Barreto P L M. Optimization of α -Tocopherol Loaded Nanocapsules by the Nanoprecipitation Method. *Industrial Crops and Products* 2013;50:896–903. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.08.015>.

P

Pandey V P, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi U N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochem Anal Biochem* 2017;06(01). <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000308>.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C. Peroxidases Have More Functions than a Swiss Army Knife. *Plant Cell Rep* 2005;24 (5): 255–265. <https://doi.org/10.1007/s00299-005-0972-6>.

Patricia Twala P, Mitema A, Baburam C, Aliye Feto N. Breakthroughs in the Discovery and Use of Different Peroxidase Isoforms of Microbial Origin. *AIMS Microbiology* 2020;6(3): 330–349. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020020>.

Paul S, Geng C, Yang T, Yang Y, Chen J. Phytochemical and Health-Beneficial Progress of Turnip (*Brassica Rapa*). *Journal of Food Science* 2019;84(1):19–30. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14417>.

Polidoro J. Turnips. In *College Seminar 235: Food for Thought: The Science, Culture, & Politics of Food* 2008.

Poyot T, Nachon F, Rochu D, Fournier D, Masson P. Optimiser les enzymes, mutagenèse et évolution dirigées. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 2007 ;65(2):119–125. [https://doi.org/10.1016/S0003-4509\(07\)90025-5](https://doi.org/10.1016/S0003-4509(07)90025-5).

R

Rentería-Ortega M, Perea-Flores M D J, Peña-Barrientos A, Barrios-Francisco R, Rojas-Candelas L E, Calderón-Domínguez G. Encapsulation Efficiency of Electrosprayed Glucose Oxidase Capsules: Effect of the Drying Technique. *Polymers* 2025;17(4):488. <https://doi.org/10.3390/polym17040488>.

Rentería-Ortega M, Salgado-Cruz M D L P, Morales-Sánchez E, Alamilla-Beltrán L, Valdespino-León M, Calderón-Domínguez G. Glucose Oxidase Release of Stressed Chia Mucilage-sodium Alginate Capsules Prepared by Electrospraying. *Journal of Food Processing and Preservation* 2021;45(5). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15484>.

Risch S J, Reineccius G A, Eds. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*. ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington DC, 1995;(590). <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0590>.

Richard J, Benoît J-P. *Microencapsulation*. *Formulation* 2000. <https://doi.org/10.51257/a-v1-j2210>.

Rocha-Selmi G A, Theodoro A C, Thomazini M, Bolini H M A, Favaro-Trindade C S. Double Emulsion Stage Prior to Complex Coacervation Process for Microencapsulation of Sweetener

Sucralose. Journal of Food Engineering 2013;119(1):28–32.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.05.002>.

S

Sahadevan L D M, Misra C S, Thankamani V. Characterization of Lignin-Degrading Enzymes (LDEs) from a Dimorphic Novel Fungus and Identification of Products of Enzymatic Breakdown of Lignin. 3 Biotech 2016;6(1):56. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0384-z>.

Sanlier N, Guler Saban M. The Benefits of Brassica Vegetables on Human Health. 2018;(1): 1-13.

Shahidi F, Han X. Encapsulation of Food Ingredients. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 1993;33(6):501–547. <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>.

Sharma S, Gupta S, Princy, Arya S K, Kaur A. Enzyme Immobilization: Implementation of Nanoparticles and an Insight into Polystyrene as the Contemporary Immobilization Matrix. Process Biochemistry 2022;(120):22–34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.05.022>.

Sun X, Wang W, Paerhati M, Song Z, Li J, Zhu J. Phytochemical Composition and Nutritional Characterization of Qamgur (Brassica Rapa L.) in Different Forms. Food Sci. Technol 2022; (42):35-722. <https://doi.org/10.1590/fst.35722>.

T

Takabe K, Takeuchi M, Sato T, Ito M, Fujita M. Immunocytochemical Localization of Enzymes Involved in Lignification of the Cell Wall. Journal of Plant Research 2001;114(4):509–515. <https://doi.org/10.1007/PL00014018>.

Tang L, Chen Y-H, Wang Q Wang X-H, Wu Q-X, Ding Z-F. Microencapsulation of Functional Ovalbumin and Bovine Serum Albumin with Polylysine-Alginate Complex for Sustained Protein Vehicle's Development. Food Chemistry 2022 ;368 :130902. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130902>.

Theron F. Conception et mise en œuvre d'un procédé intensifié continu de microencapsulation par polycondensation interfaciale. Toulouse, HAL open science 2009:1-226.

V

Veitch N C. Horseradish Peroxidase: A Modern View of a Classic Enzyme. *Phytochemistry* 2004 ;65(3):249–259. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.10.022>.

Vial S. Immobilisation d'enzymes dans des hydroxydes doubles lamellaires. Réalisation de biocapteurs pour la détection de polluants organiques. Université Blaise pascal, HAL open science 2005:1-294.

Vj M, Jb N, U V, Js P, Sk Y. Preparation and Characterization of Biodegradable Glimepiride Loaded PLA Nanoparticles by o/w Solvent Evaporation Method Using High Pressure Homogenizer: A Factorial Design Approach. *Scholarena Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2014:1(1). <https://doi.org/10.18875/2375-2262.1.104>.

Vogl-Lukasser B, Vogl C R, Reiner H. The Turnip (*Brassica Rapa L. Subsp. Rapa*) in Eastern Tyrol (Lienz District; Austria). *Ethnobotany Research Applications*. 2007;5:305. <https://doi.org/10.17348/era.5.0.305-317>.

W

Weng Y, Xu X, Yan P, You J, Chen X, Song H, Zhao C-X. Enzyme Encapsulation in Metal-Organic Frameworks Using Spray Drying for Enhanced Stability and Controlled Release: A Case Study of Phytase. *Food Chemistry* 2024;452:139533. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.139533>.

X

Xie X, Yang Y, Chi Q, Li Z, Zhang H, Li Y, Yang Y. Controlled Release of Dutasteride from Biodegradable Microspheres: In Vitro and In Vivo Studies. *PLoS ONE* 2014;9(12):114835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114835>.

Y

Yang Y-Y, Chia H-H, Chung T-S. Effect of Preparation Temperature on the Characteristics and Release Profiles of PLGA Microspheres Containing Protein Fabricated by Double-Emulsion Solvent Extraction/Evaporation Method. *Journal of Controlled Release* 2000;69(1):81–96. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(00\)00291-1](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(00)00291-1).

Yang Z, Huck W T S, Clarke S M, Tajbakhsh A R, Terentjev E M. Shape-Memory Nanoparticles from Inherently Non-Spherical Polymer Colloids. *Nature Mater* 2005;4(6): 486–490. <https://doi.org/10.1038/nmat1389>.

Yeo Y, Park K. Control of Encapsulation Efficiency and Initial Burst in Polymeric Microparticle Systems. *Archives of Pharmacal Research* 2004;27(1):1. <https://doi.org/10.1007/BF02980037>.

Yoo J-W, Doshi N, Mitragotri S. Adaptive Micro and Nanoparticles: Temporal Control over Carrier Properties to Facilitate Drug Delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2011;63 (14–15):1247–1256. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.004>.

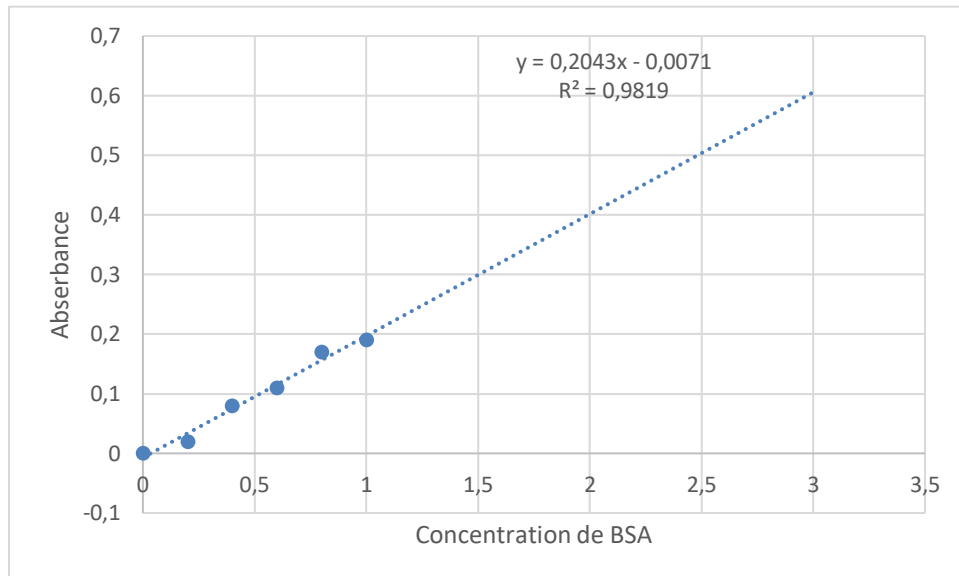
Z

Zámocký M, Janeček Š, Koller F. Common Phylogeny of Catalase-Peroxidases and Ascorbate Peroxidases. *An International Journal on Genes* 2000;256(1–2):169–182. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00358-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00358-9).

Zheng S, Luo L, Bo R, Liu Z, Xing J, Niu Y, Hu Y, Liu J. 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* 2016 ;11 :4891–4904. <https://doi.org/10.2147/IJN.S115742>.

Annexes

Annexe N°1 : Courbe d'étalonnage des protéines.



Composition de tampon réactionnel

- 50 ml de tampon citrate-phosphate
- 100 μ L de gaiacol
- 50 μ L de H_2O_2

Préparation de la solution Bradford

- 50 ml de Ethanol à 95%
- 100 mg de Bleu de Coomassie
- 100 ml de H_3PO_4 à 85%
- L'eau distillé

Préparation de solution tampon

- 70,98 g de Na_2HPO_4
- 96 g d'acide citrique
- L'eau distillée

Préparation de la solution de PVA

- La masse (g) précise d'acide polyvinylique
- L'eau distillée

Résumé

Le navet (*Brassica rapa L.*) est bien connu par sa richesse en composés bioactifs, notamment des enzymes antioxydantes comme les peroxydases qui présentent un niveau important dans le développement de plusieurs produits dans différents domaines. Afin de garder les propriétés biologiques de ces peroxydases, des techniques d'encapsulation ont été employées. Dans cette présente étude nous avons l'objectif d'encapsuler l'extrait du navet blanc (*Brassica rapa L.*) dans le polymère PLA selon quelques paramètres par la technique de double émulsion évaporation de solvant (W/O/W). L'optimisation des facteurs d'encapsulation consiste un plan d'expérience à trois niveaux (-1 0 +1) « Box- Behnken » à l'aide de logiciel JMP. Les facteurs fixés étaient X1 (la concentration de PVA (%)), X2 (la quantité de polymère PLA (mg)) et X3 (la température (°C)) et l'efficacité d'encapsulation (%) comme réponse. Après validation de modèle, les microcapsules étaient préparées pour effectuer une analyse morphologique et spectroscopique FTIR, ainsi qu'une comparaison de l'activité enzymatique de l'extrait enrobé avant et après le processus d'immobilisation. Les paramètres optimaux obtenue étaient 1,55% de PVA, 50 mg/ml de PLA et 23°C pour la température avec une efficacité d'encapsulation de 73,98 %. La caractérisation morphologique révèle des microparticules de forme ovale ridée. La spectroscopie FTIR montre la présence de l'extrait dans les microparticules de polymères. L'activité enzymatique diminue légèrement après la microencapsulation.

Mots clés : Navet blanc, Microencapsulation, peroxydase, Optimisation, activité enzymatique.

Abstract

Turnip (*Brassica rapa L.*) is well known for its richness in bioactive compounds, particularly antioxidant enzymes such as peroxidases, which play a significant role in the development of various products in different fields. In order to preserve the biological properties of these peroxidases, encapsulation techniques were used. In the present study, the aim was to encapsulate the extract of white turnip (*Brassica rapa L.*) in PLA polymer under specific parameters using the double emulsion solvent evaporation method (W/O/W). The optimization of encapsulation factors was based on a three-level Box-Behnken experimental design (-1, 0, +1) using JMP software. The selected factors were X1 (PVA concentration (%)), X2 (amount of PLA polymer (mg)), and X3 (temperature (°C)), with encapsulation efficiency (%) as the response. After validating the model, microcapsules were prepared for morphological and FTIR spectroscopic analysis, as well as for comparing the enzymatic activity of the coated extract before and after the immobilization process. The optimal parameters obtained were 1.55% PVA, 50 mg/ml PLA, and 23°C, with an encapsulation efficiency of 73.98%. Morphological analysis revealed wrinkled oval-shaped microparticles. FTIR spectroscopy confirmed the presence of the extract in the polymer microparticles. Enzymatic activity slightly decreased after microencapsulation.

Keywords: White turnip, Microencapsulation, Peroxidase, Optimization, Enzymatic activity.

الملخص

يعرف الفت بغناه بالمركبات النشطة بيولوجيًا، وخصوصًا الإنزيمات المضادة للأكسدة مثل البيروكسيداز، التي تلعب دورًا مهمًا في تطوير العديد من المنتجات في مجالات مختلفة. من أجل الحفاظ على الخصائص البيولوجية لهذه الإنزيمات، تم استخدام تقنيات التغليف. تهدف هذه الدراسة إلى تغليف مستخلص اللفت الأبيض داخل بوليمر (بيبالا) وفقًا لبعض المعايير باستخدام تقنية الاستحلاب المزوج وتبخير المذيب. تم تحسين عوامل التغليف تم تحسين عوامل التغليف وفقًا لخطة تجريبية ثلاثية المستويات (1- 0 1+) "Box-Behnken" باستخدام برنامج JMP. لعوامل التي تم اختبارها هي: X1 (تركيز PVA (%))، X2 (كمية بوليمر PLA (ملغ))، X3 (درجة الحرارة (°C)) مع كفاءة التغليف (%) كمتغير تابع. بعد التحقق من صحة النموذج، تم تحضير الكبسولات إجراء تحليل مورفولوجية وطيفية، بالإضافة إلى مقارنة النشاط الإنزيمي لمستخلص المغلف قبل وبعد عملية التثبيت. أفضل النتائج المحصل عليها هي: 1,55% PVA، 50 ملغ من بوليمر PLA ودرجة حرارة 23°C مع كفاءة تغليف بلغت 73.98%. أظهر التحليل المورفولوجية جسيمات دقيقة بيضاوية الشكل ومجعدة، وقد أكد تحليل FTIR وجود المستخلص داخل الجسيمات البوليمرية. انخفض النشاط الإنزيمي بشكل طفيف بعد التغليف الدقيق.

الكلمات المفتاحية: اللفت الأبيض، التغليف الدقيق، البيروكسيداز، التحسين، النشاط الإنزيمي.