

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
جامعة عمار ثليجي بالأغواط  
UNIVERSITE AMAR TELIDJI LAGHOUAT

كلية العلوم  
FACULTE DES SCIENCES  
قسم البيولوجيا  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



## Mémoire

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Filière : Sciences Biologiques*

*Option : Biochimie des produits naturels*

### THEME

---

**Détermination des conditions optimales de l'activité de  
4-Méthylcatécholase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet nour, cv  
Degla beida et cv Ghars**

---

**Présenté par :**

**Devant le jury :**

**Elghrabi Anfal**

**Président:** Mr Chaibi Rachid (MCA)

**Ferhat Sabrina**

**Rapporteur:** Mr Benaceur Farouk (MAA)

**Examineur:** Mr Leboukh Mourad (MAA)

**Soutenu publiquement le : 15 Mai 2017.**

## *Dédicace*

**J**e dédie ce mémoire

**A** mes chers parents ma mère et mon père pour leur patience leur amour, leur soutien et leurs encouragements.

**A** mon frère Souhaib et ma petite sœur Israa en témoignage de la fraternité **Et** à tous les membres de ma famille.

**A** tous mes amies et mes camarades.

**A** tous mes professeurs avec notre profonde considération.

**E**t à tous ceux qui nous ont assistés, dans la réalisation de ce travail.

*Anfal*



## *Dédicace*

*C'est avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et une immense joie, que je dédie mon travail à mes très chers, respectueux et magnifiques parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie.*

*Ainsi qu'à mon frère Mohamed,  
mes deux sœurs Yasmina & Hayat  
et ma nièce Rima.*

*Et en particulier à mon binôme Anfal et*

*A tous mes camarades de la Biochimie promotion 2017 et à toutes personnes qui m'ont encouragée ou aidée au cours de mes études.*

*Sabrina*



## Remerciements

*Avant tout, nous remercions ALLAH, tous puissant de nous avoir donné la patience, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail.*

*Nous tenons tout d'abord à exprimer nos très grandes gratitudes et nos reconnaissances la plus sincère à Monsieur **Benaceur Farouk**, Enseignant au Département des Sciences Biologiques à l'Université Amar Telidji de Laghouat, qui a dirigé ce travail et a su nous apporter l'encadrement nécessaire à sa réalisation.*

*Nos remerciements vont également à Monsieur **Gouzi Hicham** et Monsieur **Leboukh Mourad** pour avoir accepté de présider et d'examiner notre mémoire.*

*Nos reconnaissances vont également à tout les enseignants du département de biologie faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.*

*Nos vifs remerciements vont à tous ceux qui ont collaboré à l'achèvement de ce travail.*

**Anfal & Sabrina**

## Résumé

L'objectif principal de ce travail est l'étude des conditions optimales de la polyphénol oxydase (PPO: EC 1.10.3.1) extraite des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour , cv Degla beida et cv Ghars. La PPO de ces variétés de dattes possède une activité 4-Méthylcatécholase, mesurée par spectrophotométrie à 410 nm en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

L'étude de la stabilité thermique a montré que le 4-Méthylcatéchol oxydase est relativement thermostable jusqu'au 60°C, au-delà, de cette température l'activité de cette enzyme diminue progressivement. De plus les valeurs de pH optimum ainsi que les paramètres cinétiques ont été également estimés comme suit, Deglet nour (pH=5,0,  $V_{max}=0,5325$  Abs /min,  $K_m=31,537$  mM), Degla beida (pH= 5,0,  $V_{max}= 0,00418$  Abs /min,  $K_m=24,6338$  mM ) et Ghars (pH= 4,5,  $V_{max}=0,2973$  Abs /min,  $K_m= 13,1131$  mM) .

**Mots clés:** *Phoenix dactylifera* L , Polyphénol oxydase , Condition optimales , Activité enzymatique.

## Abstract

This paper reports the study of the optimal conditions of polyphenol oxidase (PPO :EC 1.10.3.1) Extracted from threes types of dates (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour , cv Degla beida and cv Ghars. The PPO of these date ones possess 4-Methylcatecholase activity, measured by spectrophotometry at 410 nm using 4-methylcatechol as substrate.

The study of thermal stability showed that 4-Methylcatechol oxidase is relatively thermostable up to 60 ° C Beyond this temperature the activity of this enzyme decreases progressively. In addition, optimum pH values and kinetic parameters were also estimated as follows: Deglet-nour (pH=5,0,  $V_{max}=0,5325$  Abs /min,  $K_m=31,537$  mM) , Degla beida (pH=5,0,  $V_{max}=0,00418$  Abs /min,  $K_m=24,6338$  mM ) , Ghars (pH= 4,5 ,  $V_{max}=0,2973$  Abs /min,  $K_m= 13,1131$  mM).

**Keywords:** *Phoenix dactylifera* L , Polyphénol oxidase , Optimal condition, Enzymatic activity.

## المخلص:

يهدف هذا العمل العلمي الى دراسة الشروط المثالية لنشاط أنزيم متعدد الفينول أوكسيداز (1.10.3.1) المستخلص من ثلاثة أصناف من التمر من صنف (*Phoenix dactylifera* L) من نوع دقلة نور, دقلة البيضاء, الغرس . حيث تم تأكيد النشاط 4- مثل كاتيكولازي لهذا الانزيم ، باستعمال جهاز قياس الطيفي على الموجة 410 نانومتر و كذا في وجود الركيزة 4- مثل الكاتيكول .

أظهرت دراسة الاستقرار الحراري أن الإنزيم هدامستقرة نسبيا حتى درجة C 60 ° ,ومن بعد هذه الدرجة لاحظنا تناقص تدريجي للنشاط الأنزيمي . كما تم أيضا التأكد من القيم المثلى للمحتمل الهيدروجين (pH) وكذا الخصائص الحركية كالآتي:  
دقلة نور, ( $V_{max}=0,5325$  Abs /min,  $K_m=31,537$  mM) دقلة البيضاء, ( $V_{max}=0,00418$  Abs /min,  $K_m=24,6338$  mM) , الغرس ( $V_{max}=0,2973$  Abs /min,  $K_m= 13,1131$  mM) .

**الكلمات المفتاحية:** فونكس داكتيليفيرا ل, متعدد الفينول أوكسيداز, الشروط المثالية, النشاط النزييمي.

# *Table Des Matières*

Dédicaces.....	I
Remerciements.....	III
Résumé.....	IV
Table des Matières.....	V
Liste des Figures.....	VII
Liste des Tableaux.....	IX
Liste des Abréviations.....	X
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Généralités sur les dattes.....</b>	<b>2</b>
I- Le palmier dattier.....	2
I.1-Généralités.....	2
I.2-La classification botanique.....	2
I.3-La répartition géographique.....	3
II-La datte .....	3
II.1 Définition.....	3
II.2 Formation et maturation de la datte.....	4
II. 3 Classification des dattes.....	6
II.4 Les principales variétés de dattes en Algérie.....	6
II.5-La composition biochimique.....	7
<b>Chapitre 2 : La polyphénol oxydase.....</b>	<b>10</b>
II.1 Historique.....	10
II.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO.....	10
II.2.1 Définition.....	10
II.2.2 Classification et nomenclature.....	10
II.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO.....	11
II.3.1 Caractéristiques réactionnelles.....	11
II.3.2 Caractéristique structurales.....	12
II.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOs.....	14

II.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique.....	16
II.6 pH et Température optimale.....	16
II.7 Spécificité de la PPO.....	18
II.8 Affinité et efficacité.....	21
II.9 Applications de la PPO.....	22
<b>Chapitre 3 : Matériels et méthodes.....</b>	<b>24</b>
I. Matériels.....	24
I.1 Matériel biologique.....	24
I.2 Produits chimiques.....	25
I.3 Matériels utilisés.....	25
II. Méthodes.....	25
II.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO.....	25
II.2 Mesure de l'activité 4-Méthylcatécholase la PPO.....	26
II.2.1 Effet du pH sur l'activité 4-Méthylcatécholase de la PPO.....	27
II.2.4 Etude de la stabilité thermique .....	27
II.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....	28
II.2.2 Détermination des paramètres cinétiques .....	28
II.3 Analyse des résultats expérimentaux.....	28
<b>Chapitre 4 : Résultats et discussion.....</b>	<b>29</b>
III.1 Extraction de la polyphénol oxydase des dattes.....	29
III.2 Les conditions optimales de l'activité 4-Méthylcatécholase.....	31
III.2.1 Effet du pH.....	31
III.2.2 Etude de la stabilité thermique.....	33
III.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme.....	36
III.2.4 Détermination des paramètres cinétiques.....	39
<b>Chapitre 5 : Conclusion.....</b>	<b>46</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>47</b>

## *Liste des figures*

1- Datte et noyau du palmier dattier.....	4
2- Stades d'évolution de la datte.....	5
3- Classification de dattes selon leurs consistances.....	6
4- Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénol oxydases.....	12
5- Diffraction aux rayons X de la PPO de <i>V.vinifera</i> .....	14
6- Site actif de la PPO de <i>V.vinifera</i> PPO.....	14
7- Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO ( <i>Met, Deoxy, Oxy</i> PPO) d'après Van Gelder et al (1997).....	16
8- Structure de quelques substrats phénoliques .....	20
9- Les trois variétés des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars.....	24
10- Extrait brut de la datte Deglet nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) avant et après la centrifugation.....	26
11- Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol par la PPO de datte Deglet nour ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.).....	27
12- Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Deglet-nour, cv Ghars et cv Degla Beida.....	30
13- Variation de l'activité enzymatique de la PPO de ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Deglet nour en fonction du pH .....	32
14- Variation de l'activité enzymatique de la PPO de ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Degla beida en fonction du pH .....	32
15- Variation de l'activité enzymatique de la PPO de ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars en fonction du pH .....	33
16- Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes ( <i>Phoenix</i> <i>dactylifera</i> L.) cv Deglet nour après 10 min de traitement thermique.....	34
17- Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes ( <i>Phoenix</i> <i>dactylifera</i> L.) cv Degla beida après 10 min de traitement thermique.....	34

18- Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars après 10 min de traitement thermique.....	35
19- Effet de la concentration de la 4-Méthylcatéchol oxydase de ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Deglet nour sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30°C ; 4-Méthylcatéchol 20 mM).....	37
20- Effet de la concentration de la 4-Méthylcatéchol oxydase de ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Degla beida sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C ; 4-Méthylcatéchol 20 mM).....	37
21- Effet de la concentration de la 4-Méthylcatéchol oxydase de ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5; 30°C; 4-Méthylcatéchol 20 mM).....	38
22- Effet de la concentration du 4-Méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par 4-Méthyl oxydase des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Deglet nour: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk....	41
23- Effet de la concentration du 4-Méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par 4-Méthyl oxydase des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Degla beida: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk....	42
24- Effet de la concentration du 4-Méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par 4-Méthyl oxydase des dattes ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.) cv Ghars: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk....	43

## *Liste des tableaux*

1. Stades de développement des dattes.....	4
2. Principales variétés de dattes algériennes et leur aire de culture.....	7
3. Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale..	18
4. Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétale.....	22
5. Valeurs de pH optimum de la PPO des dattes en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.....	31
6. Température optimales de la PPO des dattes en présence de 4-Méthylcatéchol.....	35
7. Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de 4 –Méthylcatéchol comme substrat.....	44

## *Liste des abréviations*

**°C** : Degré Celsius.

**Abs** : Absorbance.

**AR** : Activité enzymatique résiduelle.

**Cu** : Cuivre.

**K<sub>cat</sub>** : Constante catalytique.

**kDa** : Kilo Dalton.

**K<sub>m</sub>** : Constante de Michaelis.

**L** : Linné.

**M** : Mole par litre.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

**PPO** : Polyphénol oxydase.

**PVPP** : Polyvinyl(poly) pyrrolidone.

**R<sup>2</sup>**: Erreur relative ajustée.

**r** : Rapport.

**[S]** : Concentration de substrat.

**V<sub>0</sub>**: Vitesse initiale.

**V<sub>max</sub>**: Vitesse maximale.

# *Introduction*

## Introduction

---

Depuis l'histoire ancienne l'homme a connu et vécu avec le palmier dattier (*Phoenix Dactylifera L.*) dont les fruits (dattes) constituent une source alimentaire énergétique. La datte a toujours été, depuis des temps immémoriaux, un élément très important de l'alimentation, tant pour les humains que pour les animaux, dans toutes les contrées du sud et de l'est de la méditerranée. (Boubekri., 2010).

Les enzymes jouent un rôle très important durant le développement et de maturation des fruits y compris les dattes. Parmi ces enzymes la polyphénol oxydase (PPO).

En présence de l'oxygène moléculaire, la PPO présente deux activités différentes, elle est capable d'hydroxylé les monophénols en o-diphénols (activité crésolasique ou monophénolasique), les o-diphénols ainsi formés sont oxydés à leur tour pour donner des o-quinones (activité catécholastique ou o-diphénoloxydasique) qui se polymérisent pour former des pigments brun, rouge ou noir appelé mélanine (Arslan et Doğan., 2005 ; Kolcuoğlu et al., 2006).

En raison de sa participation majeure par ses effets indésirables du brunissement enzymatique, la PPO a suscité l'attention considérable des chercheurs du domaine agro-alimentaire.

La prévention de cette réaction a toujours été un défi pour les scientifiques en produits alimentaires. Malgré que plusieurs investigations aient été rapportées sur l'étude des paramètres cinétiques de la PPO obtenue à partir de différentes sources de fruits et de végétaux, la PPO des dattes n'a pas reçu l'attention similaire.

L'objectif souligné dans notre étude vise une compréhension du comportement cinétique de la PPO extraite à partir de trois variété originaux et locales : «*Deglet-nour, Degla beida et Ghars*», et ceci via la détermination des conditions optimales de la PPO tel que pH, température, effet de substrat et effet de l'enzyme en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Dans le premier chapitre nous présenterons une synthèse bibliographique sur les palmiers dattiers et les dattes. Le deuxième chapitre présente un rappel aussi succinct que bref sur la PPO. Les procédures expérimentales utilisées seront détaillées dans le troisième chapitre, tandis que le dernier chapitre présente nos résultats avec une discussion.

*Chapitre 1*  
*Généralités sur les*  
*dattes*

### I- Le palmier dattier

#### I.1-Généralité

Le nom grec de genre *Phoenix*, repris en latin, peut avoir comme origine la Phénicie, pays exportateur de dattes, mais aussi l'oiseau fabuleux qui renaît de ses cendres tandis que *Dactyl* en grec signifie doigt et datte, d'autre part le philosophe grec Aristote décrivait ce fruit comme un « doigt de lumière » (**Djerbi., 1994**).

C'est une composante essentielle de l'écosystème oasien grâce à sa remarquable adaptation aux conditions climatiques, sa haute valeur nutritive de ses fruits, ses multiples utilisations de ses produits ainsi que sa morphologie favorisant d'autres cultures sous-jacentes (**El homaizi et al., 2002; Bakkaye., 2006**).

Comme toutes les espèces du genre *Phoenix*, il existe des arbres mâles appelés communément dokkars ou pollinisateurs et des arbres femelles Nakhla. En général, les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis où les conditions hydriques et thermiques sont favorables (**Ghazi et Sahraoui., 2005**).

#### I.2-La classification botanique

Les Palmiers sont des Monocotylédones, au même titre que les Graminées. Cela signifie qu'ils sont dépourvus de cambium, tissu indifférencié assurant la production des organes nouveaux (**Kahn., 1997**).

Selon **Munier (1973)**, la classification du palmier dattier est comme suit :

<b>Embranchement</b> .....	Phanérogames.
<b>Sous-embranchement</b> .....	Angiospermes
<b>Classe</b> .....	Monocotylédones.
<b>Groupe</b> .....	Phoenocoides.
<b>Famille</b> .....	Arecaceae.
<b>Sous-famille</b> .....	Coryphoideae.
<b>Genre</b> .....	<i>Phoenix</i> .
<b>Espèce</b> .....	<i>Phoenix dactylifera</i> L.

### I.3-La répartition géographique

Le palmier dattier fait l'objet d'une plantation intensive en Afrique méditerranéenne et au Moyen-Orient. L'Espagne est l'unique pays européen producteur de dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche (**Toutain., 1996**).

Aux Etats-Unis d'Amérique, le palmier dattier fût introduit au XVIII<sup>ème</sup> siècle. Sa culture n'a débutée réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés irakiennes (**Bouguedoura., 1991; Matallah., 2004**). Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie (**Matallah., 2004**).

D'autre part les palmeraies algériennes sont localisées au Nord-Est du Sahara au niveau des oasis. Le palmier dattier est cultivé au niveau de 17 wilayas seulement, pour une superficie de 120830 hectares, cependant 4 wilayas représentent 83,6% du patrimoine phoenicicole national : Biskra 23%, Adrar22%, El-oued21% et Ouargla 15% (**Anonyme., 2002**).

## II-La datte

### II-1 Définition

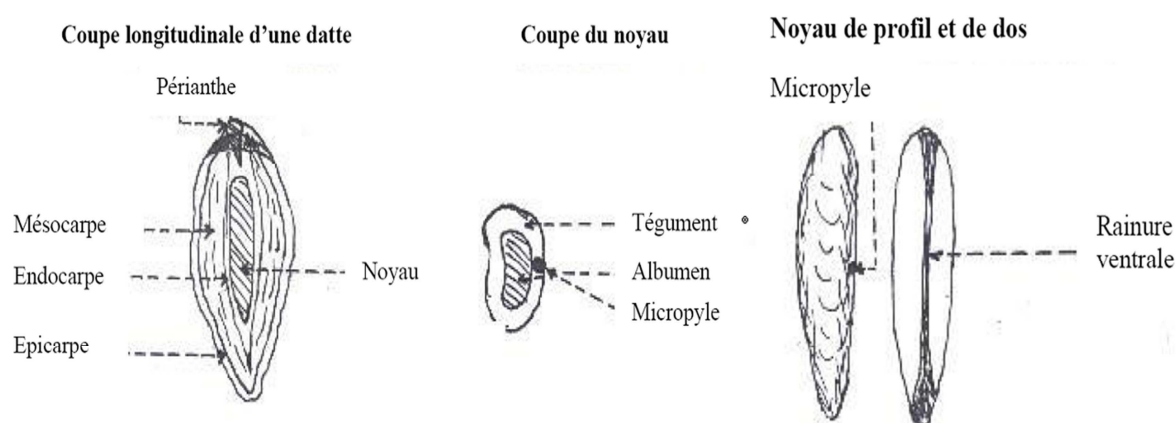
La datte, fruit du palmier dattier, est une baie, généralement de forme allongée, oblongue ou arrondie. Elle est composée d'un noyau, ayant une consistance dure, entouré de chair. (**Buelguedj., 2001**).

Selon **Espiard (2002)**, la partie comestible de la datte, dite chair ou pulpe, est constituée d'un :

- *Péricarpe* ou enveloppe cellulosique fine dénommée peau.
- *mésocarpe* généralement charnu, de consistance variable selon sa teneur en sucre et de couleur soutenue.
- *endocarpe* de teinte plus clair et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane parcheminée entourant le noyau (Figure1)

Les dimensions de la datte sont très variables, de 2 à 8 cm de longueur et d'un poids de 2 à 8 grammes selon les variétés. Leur couleur va du blanc jaunâtre au noir en passant par les couleurs ambre, rouges, brunes plus ou moins foncées (**Djerbi., 1994**).

La chair et le noyau représentent environ 85 à 90% du poids total du fruit (**Hussein et al., 1998**).



**Figure 1:** Datte et noyau du palmier dattier (Buelguedj., 2001).

## II.2 Formation et maturation de la datte

Les fleurs fécondées, à la nouaison, donnent un fruit qui évolue en taille, en consistance et en couleur jusqu'à la récolte (Gilles., 2000).

La datte passe par différents stades d'évolution avec leur noms vulgaires utilisés en Afrique du Nord et en Irak sont présentés ainsi dans le tableau ci-contre.

**Tableau 1 :** Stades de développement des dattes (Djerbi., 1994).

Pays	Stades de développement de la datte				
	I	II	III	IV	V
Irak	Hababouk	Kimiri	Khlal	Routab	Tamr
Algérie	Loulou	Khlal	Besr	Martouba	Tamr
Libye	-	Gamag	Bser	Routab	Tamr
Mauritanie	Zeï	Tefejena	Engueï	Blah	Tamr

De nombreux auteurs ont adapté la terminologie utilisée en Irak. Les différents être définis comme suit:

### II.2.1. Loulou ou Hababouk

C'est le stade "nouaison" qui vient juste après la pollinisation. Les dattes ont une croissance lente, une couleur verte jaunâtre et une forme sphérique (Figure 2). Il dure 4 à 5 semaines après fécondation. (Djerbi., 1994).

### II.2.2. Khalal ou Kimri, Blah

Ce stade dure sept semaines environs, il se caractérise par une croissance rapide en poids et en volume des dattes. Les fruits ont une couleur verte vive et un goût âpre à cause de la présence des tanins. (Djerbi., 1994).

### II.2.3. Bser ou Bsir, Bissir

Les sucres totaux atteignant un maximum en fin du stade. La couleur vire au jaune, au rouge et au brun, suivant les clones. La datte atteint son poids maximum, au début de ce stade (Figure 2). Il dure en moyenne quatre semaines. (Djerbi., 1994).

### II.2.4. Martouba ou Routab

C'est le stade de la datte mûre pour certains cultivars. Le poids et la teneur en eau vont diminuer à la fin. La durée de ce stade où le fruit prend une couleur brune est de 2 à 4 semaines. (Djerbi., 1994).

### II.2.5. Tamar ou Tmar

C'est la phase ultime de la maturation au cours de laquelle, l'amidon de la pulpe se transforme complètement en sucres réducteurs (glucose et fructose), et en sucres non réducteurs (saccharose).

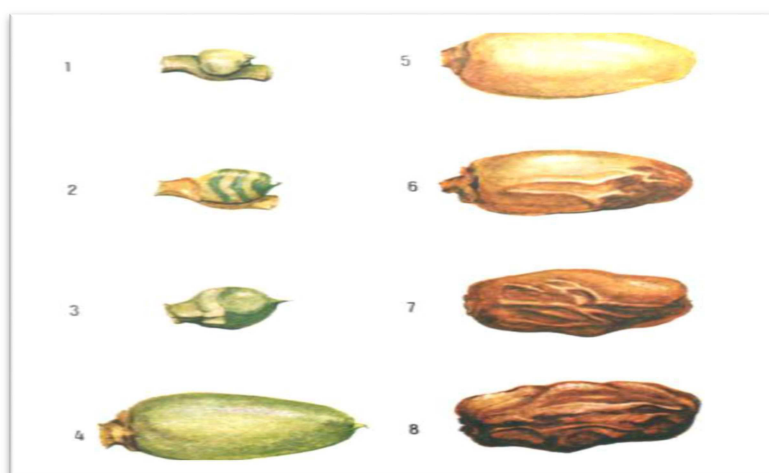


Figure 2 : Stades d'évolution de la datte (Munier., 1973)

(1-2 : Stade I ou Loulou, 3-4: Stade II ou Khlal, 5-6: Stade III ou Bser, 7: Stade IV ou Routab 8:Stade V ouTmar).

### II. 3 Classification des dattes

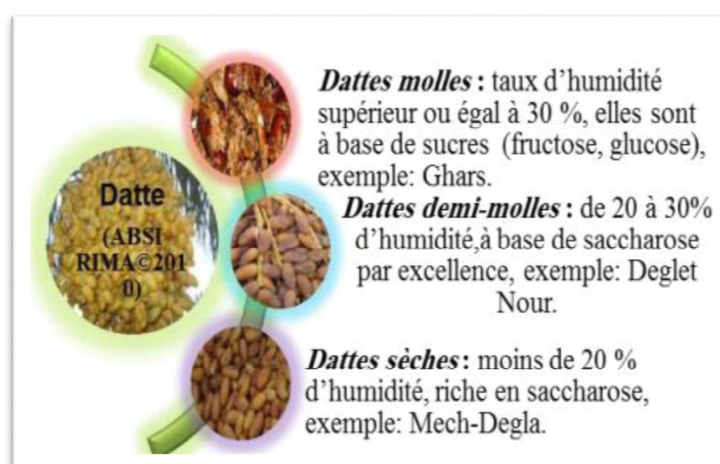
D'après **Espiard (2002)**, la consistance de la datte est variable. Selon cette caractéristique, les dattes sont réparties en trois catégories : dattes molles, dattes demi-molles et dattes sèches de consistance dure.

**Munier (1973)** a défini un indice «**r**» de qualité ou de dureté comme étant le rapport entre la teneur en sucre sur la teneur en eau des dattes.

Le calcul de cet indice permet d'estimer le degré de stabilité du fruit et conduit à la classification suivante :

- **dattes molles :  $r < 2$**
- **dattes demi - molles :  $2 < r < 3,5$**
- **dattes sèches :  $r > 3,5$**

Pour  **$r = 2$**  la stabilité du fruit est optimale et son aptitude à la conservation est très appréciable.



**Figure 3 :** Classification de dattes selon leurs consistances (**Absi., 2010**)

### II.4 Les principales variétés de dattes en Algérie

Il existe un grand nombre de variétés de dattes d'environ 200 qui se différencient par la qualité de leurs fruits (consistance) et par leur appréciation dans le marché.

## Chapitre 1: Généralités sur les dattes

**Tableau 2** : Principales variétés de dattes algériennes et leur aire de culture. (Dubost., 1991).

Variétés	Consistance	Aire de culture	Utilisation
<i>Deglet-Nour</i>	Demi molle (T)	Bas Sahara Mzab	Export tout usage
<i>Ghars</i>	Molle (P)	Idem	En pâte (pâtisserie)
<i>Degla-Beïda</i>	Sèche (T)	Oued rhir	Farine
<i>Mech Degla</i>	Sèche (T)	Ziban	Farine
<i>Tante boucht</i>	Molle (P)	Ouargla Mzab	En pâte
<i>Tatezuine</i>	Demi molle (P)	Ouargla Mzab	Fruit frais
<i>Bent Keballah</i>	Molle (P)	Ouargla Mzab	Congelée
<i>Tadala</i>	Molle (N)	Mzab Laghouat	Fruit frais
<i>Timjouhert</i>	Demi molle (N)	Mzab Gourara	Fruit frais
<i>Hmira</i>	Demi molle (N)	Touat, Saoura	Conservation
<i>Tegaza</i>	Demi molle (N)	Tidikelt	Vente/sahel
<i>Tazerzait</i>	Demi molle (N)	Sud ouest	Vente
<i>Ouarglia</i>	Demi molle (N)	Sud ouest	Fruit frais
<i>Tim-nacer</i>	Sèche (N)	Sud ouest	Vente/Sahel
<i>Taker-boucht</i>	Demi molle (T)	Touat, Gourara	Vente locale
<i>Aghrs</i>	Sèche (T)	Touat	Conservation

P : Précoce (Période de récolte en fin Août).N : Normale (Période de récolte en Septembre)

T : Tardive (Période de récolte en Novembre).

### II.5-La composition biochimique

#### II.5-1 Composition biochimique de la partie comestible "Pulpe "

La teneur en eau est en fonction des variétés, du stade de maturation et du climat. Elle varie entre 8 et 30 % du poids de la chair fraîche avec une moyenne d'environ 19 % (Noui., 2007).

Les sucres sont les constituants majeurs de la datte. L'analyse des sucres de la datte a révélé essentiellement trois types : saccharose, fructose et glucose (Estanove., 1990; Acourene et Tama., 1997). Ceci n'exclut pas la présence d'autres sucres en faible proportion tels que : le galactose, le xylose et le sorbitol (Favier et al., 1993; Siboukeur., 1997).

La teneur en sucres totaux est très variable, elle dépend de la variété et du climat. Elle varie entre 70 et 90 % du poids de la matière sèche (Belguedj., 2001).

La datte est riche également en fibres, elle en apporte 8.1 à 12.7 % du poids sec, (**Al-Shahib et Marshall., 2002**). Selon **Benchabane (1996)**, les constituants pariétaux de la datte sont : la pectine, la cellulose, l'hémicellulose et la lignine.

Les dattes fines, comme la *Deglet-nour*, ne contiennent qu'une faible proportion en cette substance, mais des proportions plus élevées atteignant parfois plus de 10 % dans le cas des dattes communes particulièrement fibreuses (**Munier., 1973**).

Les dattes présentent des teneurs faibles en composés protidiques, généralement moins de 3% (**Besbes et al., 2009**). La pulpe des variétés algériennes renferme une faible quantité de protéines variant entre 0.3 et 2.5% (**Noui., 2001**).

La datte renferme une faible quantité de lipides. Leur taux varie entre 0,43 et 1,9 % du poids frais. Cette teneur est en fonction de la variété et du stade de maturation. (**Djouab., 2007**).

**Yahiaoui (1998)** a étudié la composition en acides gras qui se trouvent dans la variété *Deglet Nour*, celle-ci est comprise entre 7 et 13%.

La pulpe de dattes contient également de minéraux et d'oligoéléments particulièrement abondants dépassant nettement les autres fruits secs (**Benchelah et Maka., 2008**), des vitamines en quantités variables avec les types de dattes et leur provenance. En général, elle contient des caroténoïdes et des vitamines du groupe B en quantités appréciables, mais peu de vitamine C (**Munier., 1973**).

D'autre part, la datte renferme des métabolites secondaires dits composés phénoliques, l'analyse qualitative des composés phénoliques de la datte a révélée la présence des acides cinnamiques, des flavones, des flavanones et des flavonols (**Mansouri et al., 2005**).

Selon **Henk et al., (2003)**, les polyphénols jouent un rôle important dans le corps : ils ont des effets anti-inflammatoires, antioxydants, abaissent la tension artérielle et renforcent le système immunitaire...etc.

Les enzymes à leur tour jouent également un rôle important dans le processus de conversion se produisant pendant le stade de formation et la maturation du fruit. La qualité de la datte est influencée par l'activité de :

- L'invertase : responsable de l'inversion du saccharose en fructose et glucose.
- La cellulase : elle décompose la cellulose en chaînes plus courtes.

- La pectinmethylesterase : elle convertit les substances pectiques insolubles en pectine plus soluble qui ramollit le fruit.
- La polyphenoloxydase : elle conduit au brunissement du fruit suite à l'oxydation des phénols (**Yahiaoui., 1998**).

Bien que 95% des constituants sont cités ci- dessus, il existe d'autres composés sous forme de traces tels que :

- Les acides organiques : l'acide citrique, l'acide malique.....
- Les substances volatiles : l'éthanol, l'isobutanol, l'isopentanol.
- Les pigments : les caroténoïdes, la chlorophylle..... (**Benchabane., 1996**)

### **II.5-2.Composition biochimique de la partie non comestible "Noyau "**

Le noyau présente 7 à 30 % du poids de la datte. Il est composé d'un albumen blanc, dur et corné protégé par une enveloppe cellulosique (**Espiard., 2002**).

Les travaux de recherche menés sur la composition des noyaux de certaines variétés de datte d'Arabie Saoudite ont démontré la présence de protéines, de glucides, de lipides, et de minéraux (K, P, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu). En plus des protéines, le noyau contient des acides gras tels que l'acide oléique, palmique, laurique, linoléique et palmitique mis en évidence dans l'huile extraite des graines (**Al Houti et al., 1998**).

## *Chapitre 2*

# *La polyphénol oxydase*

## II. Polyphénol oxydase

### II.1 Historique

La polyphénol oxydase a été découverte pour la première fois en 1856 par Schoenbein dans le champignon *Boletus luciferus*. Il a noté que l'extrait de ce champignon catalyse l'oxydation en aérobie de certains composés en formant un pigment bleu dans les plantes (Whitaker., 1995).

La polyphénol oxydase a été extraite pour la première fois simultanément par Kubowitz (1938) à partir des pommes de terre et par Keilin et Mann (1938) à partir d'*Agaricus bisporus*.

C'était la première enzyme purifiée par chromatographie d'affinité (Lerch., 1983; Jolivet *et al.*, 1998). Bien que la polyphénol oxydase ait été découverte il y'a bien longtemps, ce n'est qu'en 1998 que la première structure cristallographique de la PPO a été rapportée et c'était pour l'enzyme de *Impomea batatas* (Klabund *et al.*, 1998), et depuis, la PPO a suscité plus d'attention et plusieurs études sérieuses ont été portées d'une part sur la compréhension de mécanisme réactionnel et d'autre part sur le rôle de l'enzyme dans le brunissement enzymatique (Seo *et al.*, 2003; Halalouili *et al.*, 2006; Virador *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2013; José *et al.*, 2014).

### II.2 Définition, classification et nomenclature de la PPO

#### II.2.1 Définition

La polyphénol oxydase (PPO) appartient au groupe des oxydoréductases, elle est largement répandue dans le règne microbien, végétal et animal et participe dans la mélanogénèse chez les mammifères et/ou dans le brunissement enzymatique des fruits et des légumes. Bien que le terme générique de PPO soit couramment utilisé, il s'agit en réalité d'une vaste famille d'enzymes réunissant les tyrosinases (EC 1.14.18.1), les catéchol oxydases (EC 1.10.3.1) et les laccases (EC 1.10.3.2) (Mesquita et Queiroz., 2013).

#### II.2.2 Classification et nomenclature

L'union internationale de biochimie avait donné aux enzymes des noms systématiques fondés sur le type de réaction qu'elles catalysent et sur la spécificité de leurs substrats. L'o-diphénoloxydase qui appartient au groupe des oxydoréductases a été définie par Dixon et Webb (1964) comme l'o-diphénol : oxygène, oxydoréductase (EC 1.10.3.1), le nom tyrosinase, très souvent donné à l'enzyme, était, par conséquent, en contradiction

avec la nomenclature officielle. C'est pourquoi en 1972, cette nomenclature a été modifiée et le complexe nommé monophénol, dihydroxyphénylalanine : oxygène, oxydoréductase (EC 1.14.18.1) (Martinez et Whitaker., 1995; Mesquita et Queiroz., 2013).

La PPO catalyse l'o-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (l'activité diphénolase) avec l'oxygène comme oxydant primaire (Mayer., 2006; Mesquita et Queiroz., 2013).

L'activité monophénolase (EC 1.14.18.1), également appelée hydroxylase ou crésolase, est toujours couplée à l'activité diphénolase (EC 1.10.3.1), catécholase ou oxydase. Toutefois, l'activité diphénolase n'est pas toujours précédée par l'activité hydroxylase (Mayer., 2006; Mesquita et Queiroz., 2013).

La laccase (p-diphenol: oxygène oxydoréductase, EC 1.10.3.2) est un autre type de polyphénol oxydase, présente dans certains végétaux supérieures (Zhang et al., 2010).

### II.3 Caractéristiques réactionnelles et structurales des PPO

#### II.3.1 Caractéristiques réactionnelles

La PPO accomplit l'o-hydroxylation des monophénols (activité monophénolase ) et l'oxydation des o-diphénols en o-quinones (l'activité diphénolase ) avec l'oxygène comme oxydant primaire (Zawistowski et al., 1991).

##### II.3.1.1 Activité monophénolase (EC 1.14.18.1)

Les monophénol oxydases ou monooxygénases catalysent l'hydroxylation des monophénols en o-diphénols (Fig.4). Cette enzyme est également appelée tyrosinase car la L-tyrosine est le substrat monophénolique majeur dans le règne animal. Cette enzyme est également appelée crésolase en raison de sa capacité à utiliser le crésol comme substrat.

L'activité monophénol oxydase est généralement peu étudiée dans les plantes car la réaction d'hydroxylation est beaucoup plus lente que la réaction d'oxydation formant les quinones et initiant les réactions de brunissement. (Mayer et al., 2006; Martinez et al., 2012).

##### II.3.1.2 Activité catéchol oxydase (EC 1.10.3.1)

L'oxydation des substrats o-diphénoliques en o-quinones en présence d'oxygène est catalysée par l'activité o-diphénoloxydase également appelée catécholase ou catéchol oxydase. Cette dernière a été l'objet de nombreuses recherches en raison de son haut pouvoir catalytique dont découle la formation des quinones puis la production des polymères bruns appelés mélanoidines (Lerner., 1953).

### II.3.1.3 La laccase (EC 1.10.3.2)

La laccase se caractérise par son activité p-diphénoloxydase qui s'ajoute à l'activité o-diphénol oxydase (Figure 4). L'oxydation des substrats phénoliques par la laccase, génère la formation d'un radicale semi-quinone et s'accompagne par la réduction de l'oxygène en eau par un mécanisme dit ping-pong (**Giardina et al., 2010**).

Ces enzymes ont été trouvés dans différentes espèces de plantes, d'insectes et les bactéries (**Loera et al., 2006; Madhavi et Lele., 2009**).

Cependant, la majorité des laccases décrites dans la littérature ont été isolés à partir des champignons supérieurs, les laccases fongiques les plus connus sont des enzymes extracellulaires, chez les végétaux supérieures, elles assurent trois rôles important incluant la formation de pigment, la dégradation de la lignine et de désintoxication (**Loera et al., 2006**).

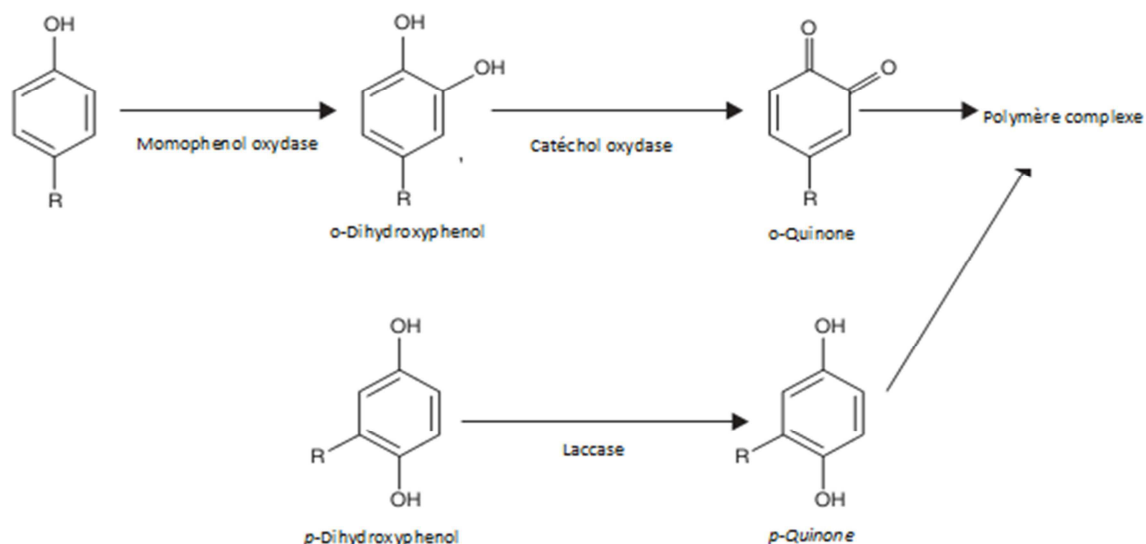


Figure 4 : Schéma des différentes réactions catalysées par les polyphénoloxydases.

### II.3.2 Caractéristique structurales

En général, le poids moléculaire de PPO varie considérablement d'une source à une autre, les PPO de nombreuse sources végétales ont des masses moléculaires de 32 à plus de 200 kDa, essentiellement dans l'intervalle de 35-70 kDa (**Van Gelder et al., 1997; Klabunde., 1998; Yang et al., 2000; Virador et al., 2010**).

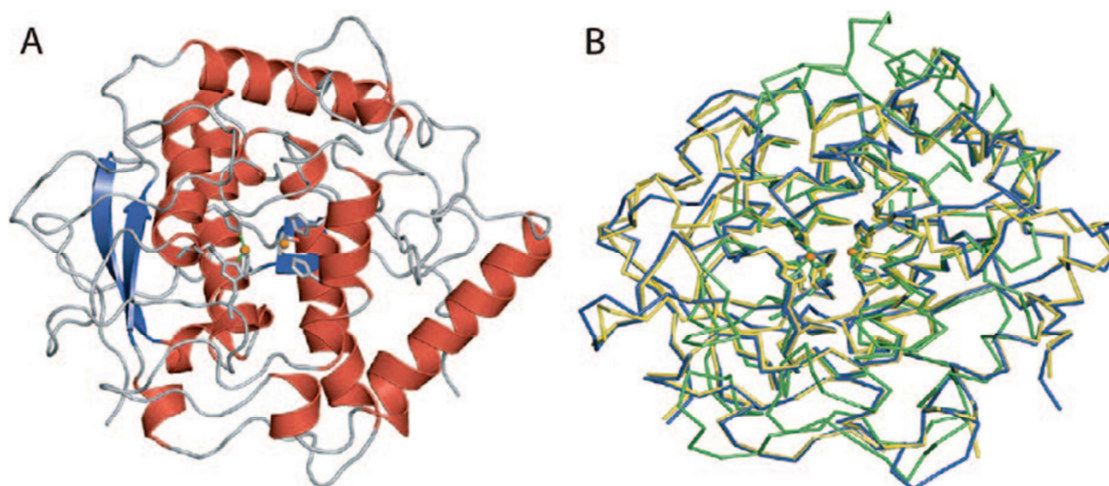
La PPO est une métalloenzyme contenant une paire de cuivre, qui est le site d'interaction avec l'oxygène et le substrat phénolique, ce type de site actif à cuivre, est désigné sous le nom de « cuivre type 3 » et on le trouve également chez l'hémocyanine, la laccase, l'ascorbate oxydase et la céruloplasmine (**Yang et al., 2000**).

**Garcia-Borronet Solano (2002)** décrivent le site actif de la PPO, comme une sphère hydrophile, délimitée par 4 hélices  $\alpha$  et contenant 6 résidus imidazole. Cette sphère hydrophile, est située dans une poche hydrophobe, formée par des résidus aromatiques. La configuration du site actif des PPOs, est maintenue par des forces électrostatiques ou, par des interactions ioniques. Une autre caractéristique du site actif des PPOs, est la liaison covalente thio-éther entre une cystéine et un des résidus histidyl lié au cuivre du site actif (**Lerch., 1983**).

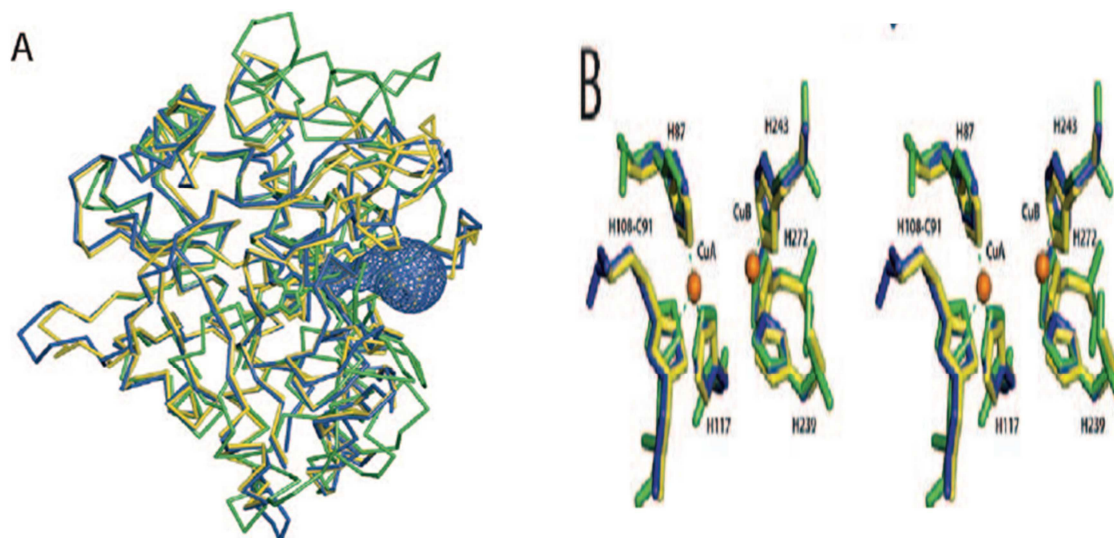
Une telle liaison covalente, cystéine-histidine, est également constatée dans la catéchol oxydase de patate douce (*Ipomeabatatas*) (**Klabunde et al., 1998**). Selon ces auteurs, cette structure optimise le potentiel redox du cuivre pour l'oxydation des o-diphénols et permet ainsi, un rapide transfert d'électrons lors des phénomènes redox. Elle est également responsable de la régulation de l'activité enzymatique (**Mayer., 1987**).

La structure cristalline de la PPO de *Vitisvinifera* a été récemment résolue (**Virador et al., 2010**), sa similitude avec les structures cristallines de la catéchol-oxydase de *Ipomeabatatas* (**Klabunde., 1998**) et l'hémocyanine de *Enterocarpusdofleini* (**Cuff., 1998**) soutient d'avantage la théorie d'un mécanisme catalytique identique entre ces dernières enzymes.

La PPO de *Vitisvinifera* est une protéine monomérique de 38,4 kDa (figure 5). La structure secondaire est essentiellement  $\alpha$ -hélicoïdale avec un noyau formé de quatre  $\alpha$ -hélices ;  $\alpha_4$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_{12}$ , et  $\alpha_{14}$ , le centre catalytique formé de deux atomes de cuivre est entouré par les hélices  $\alpha_3$  et  $\alpha_9$ , et de plusieurs coudes  $\beta$ . Deux ponts disulfures (Cys 11–Cys 26 et Cys 25–Cys 88) aident à ancrer la région N-terminale riche en boucle. La paire de cuivre (CuA et CuB) (figure 6) du site actif, est coordonnée par trois résidus histidine fournis par les quatre hélices  $\alpha$ . Le CuA est coordonné par l'His 87, His 108, et l'His 117. L'His 87 est situé au milieu de l'hélice  $\alpha_4$ , tandis que l'His 108 et His 117, sont au début et au milieu de l'hélice  $\alpha_5$ . Le second cuivre, CuB, est coordonné par l'His 239, His 243 et l'His 272. Ces résidus d'histidines, sont localisés au début et à la fin de l'hélice 12 et 14, respectivement. H108, se lie de façon covalente au Cys 91 (**Virador et al., 2010**).



**Figure 5** : Diffraction aux rayons X de la PPO de *V. vinifera*. (A) modèle de ruban montrant la forme ellipsoïdale générale, les deux  $\beta$ -feuilles (Bleu), les quatre hélices (Rouge) et le centre à deux cuivre (deux boules rouge). (B) Représentation de Cade *V. vinifera* PPO (bleu) avec ceux de la PPO de la patate douce (jaune) (18) et *Neurospora crassa*(vert).



**Figure 6** :Site actif de la PPO de *V. vinifera* PPO (bleu) et la patate douce(jaune) et *N. crassa* enzyme (vert) (a) l'entrée de site actif à la surface de l'enzyme utilisant CAVER, b) Détail sur la coordination des chaînes His avec les deux atomes de cuivres , la distance internucléaire était :Cu-Cu, 4,17Å°; CuA à H87,2.07°; à H108 ,2.16°; H117, 2.35°; CuB à H239, 2.04Å°;à H243, 2.15Å°; à H272, 2.02Å

## II.4 Sources et localisation et rôle physiologique des PPOs

### II.4. 1 Source et localisation

La distribution de la PPO dans les différentes parties des fruits et légumes et le rapport de l'enzyme liée sur l'enzyme soluble peuvent être considérablement inégales. Le niveau de l'activité de la PPO dans les plantes dépend de l'espèce, du cultivar, de la maturité, de l'âge et le stockage et peut chuter jusqu'à des niveaux négligeables dans

certains cas. L'activité de PPO est très basse dans les jeunes plantes, souvent indétectable (**Mayer et Harel., 1991**).

La localisation subcellulaire attribuée à la PPO a une fonction physiologique (**Mayer et Harel., 1979**), l'emplacement de la PPO a toujours été d'un intérêt particulier pour les chercheurs dans le domaine agro-alimentaire. La PPO se trouve dans une variété de fractions subcellulaires telles que les peroxysomes, les mitochondries et les microsomes (**Harel et al., 1964; Shomer et al., 1979; Mayer et Harel., 1979; Martinez et al., 1989**).

Chez les plantes saines, la PPO est majoritairement présente dans les plastides, alors qu'elle est libérée dans le cytoplasme des fruits murs ou endommagés (**Zawistowski et al., 1991; Whitaker et Lee., 1995**). Chez les mammifères, elle est localisée dans les mélanocytes de la rétine et de la peau (**Claus et Decker., 2006**).

### II.4.2 Rôle physiologique

La localisation spécifique des formes actives des PPO laisse supposer que cette enzyme intervient directement dans la photosynthèse et/ou dans la régulation de la concentration en oxygène actif dans les chloroplastes (**Kuwabara et Katoh., 1999**).

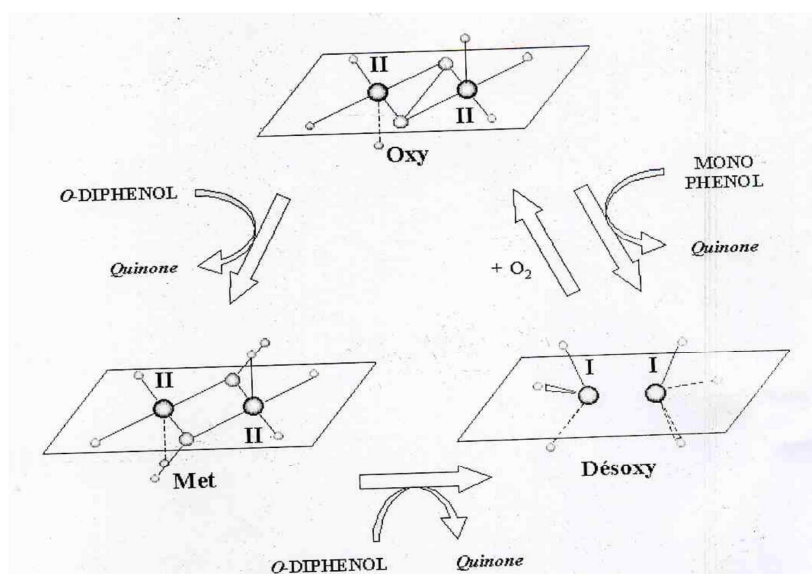
En support à cette hypothèse, **Lax et Vaughn (1991)** ont montré que la PPO était structurellement associée au photosystème II dans la fève (*Vicia faba*). Dans les plantes, les PPO jouent également un rôle de résistance contre les infections microbiennes, virales et contre les mauvaises conditions climatiques (**Martinez et Whitaker., 1995**).

Les mécanismes de défense des végétaux impliquant les PPO sont cependant largement controversés (**Mayer et Harel., 1991; Walker et Ferrar., 1995**) et plusieurs hypothèses sont émises. La PPO est impliquée dans divers processus tels que, la pigmentation des vertébrés et mammifères, ainsi que le brunissement des fruits et des légumes (**Whitaker., 1995; Fenoll et al., 2004**).

Chez les insectes, la PPO est impliquée dans la sclérotisation de l'exosquelette et aussi, dans la protection contre d'autres organismes par leur encapsulation dans la mélanine (**Steffens et al., 1998**). Par son activité hydroxylase, cette enzyme participe également dans la biosynthèse des composés phénoliques (**Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski et al., 1991**).

### II.5 Mécanismes réactionnelles de la catalyse enzymatique

Les mécanismes réactionnels de la catalyse enzymatique sont principalement décrits pour les PPOs d'origines fongiques. D'après **Sanchez-Ferrer et al., (1995)**, le site actif des PPOs peut exister sous trois formes selon la valence du cuivre et la liaison avec l'oxygène moléculaire. La forme *Met* représente l'état majoritaire (ou de repos) dans les extraits enzymatiques. Elle est susceptible d'oxyder les diphénols en quinones. Le site actif (Figure 7) passe alors sous forme *Désoxy* dans laquelle les deux atomes de cuivre sont sous forme réduite. Ils deviennent alors capables de fixer l'oxygène moléculaire pour passer sous la forme *Oxy*. Cette dernière peut prendre en charge aussi bien les mono que les o-diphénols. Le passage d'une forme à l'autre entraîne des modifications de la géométrie spatiale des six atomes d'azote des résidus histidine et le rapprochement des deux atomes de cuivre l'un par rapport à l'autre (forme *Désoxy*). Ces phénomènes sont liés à des légères modifications de la conformation tridimensionnelle de l'enzyme au cours de la catalyse (**Eicken et al., 1999**).



**Figure 7:** Interrelation entre les trois états fonctionnels de la PPO (*Met*, *Deoxy*, et *Oxy* PPO) d'après **Van Gelder et al., (1997)**.

### II.6 pH et Température optimale

Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale, mais il est généralement dans la gamme de 4,0 à 8,0 il est influencé par un certain nombre de facteurs expérimentaux tels que les méthodes d'extraction, de la température, la nature du substrat phénolique et système de tampons utilisé au cours d'élimination (**Mayer et al., 2006**).

La nature du substrat utilisé dans le dosage de l'activité est un autre facteur qui a une influence significative sur le pH optimum de l'enzyme, par exemple, la PPO de persil (**Ziya et Erat., 2012**) présente une activité maximale à pH 8,5 avec le pyrogallol, mais un pH de 4 avec le 4-Méthylcatéchol (Tab.3). Les valeurs de pH optimum en présence de même substrat vis-à-vis des PPO d'origine différente sont également variables dont en présence de L-dopa, la valeur de pH optimum pour le persil égale à 4,5 (**Doğru et Erat., 2012**) tandis que pour celle de chèvre feuille du Japon égale à 7,5 (**Goyeneche et al., 2013**).

Les valeurs de pH optimums de la PPO est également exposé à des changements lorsqu'il est testé en présence d'un détergent, le comportement de la PPO de pomme en fonction de pH est modifié en présence de SDS quel que soit le substrat, l'activité de la PPO de pomme est inhibée à un pH acide et activé à un pH supérieur à 5,0 et ceci en présence de 3,5 mM SDS (**Marques et al., 1995**).

La température est un autre facteur très important influençant sur l'activité enzymatique, la PPO n'appartient pas aux enzymes extrêmement stable à la chaleur. Les traitements thermiques de courtes durées de l'enzyme dans les tissus ou en solution, à des températures de 70 à 90 °C sont, dans la plupart des cas, suffisants pour la destruction irréversible, partielle ou totale de sa fonction de catalyseur. L'exposition à des températures inférieures à zéro peuvent également affecter l'activité enzymatique (**Queiroz et al., 2008**).

**Chutintrasri et Noomhorm (2006)**, ont montré que l'activité PPO d'ananas, a été réduite d'environ 60% après une exposition à 40-60 °C, pendant 30 min. La valeur de la température optimale de la PPO dépend notamment de substrat (Tableau 3), du pH optimum, et également de la source de l'enzyme. Elles varient entre 20 et 65°C. Les résultats montrent que pour une même enzyme, la température optimale peut varier en fonction de substrat, par exemple pour la PPO de radis (**Goyeneche et al., 2013**), des valeurs de températures optimales égales à 40 °C et 20°C, en présence de catéchol et pyrogallol, respectivement, ont été obtenus. Pour deux PPO d'origine différente la température optimale change vis-à-vis de même substrat par exemple en présence de L-tyrosine la PPO de Chien-rose présente une température optimale égale à 65°C. (**Sakiroglu et al., 1996**), tandis que pour la PPO de cerise une valeur de 47 °C a été estimée (**Kumar et al., 2008**).

## Chapitre 2: la polyphénol oxydase

**Tableau 3** : Valeurs de pH et de température optimales de quelques PPO d'origine végétale.

Source	Substrat	pH optimum	Température optimale	Référence bibliographique
<i>Chien-rose</i> ( <i>Rosa dumalis</i> Rechst)	Catéchol	8,5	25	<b>Sakiroglu et al., (1996)</b>
	4-methylcatéchol	8,5	20	
	Pyrogallol	7	15	
	L-Tyrosine	7	65	
	P-cresol	5	60	
<i>Murier blanc</i> ( <i>Morus alba</i> L.)	Pyrogallol	7,5	20	<b>Arslan et al., (2005)</b>
<i>Banane</i> ( <i>Musa cavendishii</i> )	Catéchol	7	30	<b>Ünal et al., (2007)</b>
	Catéchol	7	40	
Cerise ( <i>Malpighiaglabra</i> )	L-Tyrosine	5,2	47	<b>Kumar et al., (2008)</b>
	Pyrogallol	8	30	
<i>Blé</i> ( <i>Triticumaestivum</i> )	Catéchol	4,5	40	<b>Erat et al., (2010)</b>
	Catéchin	5	35	
	pyrogallol	5	30	
	L-dopa	5	40	
	Dopamine	4,5	35	
	4-méthylcatéchol	5	35	
Persil ( <i>Petroselinumcrispum</i> )	Catéchol	4	40	<b>Doğru et Erat., (2012)</b>
	4-Methylcatechol	4	40	
	Pyrogallol	8,5	35	
	L-Dopa	4,5	45	
	Dopamine	8	45	
	Catéchin	4	35	
<i>Radis</i> ( <i>Raphanussativus</i> )	Catéchol	7	40	<b>Goyeneche et al., (2013)</b>
	Pyrogallol	7	20	
<i>Chèvrefeuille</i> ( <i>Lonicerajaponica</i> )	L-Dopa	7,5	25	<b>Na-Na et al., (2013)</b>

### II.7 Spécificité de la PPO

Les composés phénoliques sont des substances naturelles qui contribuent à la richesse sensorielle (couleur, goût, arôme et texture) associée à la qualité des fruits, toutefois, les PPO des plantes présentent de grandes spécificités vis-à-vis de ces composés et sont capables d'oxyder une variété de mono, di ou des polyphénols (**Es-Safi et al., 2003**).

Les deux activités de la PPO, monophénol oxydase (crésolase) et diphenol oxydase (catécholase) peuvent catalysées une grande variété des substrats (**Whitaker., 1995**). L'activité diphenolase du PPO est généralement la plus répandue dans les plantes, quand les deux activités monophénolase et diphenolase sont présentes, le rapport de l'activité monophénolase à celle de l'activité diphenolase varie de 1:10 à 1:40 selon les sources végétales (**Perez et al., 2001; Mesquita et Queiroz., 2013**).

La catéchine (3-hydroxy flavane), la 3,4-dihydroxy phénylalanine (DOPA), la tyrosine, et les esters d'acide cinnamique sont les substrats naturels de la PPO, trouvés dans les fruits et légumes (**Zawistowski et al., 1991; Vámos-Vigyázó., 1981; Trebst et Depka., 1995**).

Ces composés phénoliques sont des substrats primaires de PPO (Figure 8). Les types et les concentrations relatives des phénols naturels varient considérablement pour les différentes sources végétales. Par exemple, la catéchine est un composé phénolique majeur trouvé dans le thé (**Ullah., 1991**) et le persil (**Doğru et Erat., 2012**), tandis que l'acide chlorogénique est présent dans le radis (**Goyeneche et al., 2013**), et l'aubergine (**Todaro et al., 2011**).

**Yang et al., (2000)** ainsi que **Sojo et al., (1998)**, ont rapporté que le brunissement enzymatique dans la pulpe de banane est causé par l'oxydation du composé phénolique, « la dopamine », en présence de substrats endogènes.

## Chapitre 2: la polyphénol oxydase

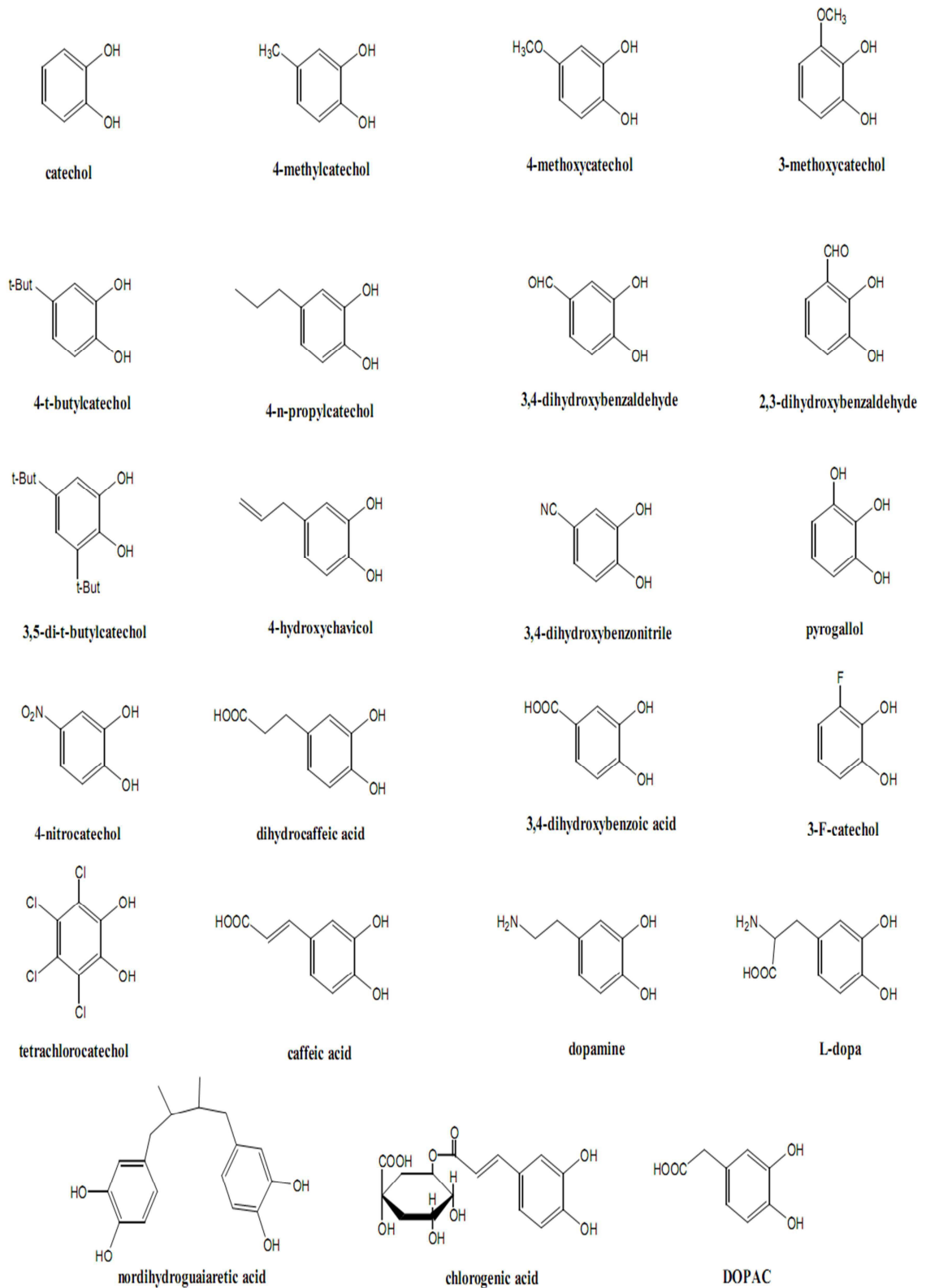


Figure 8: Structure de quelques substrats phénoliques (Majid *et al.*, 2004).

## II.8 Affinité et efficacité

La spécificité de l'enzyme est évaluée en estimant deux paramètres cinétiques: la valeur de  $K_m$  qui rend compte de l'affinité de l'enzyme pour le substrat et la vitesse maximale de catalyse  $V_{max}$ . Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO varient avec le type de substrat, le tampon, la température, la source d'enzyme, et la méthode utilisée pour son extraction (**Dogan et Dogan., 2003; Ziyen et Pekyardimci., 2004**).

Les valeurs de  $K_m$  varient entre  $7,4\mu\text{M}$  et  $77\text{mM}$  (Tableau 4) avec une meilleure affinité pour la PPO de persil vis-à-vis de pyrogallol comme substrat (**Doğru et Erat., 2012**). L'affinité change avec le type de substrat utilisé et/ou même entre deux PPO de sources différentes vis à vis de même substrat. Pour la PPO de radis, par exemple, des valeurs de  $K_m$  différentes égales à  $4,2\text{mM}$  et  $77\text{mM}$  en présence d'acide gallique et d'acide caféique, respectivement, ont été estimées (**Goyeneche et al., 2013**). De même, une valeur de  $K_m$  valant 1354 fois plus grande a été estimée pour la PPO de cerise ( $K_m=10,7\text{mM}$ , (**Kumar et al., 2008**) par rapport à celle de persil ( $K_m=7,9\mu\text{M}$ , **Doğru et Erat., 2012**) et ceci en présence de catéchol comme substrat.

Les valeurs de  $V_{max}$  sont également dépendantes de substrat et source d'enzyme et elles ont une gamme comprise entre  $3,22\text{UI}/\text{min}$  et  $1695\text{UI}/\text{min}$ . La comparaison des valeurs de  $V_{max}$  des travaux de **Dogan et al., (2005)** avec celles de **Kumar et al., (2008)** qui ont travaillé sur la PPO de cerise (*Malpghiaglabra*), montre l'effet de la méthode d'extraction et /ou purification sur l'efficacité catalytique de l'enzyme, ainsi, les valeurs de vitesses maximales changent pour la même enzyme en fonction de substrat utilisé.

Pour la PPO de radis (**Goyeneche et al., 2013**), un rapport de 8 fois plus grand en utilisant l'acide caféique par rapport au catéchol comme substrat a été rapporté.

**Tableau 4:** Paramètres cinétiques de quelques polyphénol oxydase d'origine végétale.

Source	substrat	Vmax	$K_m$ (mM)	Référence bibliographique
Cerise ( <i>Malpighiaglabra</i> )	Catéchol	6,97( $\mu$ M/min)	10,7	<b>Dogan et al., (2005)</b>
	Pyrogallol	13,93	11,6	
	4-méthylcatéchol	12,20	5,2	
Cerise ( <i>Malpighiaglabra</i> )	Catéchol	79.5( $\mu$ M/min)	10.7	<b>Kumar et al., (2008)</b>
	pyrogallol	8.8( $\mu$ M/min)	5.2	
	4-méthylcatéchol	125( $\mu$ M/min)	11.6	
Blé ( <i>Triticumaestivum</i> )	Catéchol	3.21(UI/min ml)	0.1243	<b>Erat et al., (2010)</b>
	Pyrogallol	2.43	0.1040	
	4-méthylcatéchol	3.02	0.8861	
Aubergine ( <i>Solanummelongena L</i> )	Catéchol	2,34( $\mu$ M/min)	2,973	<b>Todaro et al., (2011)</b>
	4-methylcatechol	5,55	2.122	
	Acide chlorogénique	2,31	1,351	
Persil ( <i>Petroselinumcrispum</i> )	Catéchol	0,39( $\Delta$ Abs/ml min)	$7,9 \cdot 10^{-4}$	<b>Doğru et Erat., (2012)</b>
	Pyrogallol	0,07	$7,4 \cdot 10^{-4}$	
	4-méthylcatéchol	0,05	$9,7 \cdot 10^{-4}$	
	L-Dopa	0,02	$1,5 \cdot 10^{-4}$	
	Dopamine	0,35	5,93	
	Catéchin	0,06	$1,6 \cdot 10^{-2}$	
Radis ( <i>Raphanussativus</i> )	Acide gallique	233(UI/min ml)	4,2	<b>Goyeneche et al., (2013)</b>
	Acide pyrogallique	4348	6,3	
	Acide chlorogénique	302	7,2	
	L-tyrosine	495	9,3	
	Catéchol	1587	28,3	
	Acide caféique	1695	77.0	

## II.9 Applications de la PPO

Au cours de ces dernières années, les polyphénols oxydases ont suscité un intérêt considérable en raison de leur forte capacité d'oxyder les composés aromatiques. Cette caractéristique rend l'utilisation de polyphénols oxydases très appropriée pour certaines applications biotechnologiques notamment dans l'industrie des aliments, l'industrie des pâtes et papiers, de textile, ainsi dans la médecine et l'environnement.

Les polyphénols oxydases, en particulier les laccases ont d'intérêts dans la cuisson car elles sont capables de former des biopolymères par le phénomène de cross-link (**Rodriguez et Toca., 2006**).

Elles peuvent être également utilisées pour la biosynthèse des antioxydants et colorants alimentaires (**Simsek et Yemenicioglu., 2007**).

L'application des polyphénols oxydases dans l'industrie alimentaire comprend la formation de la couleur et de l'amélioration de la saveur du thé, du cacao et du café, de la pectine de betterave à sucre, la détermination de l'acide ascorbique et de la gélification et également comme un biocapteur (**Polaina et MacCabe., 2007**).

Dans le secteur médical, **Cowan et al., (2000)** ont montré que la polyphénol oxydase peut inhiber l'adhérence de *Streptococcus sobrinus* au niveau de la cavité buccale, de plus, elle peut être utilisée également pour le traitement de la maladie de Parkinson via la conversion de la L-tyrosine en L-DOPA (**Xu et al., 1998; Asanuma et al., 2003**).

En outre, les PPO peuvent faire l'objet de marqueur de vitiligo qui est une maladie auto-immune, et/ou comme agent de traitement en tant que précurseur de médicament et suppresseur de tumeur (**Seo et al., 2003**).

Seule ou parfois associée à d'autres enzymes telle que la laccase (**Kochana et al., 2008; Montereali et al., 2010**), elle est à l'origine de nombreux biocapteurs utilisés principalement pour le dosage des composés phénoliques tels que la dopamine (**Min et Yoo., 2009; Njagi et al., 2010**), le catéchol (**Ameer et Adeloju., 2009; Tan et al., 2010**), le phénol et ses dérivés (**Adamski et al., 2010**).

Dans le domaines agroalimentaire et environnement, les biocapteurs à PPO peuvent être utilisés également pour le dosage de certains polluants chimiques (**Durán et Esposito., 2000**), comme le cyanure (**Shan et al., 2004**), l'acide benzoïque (**Li et al., 2010**), l'acide de sodium (**Cui et al., 2006**), et le fluorure de sodium (**Asav et al., 2009**).

La PPO sous forme soluble ou immobilisée est largement utilisée pour la dégradation du phénol et ses dérivée au niveau des eaux usées (**Yamada et al., 2005**) de même, dans l'industrie de textile, les PPO sont utilisées dans le blanchiment, la teinture et la décoloration (**Rodriguez et Toca., 2006**).

*Chapitre 3*

*Matériels et méthodes*

## I-Matériels

### I.1 Matériel biologique

Les dattes Deglet-nour, Ghars et Degla beida sont utilisées comme source de la polyphénol oxydase (PPO). Elles sont achetées à maturité du marché local de la Wilaya de Laghouat dans la semaine précédant de leur utilisation, et qui sont originaires de Biskra. Les dattes sont lavées avec l'eau distillée, séchées à l'air libre et conservées à 4°C. (Figure 9).



**Figure 9** : Les trois variétés des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars.

### I.2 Produits chimiques

Les réactifs de base utilisés sont les suivants:

- Tampon acétate de sodium: 0,05 M à pH (3,5- 6)
- Tampon phosphate de sodium: 0,05 M à pH (6-8)
- Substrat: 4-Méthylcatéchol
- Acide ortho-phosphorique: 0,1M
- Le polyvinyl(poly)pyrrolidone (PVPP)

Tous les autres produits ou /et réactifs utilisés sont d'un grade analytiques.

### I.3 Matériel utilisé

Spectrophotomètre (uv /vis Thermoscientific HeλIOS γ Spectrophotometer), une centrifugeuse (Fisher Bioblock Scientific); et un vortex mixeur (Warning commercial blender 800EG, model bb90e); un bain marie (grant-sub 28; Memmert ).

## II. Méthodes

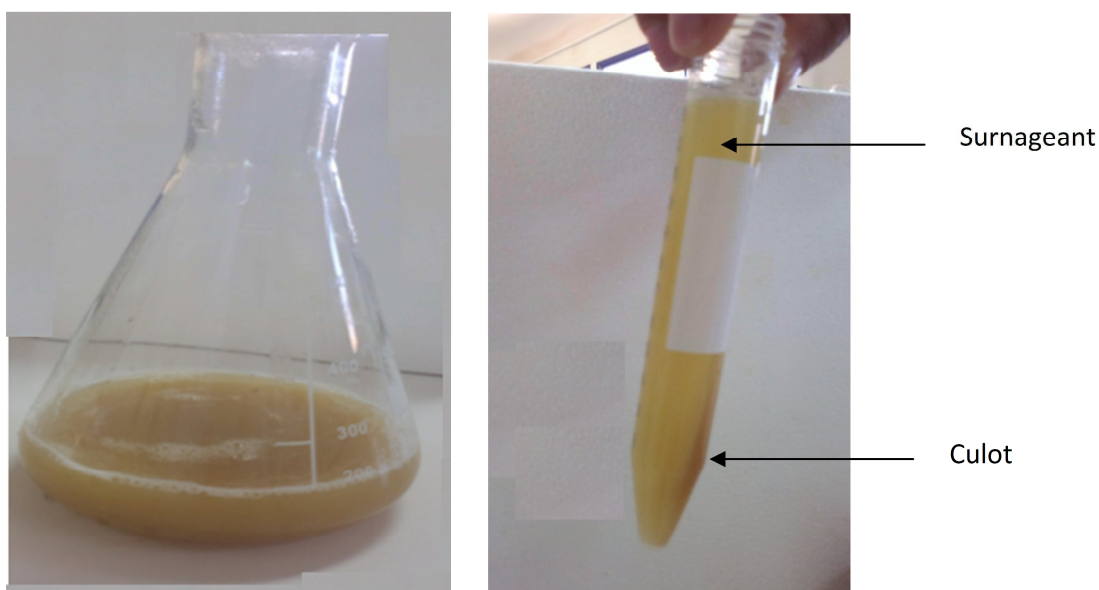
### II.1 Préparation de l'extrait brut de la PPO

L'extraction de la PPO pour les variétés des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars, est réalisée selon le protocole décrit par **Hasgawa (1981)**.

150g de chair des dattes préalablement refroidies à (4°C) sont découpées et homogénéisées dans 200 ml d'une solution d'extraction composée de tampon phosphate de sodium 0,05M à pH 7.0 contenant 2% polyvinyl(poly)pyrrolidone (PVPP) pendant 1 min à l'aide d'un mixeur.

Le broyat obtenu est ensuite filtré par un pressage manuel en utilisant quatre couches de gaze, le filtrat ainsi obtenu est centrifugé pendant 10min à 4000trs/min.

Le surnageant récupéré d'un volume total de 170 ml et de couleur jaunâtre, représente l'extrait brut de la PPO. L'extrait enzymatique brut est divisé dans des tubes coniques de 15 ml qui seront conservés à -10°C (Figure 10).



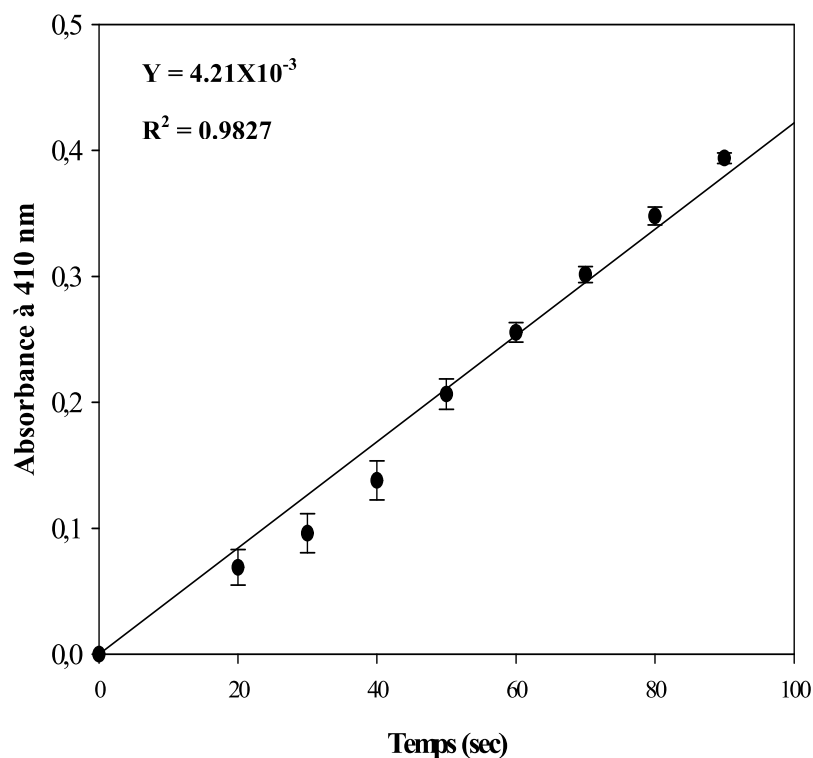
**Figure 10 :** Extrait brut de la datte Deglet Nour (*Phoenix dactylifera* L.) avant et après centrifugation.

### II.2 Mesure de l'activité 4-Méthylcatécholase la PPO

L'activité 4-Méthylcatécholase de l'extrait brut de la PPO de la datte (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet nour a été mesurée à 410 nm en utilisant le 4-Méthylcatéchol comme substrat par la mesure directe de la formation des *o*-quinones à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Scientific HeLIOS  $\gamma$ ) en présence oxygène/aire.

Le 4-Méthylcatéchol à 0.1 M est préparé dans une solution d'acide ortho-phosphorique à 0.1 mM. Le milieu réactionnel contient 0,5 ml de substrat à 50 mM. La réaction d'oxydation est déclenchée par l'ajout de 20  $\mu$ l d'enzyme. La variation de l'absorbance est enregistrée toutes les 10 secondes pendant deux minutes après l'ajout de l'extrait enzymatique. La vitesse initiale ( $v_0$ ) représente la pente de la partie linéaire de la courbe de l'absorbance en fonction du temps (Figure 11).

Les solutions tampon et de substrat sont préincubées dans un bain marie réglé à 30°C pendant 5 min. L'échantillon blanc contient seulement 1 ml de solution tampon acétate avec 20  $\mu$ l d'extrait enzymatique.



**Figure 11:** Exemple de calcul de la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol par la PPO de datte Deglet noir (*Phoenix dactylifera* L.) (pH 5.0-0.05 M tampon acétate de sodium ; 4-Méthylcatéchol 50 mM ; 30°C, extrait enzymatique 20  $\mu$ l).

### II.2.1 Effet du pH sur l'activité 4-Méthylcatécholase de la PPO

L'activité o-diphénolase de la PPO est mesurée à 30°C dans l'intervalle de pH compris entre 3.5 à 8.0. Les systèmes tampons utilisés sont: le tampon acétate de sodium (0.05 M ; pH 3.0-6.0), le tampon phosphate de sodium (0.05 M ; pH 6.0-8.0). Le 4-Méthylcatéchol à 100 mM est utilisé comme substrat.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

### II.2.2 Etude de la stabilité thermique de l'activité 4-Méthylcatécholase de la PPO

L'activité 4-Méthylcatécholase résiduelle de l'extrait brut de la PPO est mesurée après 10 minutes d'incubation des tubes en verre de 1 mm d'épaisseur contenant 20  $\mu$ l d'extrait enzymatique brut dans un bain marie réglé à différentes températures comprises entre 30 à 90°C.

Après traitement thermique, les tubes sont refroidis rapidement dans l'eau froide et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée à pH 5.0 pour les variétés de Deglet noir, Degla beida et 4.5 pour Ghars, (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C, en présence de 100 mM du 4-

Méthylcatéchol comme substrat.

Le pourcentage de l'activité 4-Méthylcatéchol résiduelle de la PPO est calculé par comparaison avec l'enzyme non traitée thermiquement (**Doğan et al., 2005**). L'activité enzymatique résiduelle est calculée à partir de la formule suivante:

$$AR_{(98)} = \left( \frac{A_t}{A_0} \right) \times 100$$

Où:  $A_0$  est l'activité avant traitement thermique (activité de l'enzyme mesurée à 30°C)

$A_t$  est l'activité après traitement thermique.

Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.

### II.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme

La vitesse initiale de l'oxydation de la 4-Méthylcatéchol à 100 mM par la PPO de Deglet nour, Ghars et Degla beida est mesurée à différents volumes croissants de l'enzyme compris entre 10 et 70  $\mu$ l.

L'activité enzymatique a été mesurée à pH 5.0, 4.5, 5.0 respectivement (tampon acétate de sodium 0.05 M) et à 30°C.

### II.2.4 Détermination des paramètres cinétiques de l'activité 4-Méthylcatecholase de la PPO

Pour déterminer les paramètres cinétiques ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) de l'activité 4-Méthylcatecholase de l'extrait brut de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour, cv Ghars et cv Degla beida, l'activité enzymatique est mesurée à pH : 5.0 , 4.5 , 5.0 respectivement (tampon acétate de sodium à 0.05 M) et à 30°C, à différentes concentrations de 4-Méthylcatechol comprises entre 10 à 60 mM.

Les valeurs des paramètres cinétiques ont été estimées à l'aide des représentations graphiques de Michaelis-Menten ( $V_0$  vs  $[S]$ ) et de Lineweaver-Burk (1934) ( $1/V_0$  vs  $1/[S]$ ).

### II.3 Analyse des résultats expérimentaux

L'analyse des données cinétiques observées a été effectuée par l'ajustement à l'aide des régressions linéaires et des régressions non linéaires par l'utilisation des programmes suivants: Table Curve 2D<sup>TM</sup> (Jandel Scientific Windows v2.03, Copyright© 1989-1994), Excel® (Microsoft Excel 97-2003), SigmaPlot 2008 (Systat Software, Inc., Windows Version 11.0) et Origin 6.0 (Microcal (TM) Origin Version 6.0, Copyright © 1991-1999 Microcal Software, Inc.).

*Chapitre 4*

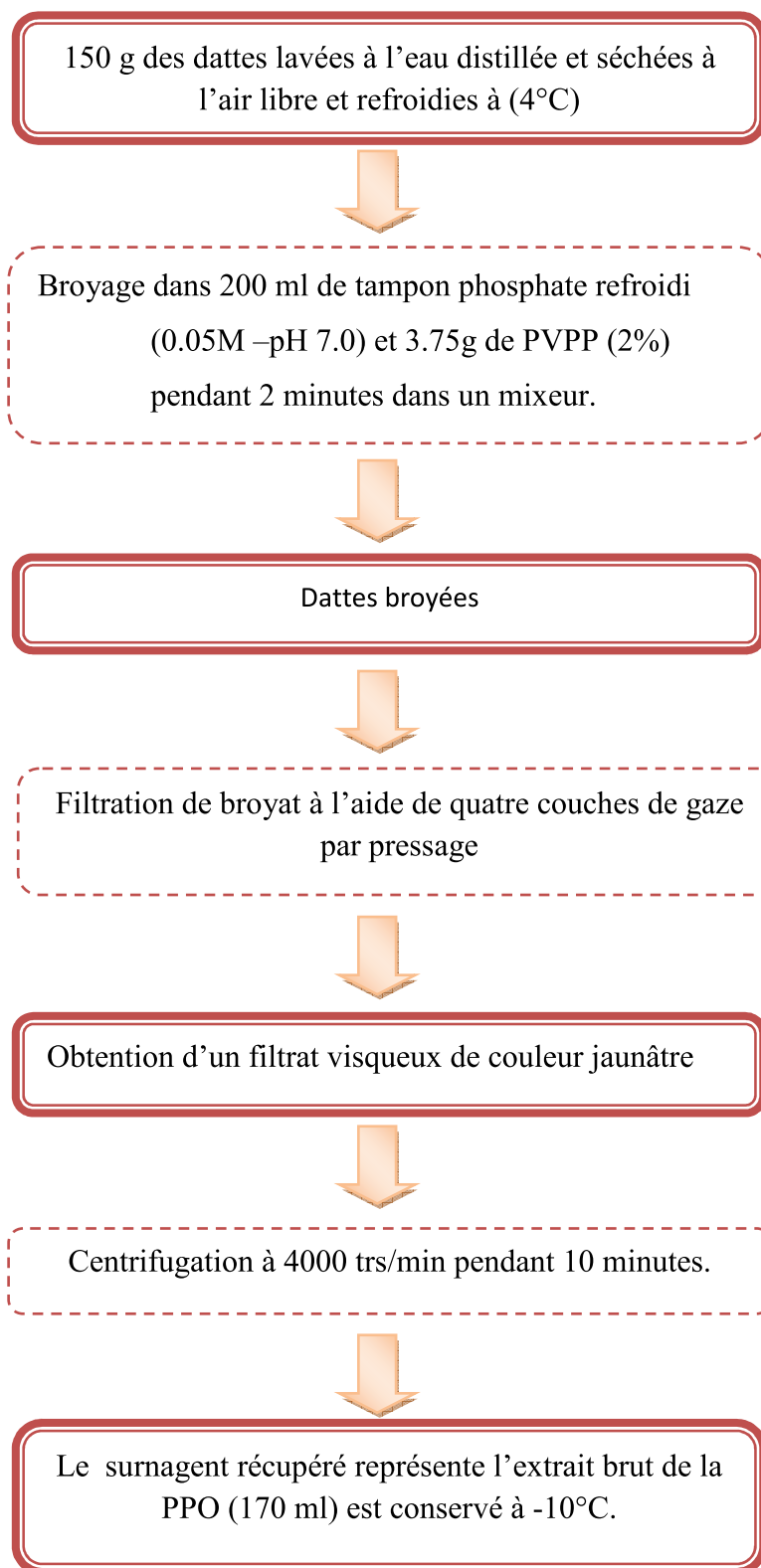
*Résultats et discussion*

### III.1 Extraction de la polyphénol oxydase des dattes

La PPO a été facilement isolée à partir de trois variétés de dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars à l'aide d'un protocole simple à mettre en œuvre. L'extrait enzymatique brut est capable de catalyser l'oxydation de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

L'utilisation de polyvinyl(poly)pyrrolidone (PVPP) l'extraction de la PPO des dattes permet d'éliminer les composés phénoliques endogènes des dattes qui peuvent être oxydés par l'enzyme en o-quinones et qui après leur polymérisation provoquent l'inactivation de la PPO (Wuyts *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007).

Le diagramme de l'extraction de la PPO de ces variétés des dattes est récapitulé ci contre (Figure 12).



**Figure 12:** Protocole d'extraction du polyphénol oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) « cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars ».

### III.2 Les conditions optimales de l'activité 4-Méthylcatécholase

#### III.2.1 Effet du pH

L'influence du pH sur l'activité 4-Méthylcatécholase des dattes cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars a été déterminée en mesurant les vitesses initiales d'oxydation du 4-Méthylcatéchol à différents pH compris entre 3.5 et 8.0.

Les systèmes tampons utilisés sont: le tampon acétate de sodium (0.05 M; pH 3.5-6.0), et le tampon phosphate de sodium (0.05 M; pH 6.0-8.0).

Les figures (13 ;14 et 15) représentent le profil de l'activité 4-Méthylcatécholase relative en fonction du pH en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Les valeurs des pH optimums pour la PPO de ces trois variétés en présence de différents substrats sont regroupées dans le tableau 5.

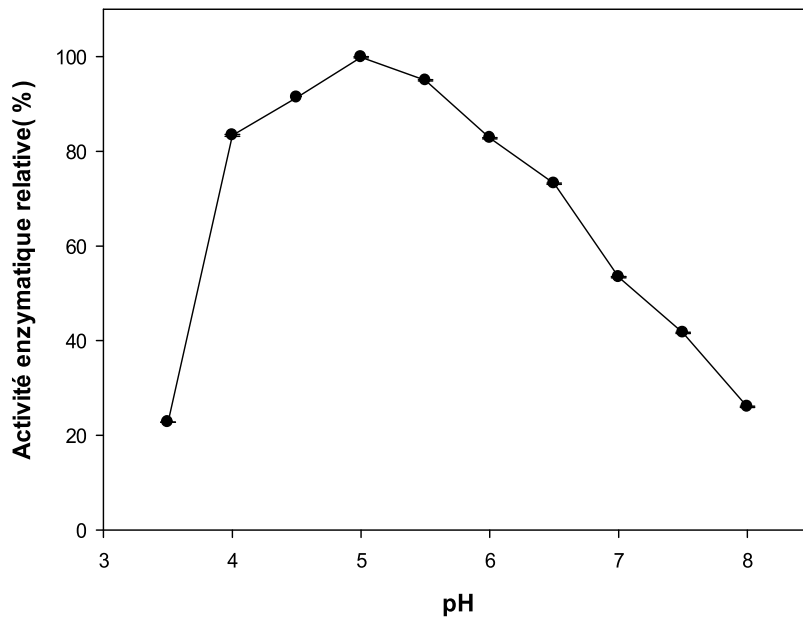
**Tableau 5** : Valeurs de pH optimum de la PPO des dattes en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat

Variété	pH
<i>Deglet nour</i>	5
<i>Ghars</i>	4,5
<i>Degla beida</i>	5

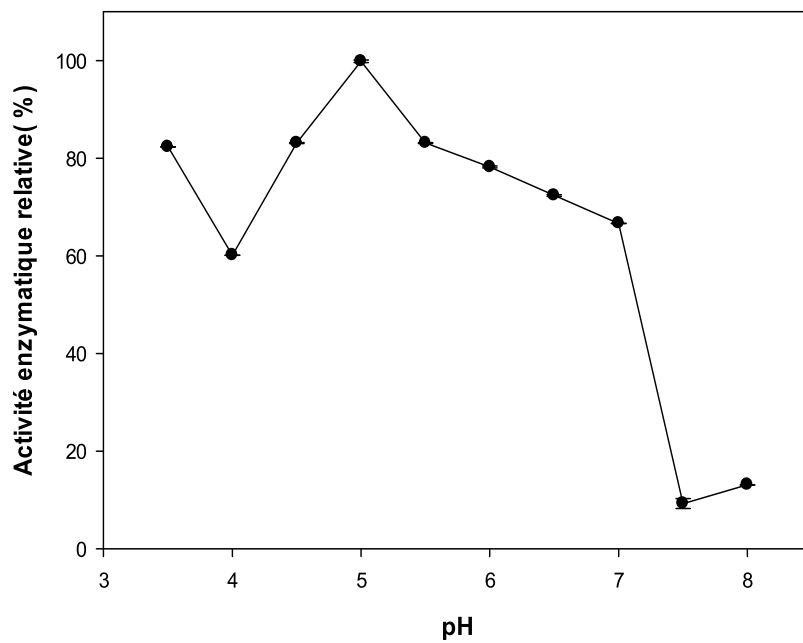
L'activité 4-Méthylcatécholase est maximale à pH 5.0 pour les deux variétés des dattes Deglet-nour et Degla beida, et à pH 4.5 pour la variété de Ghars.

De part et d'autre de ces pH, on assiste à une diminution de l'activité enzymatique qui peut être expliquée par les changements du degré d'ionisation de la 4-Méthylcatéchol et/ou des résidus d'acides aminés du site actif qui donnent naissance aux interactions défavorables entre le site actif de l'enzyme et la 4-Méthylcatéchol. **(Khatun et al., 2001)**.

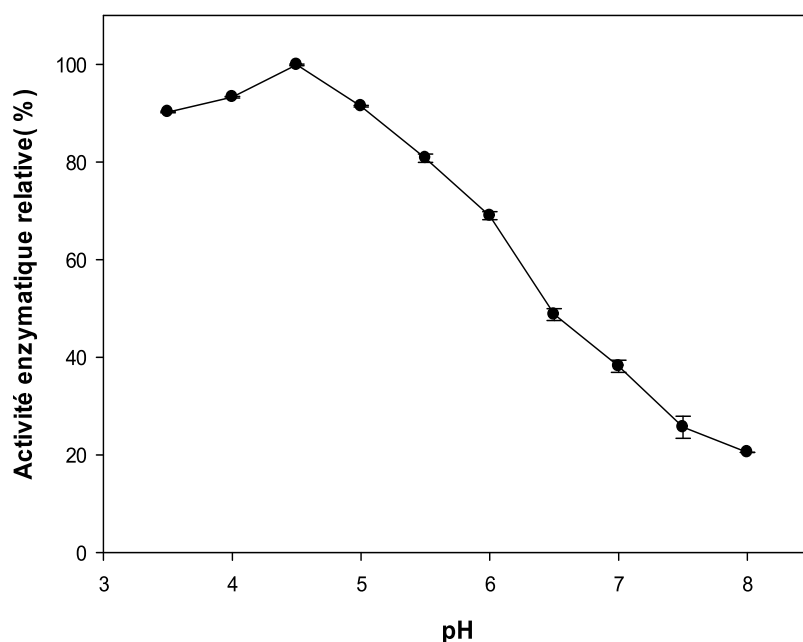
En effet, l'activité enzymatique diminue à cause de changement de degré d'ionisation des groupement de ces résidus localisés à l'intérieur ou au voisinage du site actif de l'enzyme, et qui seront impliqués dans la fixation et/ou la transformation des substrats **(Khatun et al., 2001)**.



**Figure 13:** Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet noir en fonction du pH. (En présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat).



**Figure 14:** Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Degla beida en fonction du pH. (En présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat).



**Figure 15:** Variation de l'activité enzymatique de la PPO de (*Phoenix dactilyfera* L.) cv Ghars en fonction du pH. (En présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat).

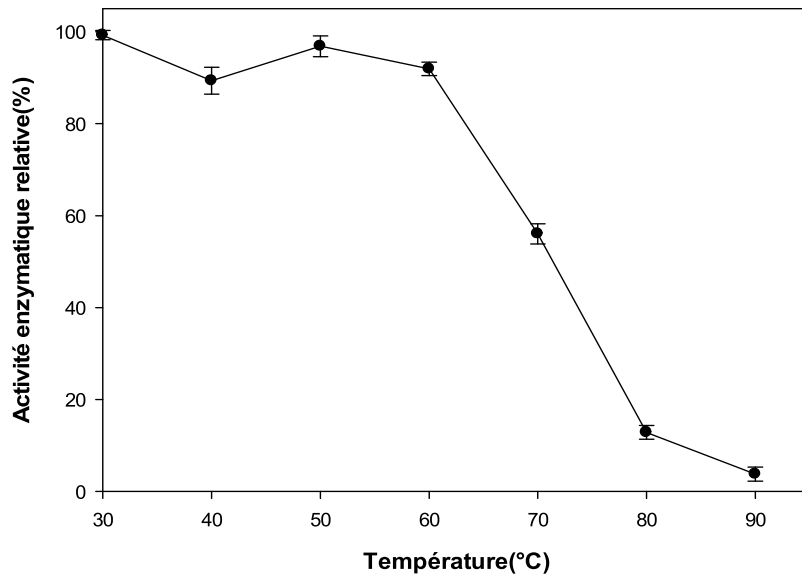
Le pH optimum de la PPO varie largement avec la source végétale mais généralement il est situé dans la gamme de pH 4.0-8.0 (Yoruk et Marshall., 2003).

Il dépend de la source de la PPO, de la nature du substrat phénolique utilisé, de la méthode d'extraction, de la température et de la méthode utilisée pour mesurer l'activité enzymatique (Vámos-Vigyázó., 1981; Whitaker., 1994; Kolcuoğlu et al., 2006).

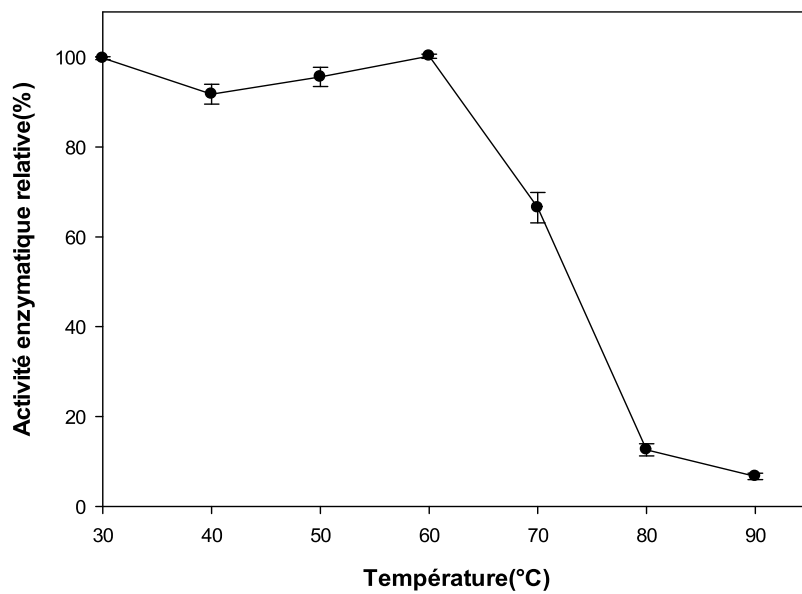
### III.2.2 Etude de la stabilité thermique

Les résultats de l'effet de la température sur l'activité enzymatique de la PPO des dattes en présence de 4-Méthylcatéchol, comme substrat sont représentés dans les figures (16; 17 et 18).

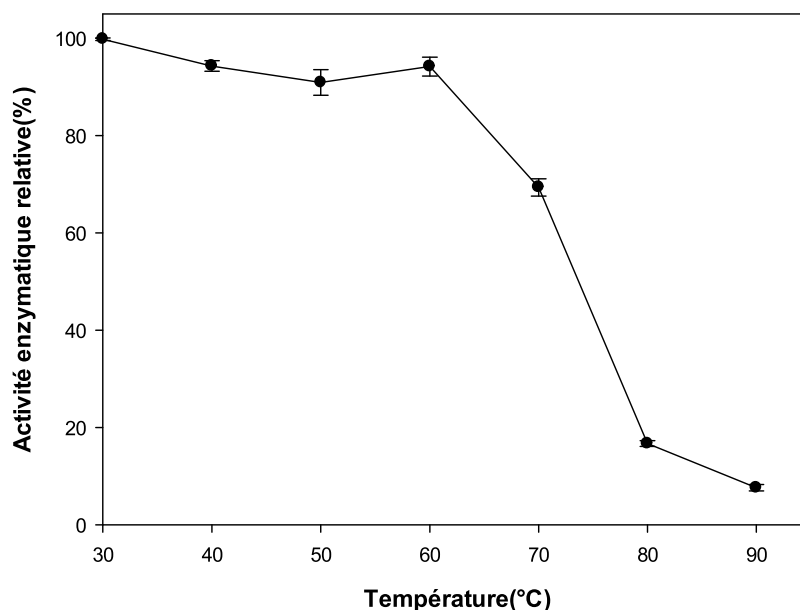
L'activité enzymatique relative a été suivie dans un intervalle des températures compris entre 30 et 90°C en respectant les conditions optimales décrits précédemment dont elle a été mesurée à pH 5.0 pour les deux variétés des dattes Deglet-nour et Degla beida, et à pH 4.5 pour la variété de Ghars, à 30°C en présence de 4-Méthylcatéchol à 20 mM.



**Figure 16 :** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet noir après 10 min de traitement thermique. (En présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat).



**Figure 17:** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Degla beida après 10 min de traitement thermique. (En présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat).



**Figure 18 :** Stabilité thermique de l'activité enzymatique de la PPO des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars après 10 min de traitement thermique. (En présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Comme pour la plupart des réactions enzymatiques, la vitesse des réactions catalysées par la PPO augmente en général avec la température. Cependant, quand la température s'élève au-dessus de 60 à 70°C, l'activité catalytique enzymatique diminue. Ce phénomène résulte de deux effets opposés:

- (a) de l'effet thermique activateur dont une augmentation exponentielle de la vitesse de la réaction avec la température.
- (b) de l'effet thermique dénaturant de la structure de la protéine aux températures plus élevées (Voet., 2011).

Selon la nature du substrat utilisé et la source enzymatique, on remarque que la température optimale est dans la gamme 30-40°C, ainsi pour les trois sources d'enzyme une valeur de 30°C a été estimée en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

**Tableau 6 :** Température optimales de la PPO des dattes en présence de 4-Méthylcatéchol.

Source	Température optimale °C
<i>Deglet nour</i>	30
<i>Degla beida</i>	30
<i>Ghars</i>	30

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés pour les différentes PPO d'origine végétale: *Penaesusjaponicus* (Benjakul et al., 2005), *Macrolepiotamastoidea* (Kolcuoğlu et al., 2006), *Musa cavendishii* (Ünal., 2007), *Ocimum basilicum* (Doğan et al., 2005) et *Castaneaheynryi* (Xut al., 2004). Plusieurs chercheurs ont indiqué que les PPOs ont des températures optimales entre 20 et 40 °C (Arslan et al., 1997; Aydemir., 2004; Duangmal et al., 1999; Fujita et al., 1995; Jiang., 1999; Gawlik-Dziki et al., 2008). En effet, la PPO n'est pas une enzyme thermostable, les traitements thermiques de courtes durées à des températures de 70 à 90°C de l'enzyme en solution ou dans les produits d'origine végétale, sont dans la plupart des cas suffisants pour la destruction irréversible, partielle voire totale de sa fonction catalytique (Vámos-Vigyázó., 1981; Zawistowski et al., 1991; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003).

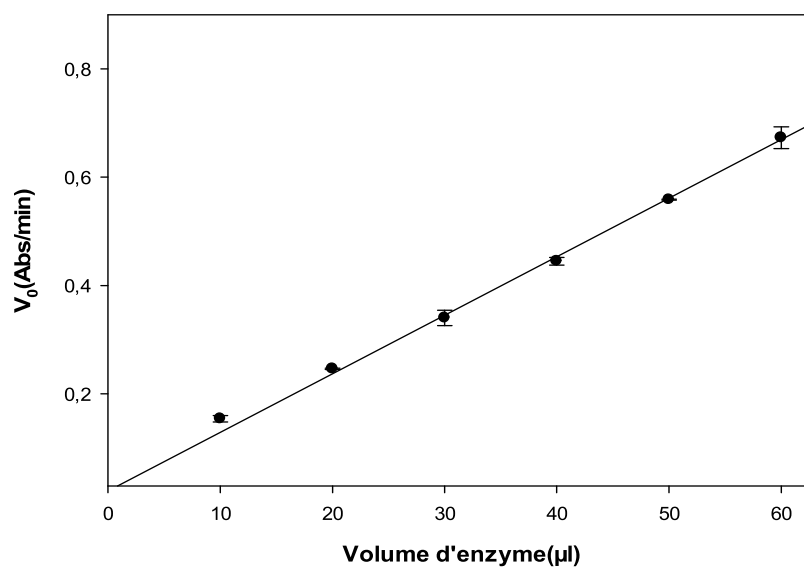
La variation de la température optimale implique que la tolérance thermique des enzymes dépend de plusieurs facteurs y compris la spécificité de substrat, le pH optimum, et à un degré considérable de la source de l'enzyme et/ou de cultivar (Vámos-Vigyázó., 1981; Yemenicioğlu et Cemeroğlu., 2003). Elle peut être liée aussi à la maturité de la plante et/ou aux formes moléculaires de l'enzyme (Zhou et Feng., 1991).

### III.2.3 Effet de la concentration de l'enzyme

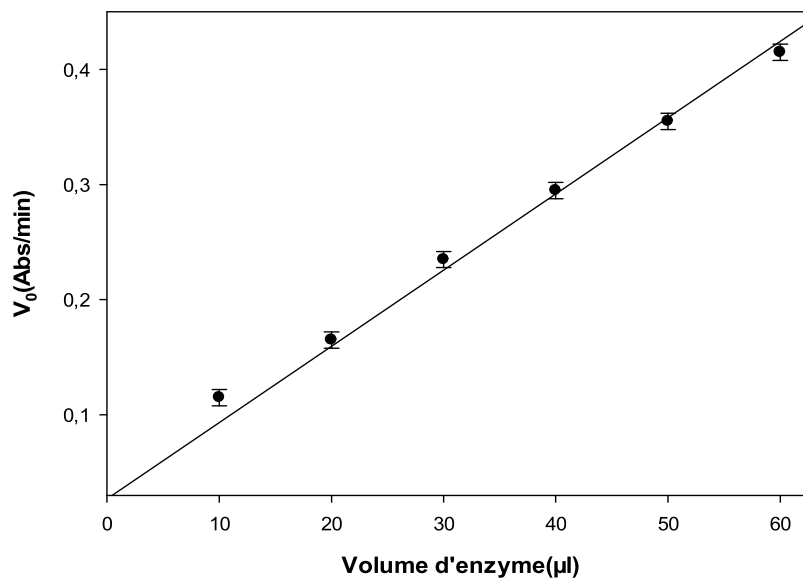
L'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol par l'extrait brut de la PPO des dattes a été étudié tout en respectant les conditions optimales précédemment décrites.

Les figures (19; 20 et 21) représentent le résultat de l'effet de la concentration de l'enzyme sur l'activité de la PPO de Deglet nour, Ghars et celle de degla beida, respectivement.

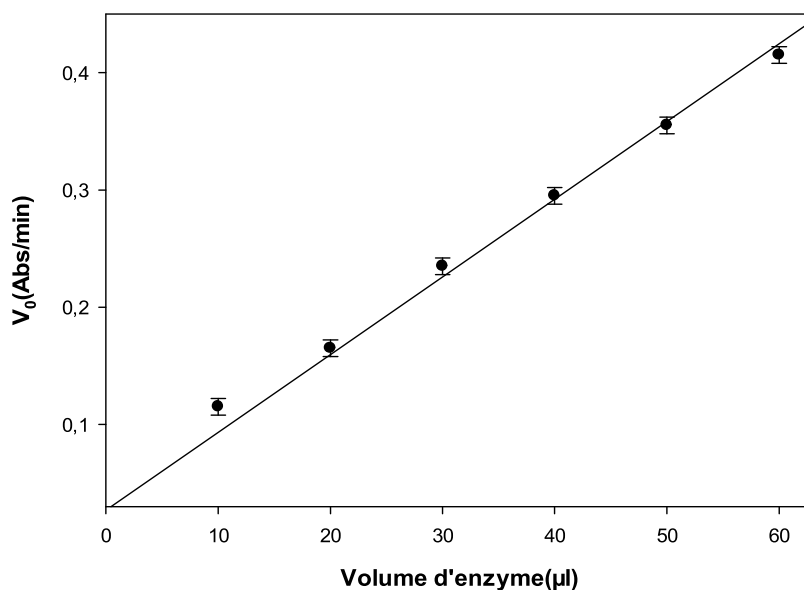
Nous constatons que la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol augmente de manière linéaire avec l'augmentation du volume de l'enzyme dans le milieu réactionnel, à partir de cette relation de proportionnalité nous pouvons estimer la valeur de la constante catalytique et par conséquent d'estimer la concentration de la PPO dans un extrait sans qu'il soit nécessaire d'effectuer sa purification totale (Weil., 2001).



**Figure 19 :** Effet de la concentration de la 4-Méthylcatéchol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet nour sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 5 ; 30°C ; 4-Méthylcatéchol 20 mM)



**Figure 20 :** Effet de la concentration de la 4-Méthylcatéchol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Degla beida sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5 ; 30°C ; 4-Méthylcatéchol 20 mM).



**Figure 21** : Effet de la concentration de la 4-Méthylcatéchol oxydase de (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars sur la vitesse initiale d'oxydation du 4-Méthylcatéchol (tampon acétate 0.05 M-pH 4,5; 30°C; 4-Méthylcatéchol 20 mM).

La constante catalytique correspond à la quantité d'enzyme qui convertit une mole de substrat par seconde et elle est donnée par l'équation suivante:

$$K_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_0} \dots\dots\dots\text{Equation 1}$$

Avec :

Vmax: Vitesse maximale ou activité catalytique.

Kcat: Constante catalytique (temps-1).

[E]<sub>0</sub>: Concentration initiale en enzyme.

Néanmoins, nous ne connaissons pas ici la concentration molaire de l'enzyme et nous ne pouvons donc pas calculer Kcat. Dans la pratique, Kcat ne peut être obtenue par le calcul que si nous disposons d'un modèle cinétique et de la valeur numérique des diverses constantes. De plus, la concentration de l'enzyme ([E]<sub>0</sub>) ne peut être connue, même dans une préparation pure, car la protéine enzymatique n'est qu'un des composants d'un mélange dans des proportions inconnues et variables en fonction du temps, du mode de préparation de l'enzyme et de son origine, etc (Coutouly., 1991).

Nous pouvons caractériser la quantité d'enzyme présente par sa concentration, exprimée en terme de masse ou de moles mais seulement par le produit  $K_{cat} \times [E]_0$ , c'est à dire en terme  $V_{max}$ , activité catalytique par unité de masse de la préparation enzymatique, seule accessible expérimentalement (Coutouly., 1991).

D'après cette expérience, nous avons choisi le volume de l'enzyme de 20  $\mu$ l comme étant convenable pour que la cinétique soit du premier ordre et donc pour la détermination des paramètres cinétiques de la PPO.

### III.2.4 Détermination des paramètres cinétiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques de la PPO des dattes les vitesses initiales ont été mesurées à différentes concentrations de 4-Méthylcatéchol.

L'effet de la concentration du substrat sur l'activité 4-Méthylcatécholase a été étudié dans une gamme de concentration 4-Méthylcatéchol comprise entre 10 et 60mM. Les autres paramètres physico-chimiques ont été maintenus constants (tampon acétate de sodium 0.05mM à pH 5.0 pour les deux variétés des dattes de Deglet-nour et Degla beida, et à pH 4.5 pour la variété de Ghars à une température de 30°C).

Les valeurs des paramètres cinétiques  $V_{max}$ , et  $K_m$  ont été ainsi estimés à partir des représentations de Michaelis-Menten (Equation (2)) et de Lineweaver-Burk (Equation (3)) comme suit (Dalmadi et al., 2006):

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad \dots\dots\dots\text{Equation (2)}$$

$$\frac{1}{V_0} = \left( \frac{K_m}{V_{max}} \right) \left( \frac{1}{[S]} \right) + \left( \frac{1}{V_{max}} \right) \quad \dots\dots\dots\text{Equation (3)}$$

Où :

$V_0$  : est la vitesse initiale de la réaction (Abs/min) ;

$V_{max}$  : est la vitesse maximale de la réaction (Abs/min) ;

$[S]$  : est la concentration de 4-Méthylcatéchol (mM) ;

$K_m$  : est la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat (mM) ou constante de Michaelis-Menten.

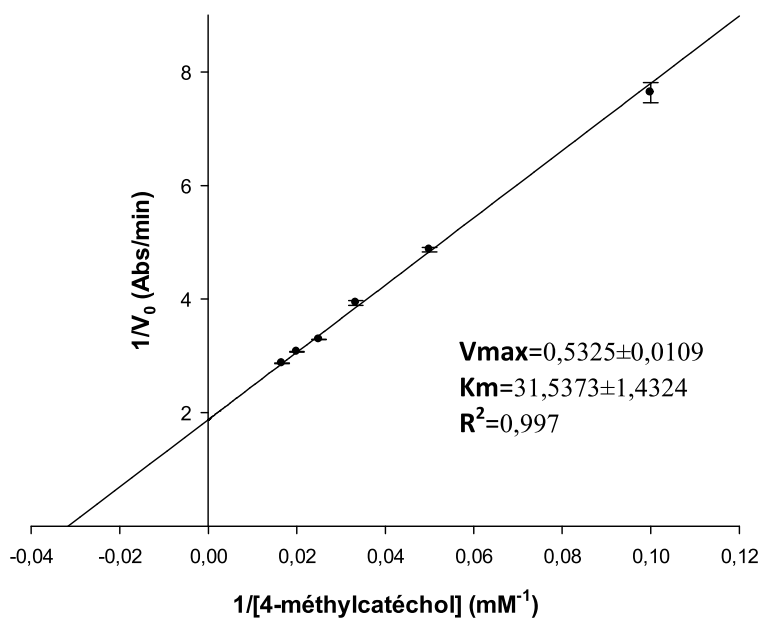
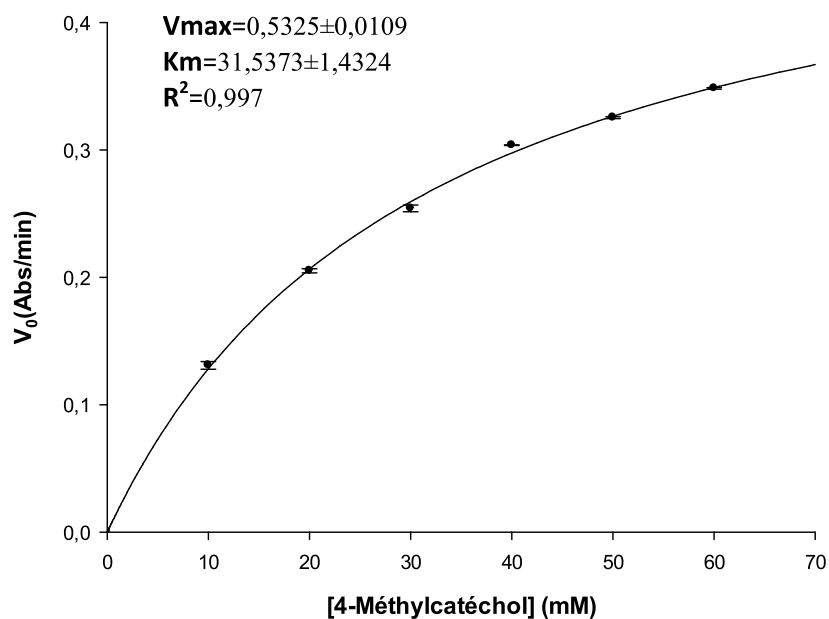
Les profils d'évolution de l'activité enzymatique de la PPO des trois variétés des dattes (Cv deglet noir, Degla beida et celle de Ghars) en fonction de la concentration de 4-Méthylcatéchol sont représentés dans les figures (22; 23 et 24) respectivement.

Nous remarquons que les représentations graphiques donnent des courbes d'allure hyperbolique, ce qui signifie que l'enzyme suit une cinétique michalienne.

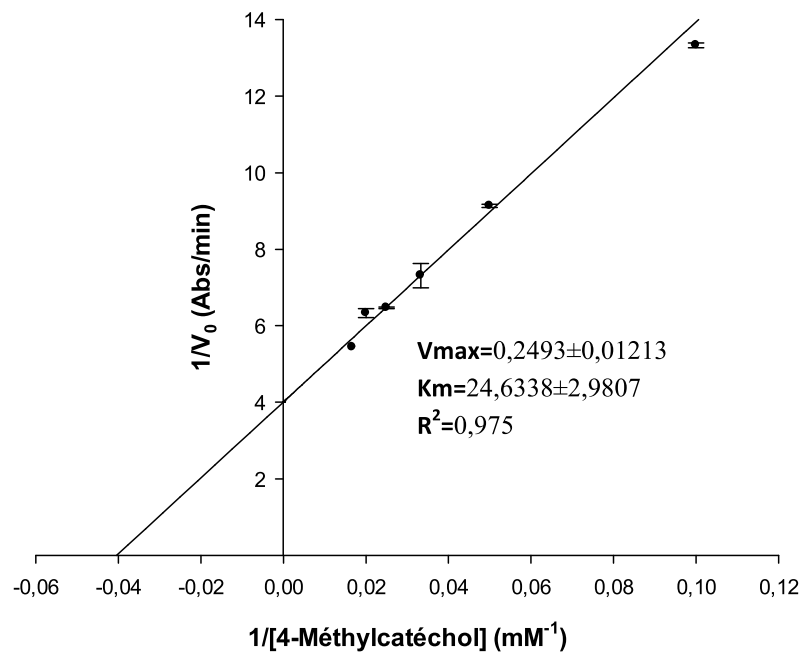
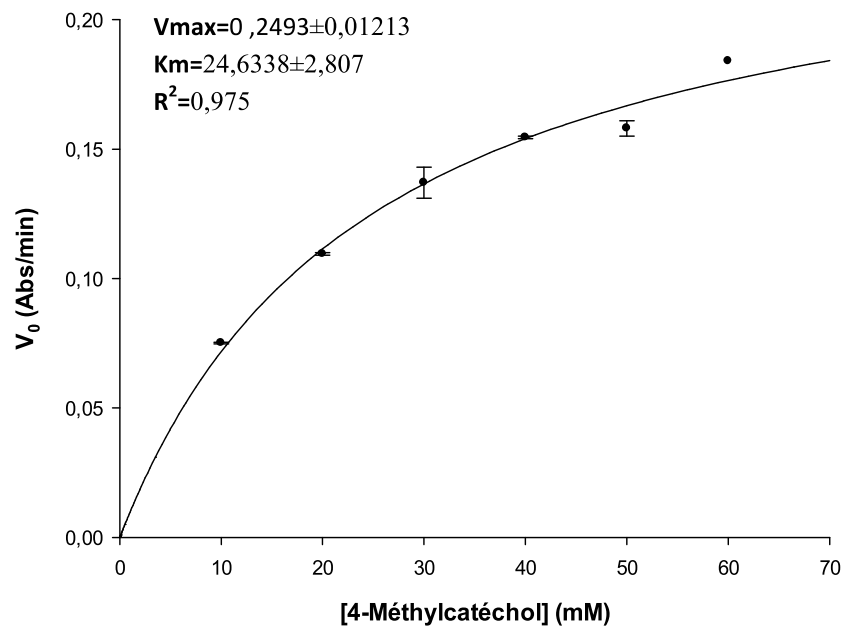
La courbe  $1/V$  vs  $[S]$  a été utilisée afin d'évaluer la valeur de la constante de dissociation du complexe inactif ESS ( $K_s$ ). Le phénomène d'inhibition par excès de substrat a été observé pour la PPO des trois variétés avec une valeur approximative valant 60 mM.

L'inhibition de la PPO par excès de substrat a été également rencontrée pour les PPO de différentes sources végétales (Tomita et al., 1980; Muñoz et al., 2010). Cet effet peut être dû à la formation d'un complexe actif enzyme-substrat (ES) où le substrat est mal orienté dans le site ou bien à la formation d'un complexe ternaire non actif (ESS) (Muñoz et al., 2010), de même, la fixation d'une deuxième molécule de substrats sur le même site enzymatique retarde son action catalytique (Zawistowski et al., 1991).

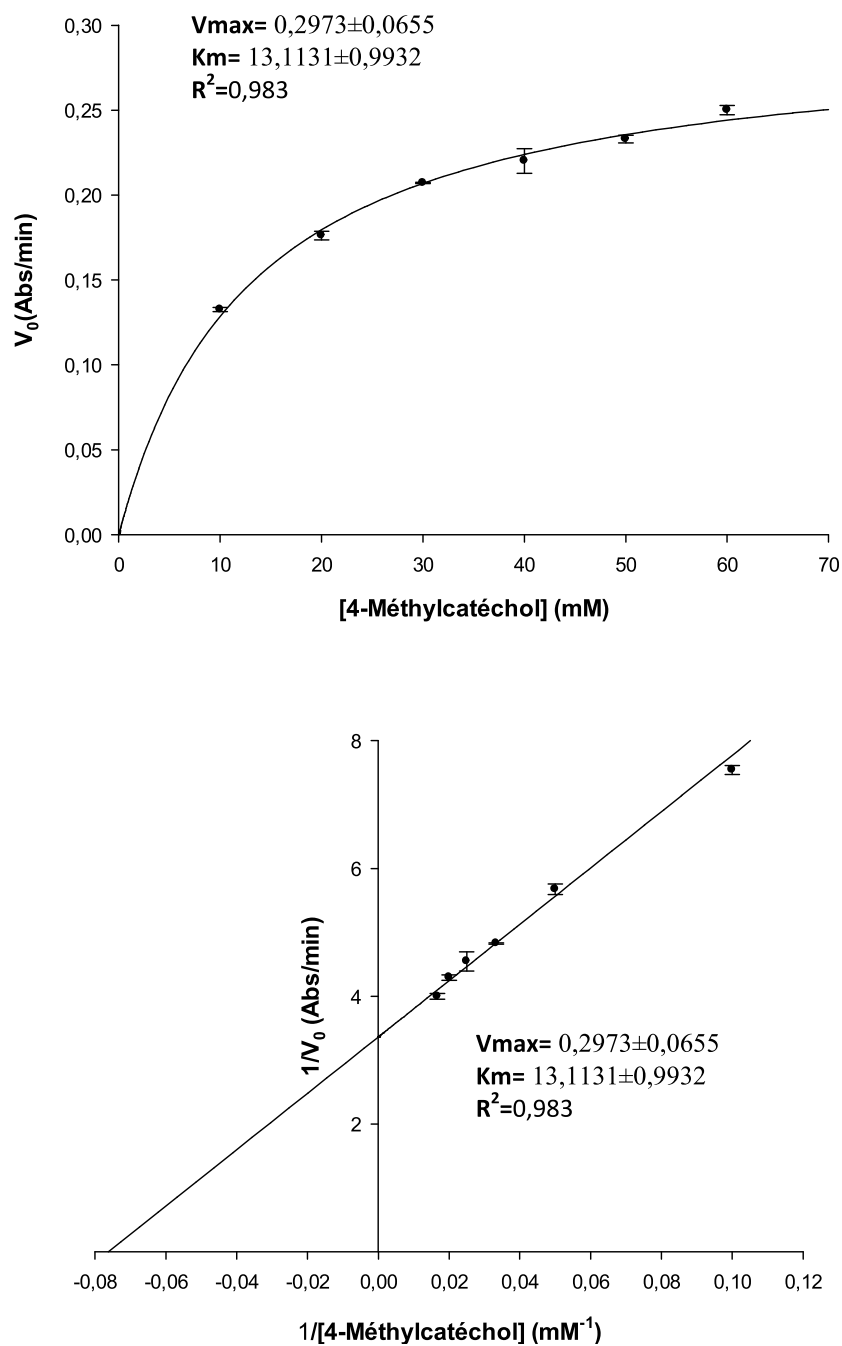
Haldane (1930) a suggéré que l'enzyme possède au moins deux sites actifs successifs et voisins dont chacun fixe une molécule de substrat conduisant par conséquent à un complexe inactif.



**Figure 22** : Effet de la concentration du 4-Méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par 4-Méthyl oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet noir: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.



**Figure 23 :** Effet de la concentration du 4-Méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par 4-Méthyl oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Degla beida: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.



**Figure 24 :** Effet de la concentration du 4-Méthylcatéchol sur la vitesse initiale d'oxydation par 4-Méthyl oxydase des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Ghars: (a) Représentation de Michaelis-Menten, (b) Représentation de Lineweaver-Burk.

## Chapitre 4 : Résultats et discussion

Les valeurs des paramètres cinétiques ( $V_{\max}$  et  $K_m$ , et le rapport  $V_{\max}/K_m$  efficacité) obtenus à partir des représentations graphiques de double inverse  $1/V=f(1/S)$  ainsi que sont récapitulées dans le tableau 7.

**Tableau 7:** Paramètres cinétiques de la PPO des dattes en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat

Source	Vmax (Abs/min)	Vmax ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Km(mM)	Vmax /Km ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mM}$ )
Deglet nour	0,5325 $\pm$ 0,0109	3,1323 $\pm$ 0,0109	31,537 $\pm$ 1,4324	0,0993
Degla beida	0,2493 $\pm$ 0,01213	1,4664 $\pm$ 0,01213	24,6338 $\pm$ 2,9141	0,0595
Ghars	0,2973 $\pm$ 0,0655	1,4664 $\pm$ 0,0655	13,1131 $\pm$ 0,9932	0,1118

En termes d'affinité, les PPOs de ces trois variétés présentent des différences significatives avec l'ordre d'affinité suivant:

PPO de deglet nour < PPO de Degla beida < PPO de Ghars

De même, en termes d'efficacité la PPO de Ghars semble avoir la meilleure efficacité pour le 4-Méthylcatéchol par rapport aux deux autres variétés dont l'ordre d'efficacité suivant:

PPO de Degla beida < PPO de deglet nour < PPO de Ghars

En effet, les recherches sur les PPOs impliquent généralement l'utilisation de Pyrocatechol comme substrat. Selon **Sachde et al., (1989)**, la valeur de la  $K_m$  de la PPO des dattes d'Iraq vis-à-vis du 4-Méthylcatéchol comme substrat, déterminée à pH 6.2 (tampon phosphate de potassium 0.01 M) sont: 3.5 et 8.75 pour les deux variétés de datte Barhee et Zahdi, respectivement.

Les valeurs de la constante de Michaelis-Menten déterminées pour le pyrocatechol comme substrat pour les PPOs d'artichaut (*Cynarascolymus L.*) (**Dogan et al., 2005**), de poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et pekyardimci., 2004**), de cerise (*Malpighiaglabra L.*) (**Kumar et al., 2008**), de Yam (*Dioscoreacayenensis-rotundata cv. Longbô*) (**Gnangui et al., 2009**), des racines de céleri (*ApiumgraveolensL.*) (**Aydemir et Akkanlı., 2006**); et de banane (*Musa cavendishii*) (**Ünal., 2007**) sont respectivement: 10.7, 5.55, 5.2, 13.93, 29 et 8.5 mM.

Une valeur de 14.3 mM pour la PPO du romarin (*Rosmarinusofficinalis L.*) (**Aydemir., 2010**), 10.7 mM pour la PPO de l'artichaut (*Cynarascolymus L.*) (**Dogan et al., 2005**), 5.5 mM pour la PPO de la poire (*Pyruscommunis*) (**Ziyan et pekyardimci., 2004**), 4.5 mM pour la PPO de coing (**Yağar & Sağıroğlu., 2002**), 5.2 mM pour la PPO de cerise (*Malpighiaglabra L.*) (**Kumar et al., 2008**), 6.3 mM pour la PPO de la mangue

(*Mangifera indica* L.) (Wang et al., 2007), 3.65 mM pour la PPO du raisin (*Vitis vinifera* L.) (Önez et al., 2008) et 8.3 mM pour la PPO de céleri (*Apium graveolens* L.) (Aydemir et al., 2006).

Les valeurs de  $K_m$  et  $V_{max}$  de la PPO varient avec le type du substrat, le tampon, de la concentration ionique, de la température, de la source de l'enzyme, le degré de pureté de l'enzyme et la méthode utilisée pour son extraction (Arslan et al., 1997 ; Dogan et Dogan., 2003; Ziyen et Pekyardimci., 2004).

Dogan et al., (2005) supposent que le pH affecte aussi les valeurs apparentes du  $K_m$ .

# *Conclusion*

## Chapitre 5: Conclusion

---

La PPO a été extraite à partir des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars selon une méthode simple à mettre en œuvre. L'extrait brut de la PPO des dattes possède une activité diphénolase en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

Le travail que nous avons entrepris dans le cadre de notre mémoire s'est focalisé pour déterminer les conditions optimale de l'activité 4-Méthylcatéchol oxydase à partir des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour, cv Degla beida et cv Ghars.

L'activité de la PPO des dattes est relativement thermostable et son activité est optimale dans le domaine de pH acide dont une valeur de 5.0 pour les dattes de Deglet-nour et Degla beida, et 4.5 pour la datte de Ghars.

La cinétique d'oxydation de 4-Méthylcatéchol par l'extrait brut de la PPO suit correctement le model de Michaelis-Menten, l'enzyme a une forte affinité et efficacité pour la variété de Ghars.

L'étude de la stabilité thermique de l'activité 4-Méthylcatécholase de la PPO montre que sa température optimale apparente est comprise entre 30-60°C.

En perspective, il serait envisageable de rechercher d'autre méthodes d'extraction pour augmenter l'activité et notamment le rendement de l'enzyme. L'enzyme ainsi obtenue peut être utilisée aussi bien lors de l'étude d'inhibition et d'inactivation de 4-Méthylcatécholase pour ces variétés des dattes.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

---

### A

- **ABSI, R. (2010).** Analyse de la diversité variétale du palmier Dattier (*Phoenix dactylifera* L.).Mémoire de Magister en science agronomiques. Université Mohamed KHIDER Biskra, 105p.
- **Acourene, S., et Tama, M. (1997).** Caractérisation physicochimique des principaux cultivars de datte de la région des Zibans. *Recherche Agronomique*, N° 1. Ed. INRAA, Alger .59-66p.
- **Adamski, J., Nowak, P., Kochana, J. (2010).** Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase. *Electrochimica Acta*, 55: 2363–2367.
- **Al-Houti, S., Sudhus, S., and Gabazard, H. (1998).** Chemical composition of seeds of date fruit cultivars of United Arab Emirates. *J.Food Chem.Technol.* 35: 44-46.
- **Al-Shahib, W., and Marshall, R.J. (2002).** Dietary fibre content of dates from 13 varieties of date palm *Phoenix dactylifera* L. *Inter .J .Food .Sci and Tech.* 37: 719-721.
- **Ameer, Q., et Adeloju, SB. (2009).** Development of a potentiometric catechol biosensor by entrapment of tyrosinase within polypyrrole film. *Sensors and Actuators B.* 140: 5–11.
- **Anonyme. (2002).** Statistiques agricoles : Superficies et productions. Ministère de l’agriculture et du développement rural. Série A, 5-6 p.
- **Arslan, O., Temur, A., Tozlu, I. (1997).** Polyphenol oxidase from *Allium* sp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*45:2861–2863.
- **Arslan, O., and Doğan, S. (2005).** Inhibition of polyphenol oxidase obtained from various sources by 2,3-diaminopropionic acid. *Journal of the science of food and agriculture* Vol. 85, pp. 1499-1504.
- **Asanuma, M., Miyazaki, I., Ogawa, N. (2003).** Dopamine or-L-DOPA-induced neuro toxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity Research* 5 (3):165-176.
- **ASAV, E., YORGANCI, E., AKYILMAZ, E. (2009).** An inhibition type amperometric biosensor based on tyrosinase enzyme for fluoride determination. *Talanta.*78 :553-556.

## Références bibliographiques

---

- **Aydemir, A. (2004).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*) heads. *Food Chem.*, 87, 59-67.
- **Aydemir, T., Akkanli, G. (2006).** Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens L.*) and the investigation of the effects on the enzyme activity of some inhibitors. *J. Food Sci. Tech.*, 41, 1090–1098.
- **Aydemir, T. (2010).** Selected kinetic properties of polyphenol oxidase extracted from *Rosmarinus officinalis L.* *International Journal of Food Properties*. 13: 475-485.

### B

- **BAKKAYE, S. (2006).** Lexique phoenicicole en arabe et en mozabite. CWANA, HCA et RAB98/G31. 14-16, 24-25, 31P.
- **Belguedj, M. (2001).** Caractéristiques des cultivars de dattes dans les palmeraies du Sud-Est Algérien, N° 11, INRAA. El-Harrach , Alger. 289 p.
- **Benchabane, A. (1996).** Rapport de synthèse de l'atelier "Technologie et qualité de la datte".In Options méditerranéennes, série A, N° 28. Séminaires méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza,Spain. pp 205-210.
- **Benchelah, A., et Maka, M. (2008).** Les Dattes, intérêt et nutrition. *Phytothérapie (ethnobotanique)*.6: 117 -121.
- **Benjakul, S., Visessanguan, W., Tanaka, M. (2005).** Properties of phenoloxidase isolated from the cephalothorax of kuruma prawn (*Penaeus japonicus*).” *Journal of Food Biochemistry*. 29: 470-485.
- **Besbes, S., Drira, L., Blecker, K., Deroanne, C., and Hamadi, A. (2009).** Adding value to hard date (*Phoenix dactylifera L.*): compositional, functional and sensory characteristics of date jam. *J. Food. Chem.* 112: 406-411.
- **Boubekri, A. (2010).** Optimisation des traitements thermiques de la datte Algérienne«Deglet- Nour».Thèse de doctorat d'état en génie mécanique, Option : Energétique,Université de Hadj –Lakhdar Batna.
- **BOUGUEDOURA, N. (1991).** Connaissance de la morphogenèse du palmier dattier. Etude *in situ* et *in vitro* du développement morphogénétique des appareils végétatifs et reproducteurs. Mémoire de doctorat. U.S.T.H.B. Alger. 201 p.

## Références bibliographiques

---

- **Buelguedj, A., and Nacib, N. (2001).** Production d'acide lactique par *Lactobacillus rhamnosus* sur milieu à base de jus de dattes .rev.enreg.ren.production et valorisation biomasse.p41-46.

### C

- **Cheng, X., and Zhang, M., Adhikari, B. (2013).** The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, *Ultrasonics Sonochemistry* 20,674–679.
- **Chutintrasri, B., et Noomhorm, A. (2006).** Thermal inactivation of polyphenol oxidase in pineapple puree. *Lebensmittel-wissenschaft.*, 36, 492-495.
- **CLAUS, H., AND DECKER, H. (2006).** Bacterial tyrosinases. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 29. Issue 1, pp. 3-14.
- **Coutouly, G. (1991).** Génie enzymatique. Edition Masson et Doin, Paris, 244 pages.
- **Cowan, M., Horst, E.A., Luengpailin, S., Doyle, R.J. (2000).** Inhibitory effects of plant polyphenoloxidase on colonization factors of *Streptococcus sobrinus* 6715. *Anti microbial Agents and Chemotherapy* 44 (9):2578-2580.
- **Cuff, M., Millerki, E., Van Holdeke, Hendrick Sonwa. (1998).** Crystal structure of a functional unit from Octopus dofleini hemocyanin. *JMolBiol* 1998; 278: 855–70.
- **CUI, Y., BARFORD, J.p., AND RENNEBERG, R. (2006).** A disposable, screen-printed electrode for the amperometric determination of azide based on the immobilization with catalase or tyrosinase .*Analytical Science*.22 :1279-1281.

### D

- **Dalmadi, I., Rapean, G., Loey, An., Smout, C., Hendrickx, M. (2006).** Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*, V 30, p 56–76.
- **DIXON, M., WEBB, E.C. (1964).** Dans “enzymes”. Longman ed., Londres, 694-695.
- **DJERBI M. (1994).** Précis de phoeniciculture. Ed. FAO, Rome: 192p.
- **Djouab, A. (2007).** Contribution à l'identification des constituants mineurs de la datte Mech-Degla. Essai de valorisation par incorporation dans une recette de margarine allégée. Mémoire de Magister.option génie alimentaire, Université de Boumerdès.24p.

## Références bibliographiques

---

- **Dogan, M., & Dogan, S. (2003).** Determination of kinetic properties of polyphenol oxidase from Thymus (*Thymus longicaulis subsp. Chaubardii var. chaubardii*). *J Food Chem.* 39: 1-9.
- **Dogan, S., Turan, Y., Erturk, H., Arslan, O. (2005).** Characterization and purification of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus L.*). *J Agric Food Chem.*, 53, 776–785.
- **Doğru, Y.Z., & Erat, M. (2012).** Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum, Apiaceae*) *Food Research international*,49, 411-415.
- **Duangmal, K., Owusu Apenten, R.K. (1999).** A comparative study of polyphenoloxidase from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum var. Romano*). *Food Chem.* 64:351-359.
- **DUBOST, D. (1991).** Ecologie, aménagement et développement agricole des oasis algériennes. Thèse de doctorat, université de Tours, France, 191p
- **Duran, N., Esposito, E. (2000).** Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment. *Appl. Catal. B Environ.* 28: 83–99.

### E

- **EICKEN, C., KREBS, B., AND SACCHETTINI, J.C. (1999).** Catechol oxidase – structure and activity. *Catalysis and regulation. Current Opinion in Structural Biology.*Vol.9, pp. 677-683.
- **ELHOUMAIZI, M., SAAIDI, M., OIHABI, A., CILAS, C. (2002).** Phenotypic diversity of date-palm cultivars (*Phoenix dactylifera L.*) from Morocco. *Genet. Resource. Corp.Evolved* 49, 483–490 pp.
- **Erat, M., Nuri, Y., Gülşah, S.A., Demirkol, A. (2010).** Partial characterization of polyphenol oxidase from a hybridized wheat (*Triticum aestivum L.*) *European Food Research and Technology.*23,6,899-905.
- **Espiard, E. (2002).** Introduction à la transformation industrielle des fruits. Ed. Tech et Doc.Lavoisier, Paris. pp 147-155.
- **Es-Safi, N.E., Cheynier, V., Moutounet, M. (2003).** Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *J Food Comp Anal.* 16:535–553.

## Références bibliographiques

---

- **Estanove, P. (1990).** Note technique : Valorisation de la datte. In : Options méditerranéennes, série A, N°11. Systèmes agricoles oasiens. Ed. CIHEAM. pp 301-318.

### F

- **Fang, Z., Zhang, M., Sun, Y., et Sun, J. (2007).** Polyphenol oxidase from bayberry (*Myrica rubra* Sied. Zucc.) and its role in anthocyanin degradation. *Food Chemistry*, 103, 268-273.
- **Favier, J.C., Ireland, R.J., Laussucq, C., et Feinberg, M. (1993).** Répertoire général des aliments. Table de composition des fruits exotiques, fruits de cueillette d'Afrique. Tome III, Ed. ORSTOM, Lavoisier, INRA. 27-28 p.
- **Fenoll, L.G., Peñalver, M.J., Rodríguez-López, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F., and Tudela, J. (2004).** Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem. J.* 380: 643-650.
- **Fujita, S., Saari, N., Maegawa, M., Tetsuka, T., Hayashi, N., & Tono, T. (1995).** Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L.). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 43(113)1138–1142.

### G

- **Garcia-Borron, J.C., Solano, F. (2002).** Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine bound metal catalytic center. *Pigment Cell Res.* 15: 162-173.
- **Gawlik-Dziki, U., Zlotek, U., & Swieca, M. (2008).** Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. *Capitata* L.). *Food Chemistry*. 107: 129–135.
- **GHAZI, F., SAHRAOUI, S. (2005).** Evolution des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux au cours de la maturation de deux variétés de dattes communes : Tantbouchet et Hamraia. Mémoire d'Ingénieur. Institute national d'agronomie. Alger, 81 p.
- **Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G. (2010).** Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci.* (3):369-385.

## Références bibliographiques

---

- **Gilles, P. (2000).** Cultiver le palmier dattier .Ed. CIRAS. p 110.
- **Gnangui, S.N., Dué, E.A., N’guessan Kouadio, J.P., Kouamé, L.P. (2009).** Effect of heat treatment on edible yam polyphenol oxidase activity: kinetic and thermodynamic analysis. *Journal of animal & plant sciences.* 2,( 3),128 – 137.
- **Goyeneche, R., DiScala, K., Roura, A. (2013).** Biochemical characterization and thermal inactivation of polyphenol oxidase from radish(*Raphanussativus var.sativus*) *Food Science and Technology.*(54), 57-62.

### H

- **Halaouili, S., Asther, M., Sigoillot, J.C., Hamdi, M., Lomascolo, A. (2006).** Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* 100, 219–232.
- **HAREL, E., MAYER, A.M., SHAH, Y. (1964).** Catechol oxidases from apples, their properties, subcellular location and inhibition. *Physiol. Plant* 17, 921-929.
- **Henk, J., Zwir, E. et Rik, L. (2003).** Caroténoïdes et flavonoïdes contre le stress oxydatif. *Arômes Ingrédients Additifs.* 44: 42-45.
- **Hussein, A.S., Alhadrami, G.A., & Khalil, Y.H. (1998).** The use of dates and date pits in broiler starter and finisher diets. *Bioresource Technology,* 66, 219–223.

### J

- **Jiang, Y.M. (1999).** Purification and some properties of polyphenol oxidase of longan fruit. *Food Chemistry.* 66:75–79.
- **JOLIVET, S., ARPIN, N., WICHERS, H.J., PELLON, G. (1998).** Agaricus bisporus browning: a review. *Mycol. Res.* 102: 1459-1483.
- **José, L., Navarro, A.T., Miguel, A.S., Enrique, S. (2014).** Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from persimmon. *Food Chemistry,* V 157, Pages 283-289.

### K

- **Kahn, F. (1997).** Monophenolase activity of avocado polyphenol oxidase. *Phytochemistry.* 19, 379-385.
- **KEILIN, D., AND MANN, T. (1938).** Polyphenol oxidase: purification, nature and properties. *Proceedings of the Royal Society B.* 125: 187-204.

## Références bibliographiques

---

- **Khatun, S., Absar, N., And Ashraduzzaman, M. (2001).** Purification, Characterization and Effect of Physico-Chemical Agents on Stability of Phenoloxidase from Sajna (*Moringa oleifera L.*) Leaves at Mature Stage. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 4: 1129-1132.
- **KLABUNDE, T., EICKEN, C., SACCHETTINI, J.C., AND KREBS, B. (1998).** Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *nature structural biology*, Vol. 5, No. 12. pp. 1084-1090.
- **Kochana, J., Nowak, P., Jarosz-Wilkolazka, A., Bieroń, M. (2008).** Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds. *Microchemical Journal.* 89: 171–174.
- **Kolcuoğlu, Y., Colak, A., Sesli, E., Yildirim, M., Saglam. (2006).** N. “Comparative characterization of monophenolase and diphenolase activities from a wild edible mushroom (*Macrolepiota mastoidea*).” *Food Chemistry.*, Vol.101, 778-785.
- **Kubowitz, F. (1938).** Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase und des Hämocyanins. *Biochemisches Zeitung.* 299: 32-57.
- **Kumar Anil, V.B., Mohane Kishor, T.C., Murugan, K. (2008).** Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia gelabra L.*). *Food Chemistry.* 110:328-333.
- **Kuwabara, T., Katoh, Y. (1999).** Involvement of the binuclear copper site in the proteolytic activity of polyphenol oxidase. *Plant Cell Physiol.* 40: 1029-1035.

### L

- **Lax, A.R., Vaughn, K.C. (1991).** Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant Physiol.* 96: 26-31.
- **Lerch, K. (1983).** *Neurospora sp* tyrosinase: structural, spectroscopic and catalytic properties. *Mol. Cell. Biochem.* 52, 125-138.
- **LERNER, A.B. (1953).** Metabolism of phenylalanine and tyrosine. *Adv Enzymol.* 14, 73-128.
- **Li, S., Tan, Y., Wang, P., Kan, J. (2010).** Inhibition of benzoic acid on the polyaniline polyphenol oxidase biosensor. *Sensors and Actuators B.* 144 : 18–22.
- **Loera, C.O., Pérez, P.M., Cristina, I.B., Rodríguez, J.R., and Villaseñor, O.F. (2006).** *Advances in Agricultural and Food Biotechnology.* 323-340.

## Références bibliographiques

---

### M

- **Madhavi, V., & Lele, S.S. (2009).** Laccase properties, use, Bioresources. 1694-1717.
- **Majid, Y., Moridania, B., Arnosiraki, A., Tatiana-Chevaldina, A., Hughscobie, Peter O'brien, J. (2004).** Quantitative structure toxicity relationships for catechols in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* .145(2):213-23.
- **Mansouri, A., Guendez, E., Kokkalou, E., and Kefalas, P. (2005).** Phenolic profile and antioxidant activity of Algerian ripe date palm (*Phoenix dactylifera*). *Food.Chem.* 89:411-420.
- **Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J. (1995).** Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiol. Biochem.* 33, 193-200.
- **Martinez, M.V., and Whitaker, J.R. (1995).** The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 6, pp. 195–200.
- **Martinez-Cayuela, M., Rodriguez-Vico, F., Faus, M.J., And Gil, A. (1989).** Partial purification and intracellular localization of cherimoya (*Annona cherimolia* Mill.) Polyphenol oxidase. *J.Plant Physiol.* 133, 660-663.
- **Martínez, C.M., Corzo, N., Villamiel, M., Del Castillo, M.D. (2012).** chapitre 4 Browning Reactions. *Food Biochemistry and Food Processing*, Second Edition.
- **Matallah, M. (2004).** Contribution à l'étude de la conservation des dates variété Deglet-Nour: Isotherme d'adsorption et de désorption. Mémoire d'Ingénieria, INA. El-Harrach. Alger.
- **Mayer, A.M. (1987).** Review article number 22. Polyphenol oxidases in plants—Recent.
- **MAYER, A.M., HAREL, E. (1979).** Polyphenol oxidase in fruit and vegetables. In *Food Enzymology*,. F. Fox (Ed), Elsevier, London, p. 253-272.
- **Mayer, A.M., Harel, E. (1991).** Phenoloxidases and their significance in fruits and vegetables. *Food Enzymology*, Edited by P.F. Fox (Elsevier Publisher). Pp: 373-397.
- **Mesquita, V.L., Queiroz, C. (2013).** Chapter 10 ;Enzymatic Browning. *Biochemistry of Foods (Third Edition)*, 387-418.
- **Min, K., Yoo, Y.J. (2009).** Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase—SWNTs—Ppy composite electrode. *Talanta.* 80: 1007-1011.

## Références bibliographiques

---

- **Montereali, MR., Della Seta, L., Vastarella, W., Pilloton R. (2010).** A disposable Laccase–Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64: 189–194.
- **Muñoz-Muñoz, Jl., Garcia-Molina, F., Varon, R., Tudela, J., Garcia, F., Rodríguez-López, Jn. (2010).** New features of the steady-state rate related with the initial concentration of substrate in the diphenolase and monophenolase activities of tyrosinase . *J Math Chem*.

### N

- **Na-Na, L., Wei, L., Dai-Jie, W., Yi-Bin, Z., Xiao-Jing, L., Xiao, W.A., Sheng-Bo, Li. (2013).** Purification and partial characterization of polyphenol oxidase from the flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Chemistry*, V 138, P478- 483.
- **Njagi, J., Chernov, MM., Leiter, JC., Andreescu, S. (2010).** Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82: 989-996.
- **Noui, Y. (2001).** L'optimisation de la production de la biomasse « *saccharomyces cerevisiae* » cultivé sur un extrait de datte. Mémoire d'ingénieur. Département d'agronomie. Batna. 62p.
- **Noui, Y. (2007).** Caractérisation physico-chimique comparative des deux tissus constitutifs de la pulpe de datte Mech-Degla. Mémoire de Magister en génie alimentaire, Université de Boumerdès. 33p.

### O

- **Önez, Z., Karakuş, E., Pekyardimci, Ş. (2008).** Izmir grape polyphenol oxidase (*Vitis vinifera* L.): Partial purification and some kinetic properties. *Journal of Food Biochemistry*. 32, 396–414.

### P

- **Perez-Gilabert, M., Morte, A., Honrubia, M., And Garcia-Carmona, F. (2001).** Monophenolase activity of latent *Terfezia claveryi* tyrosinase: Characterization and histochemical localization. *Physiology Plantarum*. 133: 203-209.
- **Polaina, J., & Maccabe, A.P. (2007).** Industrial enzymes: structure, function and applications .Springer, XII, 642 p.

## Références bibliographiques

---

### Q

- **Queiroz, C., Maria, L.M., Fialho, E., Vera Lúci, A. (2008).** Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 24, 361–375.

### R

- **Rodriguez, C.S., & Toca Herrera, J.L. (2006).** Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol Adv* 24 (5):500-13.

### S

- **Sachde, A.G., Al-bakir, A.y., and Abdul-Raheem, J.A.K. (1989).** Polyphenoloxidase from barhee and zahdi dates.I.Purification J.Food Biochem.Vol 12: 227-240.
- **Sakiroglu, H., Kufrevioglu, I.O., Kocacaliskan, I., Oktay, M., Onganer Y. (1996).** Purification and characterization of Dog-rose (*Rosa dumalis Rechst.*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food. Chem.*, 44, 2982–2986.
- **Sanchez Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J.N., Garcia Canovas, F., Garcia Carmona,F. (1995).** Tyrosinase:a comprehensive review of its mechanism.*Biochim.Biophys .Acta* 1247 ,1–11.
- **Seo, S.Y., Sharma, V.K., Sharma, N. (2003).** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2837–2853.
- **Shan, D., Mousty, C., Cosnier, S. (2004).** Subnanomolar cyanide detection at polyphenol oxidase/clay biosensors. *Anal. Chem.* 76: 178-183.
- **Siboukeur, O. (1997).** Qualité nutritionnelle, hygiénique et organoleptique du jus de dattes.Memoire de Magister, INA. El-Harrach, Alger. 106 p.
- **Simsek, S., & Yemenicioglu, A. (2007).** Partial purification and kinetic characterization of mushroom stem polyphenoloxidase and determination of its storage stability in different lyophilized forms. *Process Biochemistry*.
- **Sojo, M.M., Nuñez-Delicado, E., García-Carmona, F., Sánchez-Ferrer, A. (1998).** Partial purification of a banana polyphenol oxidase using Triton X-114 and PEG 800 for removal of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4924-4930.
- **Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D., and Thipyapong, P. (1998).** Polyphenol oxidase. In *Polyphenols 96*. Editors: J. Vercauteren, C. Cheze, J. Triaud. Editions. INRA, Paris (Les Colloques) N°87. pp. 223-250.

## Références bibliographiques

---

### T

- **Tan, Y., Guo, X., Zhang, J., Kan, J. (2010).** Amperometric catechol biosensor based on polyaniline–polyphenol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*. 25: 1681–1687.
- **Todaro, A., Cavallaro, R., Argento, S., Brancand, F., Spagna, G. (2011).** Study and Characterization of Polyphenol Oxidase from Eggplant (*solanum melongena* L.) .*J. Agric. Food Chem*,59 (20),11244–11248.
- **Tomita, Y., Hariu, A., Mizuno, C., Seiji, M. (1980).** Inactivation of tyrosinase by dopa. *J Invest Dermatol*.75(5):379-82.
- **Toutain, G. (1996).** Rapport de synthèse de l'atelier "Techniques culturelles du palmier dattier". In :Options méditerranéennes, série, N° 28. Le palmier dattier dans l'agriculture d'oasis des pays méditerranéens. Ed. IAM, Zaragoza, Spain. pp 201-205.
- **Trebst, A., et Depka, B. (1995).** polyphenol oxydase and photpsynthesis research. *Photosynththesis Research* 46:41-44.

### U

- **Ullah, M.R. (1991).** Tea. In *Food Enzymology*, (P.F. Fox, ed.) pp. 163-187, Elsevier Science Publishing, New York.
- **Ünal, M.Ü. (2007).** Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). *Food Chemistry*., 100, 909-913.

### V

- **Vámos-Vigyázó, L. (1981).** Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crc crit. Rev. Food sci. Nutr*, Vol. 15, pp. 49-127.
- **Van Gelder, W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. (1997).** Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phyto-chemistry* 45, 1309- 1323.
- **Virador, V.M., Grajeda, J.P.R., Blanco-Labra, L., Mendiola-Olaya, E., Smith, M., Moreno, A., Whitaker, J.R. (2010).** Cloning, Sequencing, Purification, and Crystal Structure of Grenache (*Vitis vinifera*) Polyphenol Oxidase. *Agric. Food Chem.* , 58, 1189–1201.
- **Voet, D., Voet, J.G. (2011).** *Biochemistry*, 4th Edition. Courier/Kendallville.USA.

### W

- **Walker, J.R.L., & Ferrar, P.H. (1995).** Diphenol oxidase, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 15, 457±498.

## Références bibliographiques

---

- **WANG, J., JIANG, W., WANG, B., LIU, S., GONG, Z., AND LUO, Y. (2007).** Partial properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica* L. cv. “Tainong”) pulp. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 45–55.
- **WHITAKER, J.R. (1994).** *Principales of Enzymology for the Food Sciences*, second ed. Marcel Dekker, New York. 271-556.
- **WHITAKER, J., LEE, C.Y. (1995).** Recent advances in chemistry of enzymatic browning. In *Enzymatic browning and its prevention*. J. Whitaker, C. Y. Lee (Eds). Washington, American Chemical Society: 2-7.
- **WHITAKER, JR. (1995).** Polyphenol oxidase. In: WONG, D.W.S. (Ed.) *Food enzymes: Structure and Mechanism*. New York: Chapman and Hall. 271-307.
- **Wuyts, N., Waele, D., Swennen. (2006).** Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots, *science direct*, 100, 909-913.

### X

- **Xu, Y.M., Stokes, R., Roskoski, And Vrana, K.E. (1998).** Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *Journal of Neuroscience Research* 54 (5):691-697.

### Y

- **Yagar, H., & Sagiroglu, A. (2002).** Partially purification and characterization of polyphenol oxidase of quince. *Turk. J. Chem.* Vol. 26, pp. 97-103.
- **Yahiaoui, K. (1998).** Caractérisation physico-chimique et évolution du brunissement de la datte « D-N » au cours de la maturation. Mémoire de Magister. I.N.A. El-Harrach. Alger. 66p. *Agr Sahar* 1978 ; 1 : 1-35.
- **Yamada, K., Akiba, Y., Shibuya, K., Kashiwada, A., Matsuda, K., and Hirata, M. (2005).** Water Purification through Bioconversion of Phenol Compounds by Tyrosinase and Chemical Adsorption by Chitosan Beads. *Biotechnol. Prog.* 21: 823-829.
- **Yang, C., Fujita, S., Ashraf-Uzzaman, M., Nakamura, N., And Hayashi, N. (2000).** Purification and characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa sapientum* L.) pulp. *J. Agric. Food Chem.* 48,2732-2735.

## Références bibliographiques

---

- **Yemenicioglu, A., & Cemeroglu, B. (2003).** Consistency of Polyphenol Oxidase (PPO) Thermostability in Ripening Apricots (*Prunus armeniaca* L.): Evidence for the Presence of Thermostable PPO Forming and Destabilizing Mechanisms in Apricots. *J. Agric. Food Chem.* 51:2371-2379.
- **Yoruk, R., & Marshall, M.R. (2003).** Physiochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. *J. Food Chem.* 27,361–422.

### Z

- **Zawistowski, J., BILIADERIS, C.G., AND ESKIN, N.A.M. (1991).** Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science). 217-273.
- **Zawistowski, J., Biliaderis, C.G., and Eskin, N.A.M. (1991).** Polyphenol oxidase. In: Oxidative enzyme in foods. D.S. Robinson. N.A.M Eskin, eds. (London, uk: Elsevier Applied Science), pp. 217-273.-Siegbahn, P.E.M. 2004. The catalytic cycle of catechol oxidase. *J Biol Inorg Chem.* Vol. 9, pp. 577-590.
- **Zhang, G.H., Wang, Y.F., Zhang, X.Q., Nag, T.Z., Wang, H.X. (2010).** Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochemistry.* V45, Pages 627–63.
- **Zhou, H.W., & Feng, X. (1991).** Polyphenol oxidase from yali pear (*Pyrus bretschneideri*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, V57, p 307–313.
- **Ziyan, E., And Pekyardimci, S. (2004).** Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turk J Chem.* 28:547-557.
- **Ziya Dogru, Y., Erat, M. (2012).** Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae) *Food Research international*, V 49, 411-415.

## Résumé

L'objectif principal de ce travail est l'étude des conditions optimales de la polyphénol oxydase (PPO: EC 1.10.3.1) extraite des dattes (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour , cv Degla beida et cv Ghars. La PPO de ces variétés de dattes possède une activité 4-Méthylcatécholase, mesurée par spectrophotométrie à 410 nm en présence de 4-Méthylcatéchol comme substrat.

L'étude de la stabilité thermique a montré que le 4-Méthylcatéchol oxydase est relativement thermostable jusqu'au 60°C, au-delà, de cette température l'activité de cette enzyme diminue progressivement. De plus les valeurs de pH optimum ainsi que les paramètres cinétiques ont été également estimés comme suit, Deglet nour (pH=5,0,  $V_{max}=0,5325$  Abs /min,  $K_m=31,537$  mM), Degla beida (pH= 5,0,  $V_{max}= 0,00418$  Abs /min,  $K_m=24,6338$  mM ) et Ghars (pH= 4,5,  $V_{max}=0,2973$  Abs /min,  $K_m= 13,1131$  mM) .

**Mots clés:** *Phoenix dactylifera* L , Polyphénol oxydase , Condition optimales , Activité enzymatique.

## Abstract

This paper reports the study of the optimal conditions of polyphenol oxidase (PPO :EC 1.10.3.1) Extracted from threes types of dates (*Phoenix dactylifera* L.) cv Deglet-nour , cv Degla beida and cv Ghars. The PPO of these date ones possess 4-Methylcatecholase activity, measured by spectrophotometry at 410 nm using 4-methylcatechol as substrate.

The study of thermal stability showed that 4-Methylcatechol oxidase is relatively thermostable up to 60 ° C Beyond this temperature the activity of this enzyme decreases progressively. In addition, optimum pH values and kinetic parameters were also estimated as follows: Deglet-nour (pH=5,0,  $V_{max}=0,5325$  Abs /min,  $K_m=31,537$  mM) , Degla beida (pH=5,0,  $V_{max}=0,00418$  Abs /min,  $K_m=24,6338$  mM ) , Ghars (pH= 4,5 ,  $V_{max}=0,2973$  Abs /min,  $K_m=13,1131$  mM) .

**Keywords:** *Phoenix dactylifera* L , Polyphénol oxidase , Optimal condition, Enzymatic activity.

## المخلص:

يهدف هذا العمل العلمي الى دراسة الشروط المثالية لنشاط أنزيم متعدد الفينول أوكسيداز(1.10.3.1) المستخلص من ثلاثة أصناف من التمر من صنف (*Phoenix dactylifera* L) من نوع دقلة نور, دقلة البيضاء, الغرس .

حيث تم تأكيد النشاط 4- مثل كاتيكولازي لهذا الانزيم ، باستعمال جهاز قياس الطيفي على الموجة 410 نانومتر و كذا في وجود الركيزة 4- مثل الكاتيكول .

أظهرت دراسة الاستقرار الحراري أن الإنزيم هدامستقرة نسبيا حتى درجة C 60 ° , ومن بعد هذه الدرجة لاحظنا تناقص تديجي للنشاط الأنزيمي . كما تم أيضا التأكد من القيم المثلى للمحتمل الهيدروجين (pH) وكذا الخصائص الحركية كالآتي:

دقلة نور, ( $V_{max}=0,5325$  Abs /min,  $K_m=31,537$  mM) دقلة البيضاء, ( $V_{max}=0,00418$  Abs /min,  $K_m=24,6338$  mM) , الغرس ( $V_{max}=0,2973$  Abs /min,  $K_m= 13,1131$  mM) .

**الكلمات المفتاحية:** فونكس داكتيليفيرا ل, متعدد الفينول أوكسيداز, الشروط المثالية, النشاط الأنزيمي.